



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA

ALESSANDRO GAVAZZONI

ANÁLISE DO POTENCIAL OSTEOINDUTOR DE UM COMPÓSITO A BASE DE
HIDROXIAPATITA-PENTÓXIDO DE NÍOBIO EM SÍTIO ECTÓPICO DE RATOS
WISTAR

MARINGÁ/PR
2019

ALESSANDRO GAVAZZONI

ANÁLISE DO POTENCIAL OSTEOINDUTOR DE UM COMPÓSITO A BASE DE
HIDROXIAPATITA-PENTÓXIDO DE NÍOBIO EM SÍTIO ECTÓPICO DE RATOS
WISTAR

Tese apresentada à Universidade Estadual de
Maringá para a obtenção do título de doutor
em Odontologia Integrada pelo Programa de
Pós-Graduação em Odontologia Integrada.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luzmarina Hernandes
Coorientador: Prof. Dr. Sidney Barnabé Peres

MARINGÁ/PR
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

G281a Gavazzoni, Alessandro
Análise do potencial osteoindutor de um compósito a base de hidroxiapatita-pentóxido de nióbio em sítio ectópico de ratos wistar / Alessandro Gavazzoni. -- Maringá, 2019.
50 f. : il. color., figs.

Orientadora: Profa. Dra. Luzmarina Hernandes.
Coorientador: Prof. Dr. Sidney Barnabé Peres.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, 2019.

1. Osteoindução. 2. Cerâmica bifásica. 3. Pentóxido de nióbio. 4. Sítio ectópico. I. Hernandes, Luzmarina, orient. II. Peres, Sidney Barnabé, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada. IV. Título.

CDD 23.ed.617.695

Elaine Cristina Soares Lira - CRB-9/1202

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, a Professora Luzmarina Hernandes por todo o direcionamento e atenção dispensados na trajetória deste trabalho. Meu profundo agradecimento.

Às técnicas Maria Euride Carlos Cancino, Maria Angela Moreira da Costa, Maria dos Anjos Moreira Fortunato e Silvia Santana Mendes por todo o apoio e orientações durante os procedimentos laboratoriais.

A todos os alunos de iniciação científica, mestrado, doutorado e pós-doutorado que direta ou indiretamente me auxiliaram na conclusão deste trabalho.

Um agradecimento especial à Bruna Milhomens de Souza e à Camila Giroto da Silva por todo o suporte e disponibilidade. Muito sucesso e realizações em suas trajetórias pois vocês merecem.

Ao prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand por toda a orientação e disponibilidade durante às análises físicas. Muito obrigado.

Aos professores Mauro Luciano Baesso e Sidney Barnabé Peres pelo suporte na execução deste trabalho.

À Sonia Maria Borean Borghi, secretária do Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada pelo suporte fornecido em todas as etapas burocráticas.

Aos integrantes da banca avaliadora pela disponibilidade em contribuir com o trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu filho, João, acompanhou todo o processo do doutorado e que, apesar da pouca idade, soube entender a importância desta etapa. Saiba que seu sorriso, sua inteligência, beleza, alegria e educação são as principais fontes de inspiração para mim e pode ter certeza que fiz tudo o que eu pude para que a minha “ausência” valha a pena. O papai te ama muito e para sempre!!!!!!

À Alexandra por ser uma mãe preocupada, dedicada e cuidadosa. Isso me ajudou pois eu tinha certeza que o João estava em boas mãos.

Aos meus pais, Ezio e Maria José, pelo amor, dedicação, suporte e sabedoria, dando apoio incondicional às minhas escolhas.

Aos meus familiares, principalmente o irmão que eu mais amo no mundo (Marlus), minha cunhada (Adriana), meu afilhado (João Vitor) e sobrinha (Marina) pelos bons momentos que compartilhamos juntos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade Estadual de Maringá, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Julio César Damasceno.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada, na pessoa do coordenador, prof. Sergio Sábio.

Ao departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá, em nome da profa. Sonia Trannin de Mello.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Os biomateriais osteoindutores representam uma alternativa para contornar as desvantagens da engenharia de tecidos e dos enxertos autógenos pois apresentam a capacidade de induzir a diferenciação de células-tronco em células de linhagem osteogênica. Os fosfatos de cálcio bifásicos (BCPs), são constituídos por hidroxiapatita (HAp - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e β -fosfato tricálcico (β -TCP - $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$). Os BCPs, em diferentes composições de fase, têm sido estudados com o intuito de potencializar a osteoindução intrínseca (sem o uso de células ou fatores de crescimento) dos materiais obtidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade osteoindutora de materiais a base de fosfato de cálcio obtidos de ossos de peixe (BCP e do BCP/ Nb_2O_5), por meio de sua implantação em sítio subcutâneo (SC) e subfascial (SF) de ratos, sem a adição de fatores de crescimento ou de células osteogênicas. Arcabouços macroporosos de BCP e de BCP/ Nb_2O_5 , no formato de discos, com 5 mm de diâmetro e 1 mm de altura foram implantados em sítio subcutâneo ou em sítio subfascial, em ratos Wistar adultos machos. Após um período de 15, 45 ou 60 dias as amostras foram coletadas e processadas para (1) inclusão em parafina e coloração com H&E, Azan ou imunocoradas para osteocalcina, e (2) análise em microscopia eletrônica de Varredura (MEV). A porosidade dos materiais foi mensurada pelo método de Arquimedes. Análises físico-químicas foram realizadas por difração de Raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia micro-Raman e MEV associada a espectroscopia por energia dispersiva (EDS). Os resultados mostraram que a porosidade dos discos de BCP era de 58% e 59% para o BCP/ Nb_2O_5 . O BCP era constituído de 88,79% de HAp e 11,21% de β -TCP, enquanto o BCP/ Nb_2O_5 apresenta as seguintes fases: fersmita, óxido de fósforo nióbio e β -TCP (34,05%). Os poros apresentaram interconectividade. A análise histológica mostrou que ambos os materiais foram permeados por tecido conjuntivo frouxo intensamente vascularizado. Houve a deposição de uma matriz de colágeno semelhante à matriz óssea, adjacente aos vasos sanguíneos, e a deposição de íons cálcio e fósforo sobre esta matriz. Concluímos que os materiais induziram a formação de uma matriz semelhante ao osso, com íons cálcio e fósforo em sua composição.

Palavras-chave: Pentóxido de nióbio. Fosfato de cálcio bifásico. Osteoindução. Subcutâneo. Subfascial.

ABSTRACT

Osteoinductive biomaterials represent an alternative to overcome the drawbacks of tissue engineering and autogenous grafts as they have the ability to induce differentiation of stem cells into osteogenic lineage cells. The biphasic calcium phosphates (BCPs) are composed of hydroxyapatite (HAp - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) and β -tricalcium phosphate (β -TCP - $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$). BCPs, in different phase compositions, have been studied in order to potentiate the intrinsic osteoinduction (without the use of cells or growth factors) of the obtained materials. The objective of this work was to evaluate the osteoinductive capacity of calcium phosphate based materials obtained from fish bones (BCP and BCP/ Nb_2O_5) by subcutaneous (SC) and subfascial (SF) implantation of rats, without the addition of growth factors or osteogenic cells. Macroporous BCP and BCP/ Nb_2O_5 , in a disk format, 5 mm in diameter and 1 mm in height were implanted subcutaneously or subfascially in male Wistar rats. After a period of 15, 45 or 60 days the samples were collected and processed for (1) inclusion in paraffin and staining with H&E, Azan or immunostained for osteocalcin, and (2) Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis. The porosity of the materials was measured by the Archimedes method. Physical-chemical analyzes were performed by X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), micro-Raman spectroscopy and SEM with dispersive energy spectroscopy (EDS). The results showed that the porosity of BCP discs was 58% and 59% for BCP/ Nb_2O_5 . BCP was composed of 88.79% HAp and 11.21% β -TCP, whereas BCP/ Nb_2O_5 had the following phases: fersmite, niobium phosphorus oxide and β -TCP (34.05%). The pores showed interconnectivity. Histological analysis showed that both materials were permeated by severely vascularized loose connective tissue. There was deposition of a collagen matrix similar to the bone matrix, adjacent to the blood vessels, and the deposition of calcium and phosphorus ions on this matrix. We conclude that the materials induced the formation of a matrix similar to bone, with calcium and phosphorus ions in its composition.

Keywords: Niobium pentoxide. Biphasic calcium phosphate. Osteoinduction. Subcutaneous. Subfascial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Procedimento cirúrgico realizado em ratos Wistar.....	11
Figura 2 – Eletromicrografia de varredura do BCP e do BCP/Nb ₂ O ₅ antes da implantação dos materiais.....	13
Figura 3 – Análise química utilizando a Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia EDS na superfície do BCP e do BCP/Nb ₂ O ₅	14
Figura 4 – Difratoograma de Raios X do BCP e do BCP/Nb ₂ O ₅ antes dos materiais serem implantados.....	15
Figura 5 – Espectros FTIR do BCP e do BCP/Nb ₂ O ₅ antes da implantação.....	16
Figura 6 – Espectros micro-Raman do BCP e do BCP/Nb ₂ O ₅ antes da implantação.....	17
Figura 7 – Fotomicrografia do BCP e do BCP/Nb ₂ O ₅ em sítio subcutâneo após 15 dias da cirurgia.....	20
Figura 8 – Fotomicrografia do BCP e do BCP/Nb ₂ O ₅ em sítio subcutâneo após 45 e 60 dias de implantação.....	21
Figura 9 – Fotomicrografia do BCP e do BCP/Nb ₂ O ₅ em sítio subfascial após 15 dias do implante dos materiais.....	23
Figura 10 – Fotomicrografia do BCP e do BCP/Nb ₂ O ₅ em sítio subfascial após 45 e 60 dias da cirurgia de implante.....	25
Figura 11 – Fotomicrografia do BCP implantado no subcutâneo de ratos e analisado após 15 dias por meio da imunocoloração para a osteocalcina.....	27
Figura 12 – Espectros EDS obtidos a partir da eletromicrografia do BCP após 45 dias de implantação.....	28

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

<i>Ad libitum</i>	Sem restrição
BCP	Fosfato de cálcio bifásico
BCP/Nb ₂ O ₅	Fosfato de cálcio bifásico reforçado por pentóxido de nióbio
BMP	Proteína morfogenética do osso
β-TCP	Beta fosfato tricálcico
CaP	Fosfato de cálcio
CBMM	Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração
CGM	Célula gigante multinucleada
CHA	Hidroxiapatita carbonatada
cm	Centímetro
DRX	Difração de Raios X
EDS	Espectroscopia de Raios X por dispersão de energia
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
g	Grama
h	Hora
HAp	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina e eosina
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
Kg	Quilograma
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mW	Miliwatt
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
®	Marca registrada
rpm	Rotações por minuto
SBF	Fluido corpóreo simulado
Torr	Torricelli
μm	Micrômetro
λ	Comprimento de onda

CONTEXTUALIZAÇÃO

A busca por biomateriais que apresentem características adequadas para substituir os enxertos ósseos autógenos tem sido enorme nos últimos anos e seu interesse se justifica pelo fato de milhões de pessoas serem salvas ou obterem uma melhor qualidade de vida, como, por exemplo, no reparo de fraturas ósseas (VALLET-REGÍ e SALINAS, 2019). Para que isso aconteça, o desenvolvimento de novas tecnologias em termos da obtenção de materiais e sua utilização clínica é um campo em constante evolução e direciona as pesquisas atuais de forma multidisciplinar. Assim, é muito importante a avaliação dos aspectos físico-químicos, macroscópicos e microscópicos, além de correlacionar estas características com a resposta do organismo para a finalidade proposta. É neste complexo contexto que a área da engenharia de biomateriais tem ganhado destaque para restabelecer a saúde aos pacientes.

Engenharia de biomateriais

O termo biomaterial pode ser definido como qualquer material sintético ou natural que desempenha uma função terapêutica ou de diagnóstico, quando em contato com sistemas biológicos. A utilização dos biomateriais se direciona, principalmente, para a área médica e odontológica, mas eles podem ser associados com outras áreas como (1) o crescimento de células em cultura, (2) os ensaios para analisar proteínas sanguíneas em laboratórios de análises clínicas, (3) o desenvolvimento de equipamentos para o processamento biomolecular com foco em aplicações para biotecnologia, (4) a criação e desenvolvimento de implantes para regular hormônios e aumentar a fertilidade, entre outras aplicações (RATNER *et al.*, 2013).

A engenharia de biomateriais é o desenvolvimento da forma mais adequada e eficiente de relacionar o material com cultura de células ou com os sistemas orgânicos a fim de promover ou aumentar a utilização dos dispositivos desenvolvidos para substituir ou regenerar regiões do corpo humano bem diversificadas. Em ortopedia e odontologia, a engenharia tecidual óssea procura relacionar diversos materiais que podem funcionar como uma matriz tridimensional a fim de guiar a adesão, a diferenciação e a proliferação celular para, posteriormente, permitir a regeneração óssea (GAO *et al.*, 2014).

Neste contexto, o mercado mundial relacionado com a aplicação ortopédica e odontológica das biocerâmicas foi de aproximadamente US\$ 47,7 bilhões no mundo em 2015, com um crescimento projetado para 2024 no valor de aproximadamente 68,7 bilhões de dólares (MEDTECH, 2018; RODRIGUEZ, LARA-PADILHA e DEAN, 2018).

Os biomateriais podem ser divididos em materiais metálicos, as ligas metálicas, os polímeros, as cerâmicas, os biovidros e diversas associações entre estes materiais na busca de um material ideal. Entretanto, a variabilidade destes materiais está diretamente proporcional a diversidade de tecidos e doenças que se busca tratar e, muitas vezes, o estudo de um biomaterial não pode ser separado da sua aplicação clínica (MURPHY, BLACK e HASTINGS, 2016). Assim, as condições musculoesqueléticas afetaram cerca de 126 milhões de adultos em 2012, somente nos EUA (GONZALEZ-FERNANDEZ, SIKORSKI e LEACH, 2019), mostrando a importância desta área de aplicação e dos materiais relacionados.

Dentre todos os materiais, as cerâmicas merecem destaque devido ao grande avanço em seu desenvolvimento para a utilização no reparo ou reconstrução do osso. Elas podem ser classificadas, de acordo com a forma de interação com o hospedeiro, em “bioinerte” ou “bioativa”, sendo que as últimas são divididas em reabsorvíveis ou não-reabsorvíveis. Elas podem ser utilizadas na forma de materiais com microporosidades (bulk), com macroporos, em grânulos ou como material de revestimento (BEST *et al.*, 2008).

Assim, a engenharia de tecidos busca associar as características positivas das cerâmicas em diversas abordagens a fim de promover uma melhor resposta em termos de regeneração do tecido ósseo por parte destes materiais. Entre estas abordagens podemos destacar a utilização de células osteogênicas associadas às cerâmicas (QI *et al.*, 2016) ou a adição de fatores de crescimento como as mais utilizadas (YUAN *et al.*, 2006b; ISHACK *et al.*, 2017).

Materiais a base de fosfato de cálcio

Dentre os diferentes tipos de cerâmica, os materiais a base de fosfato de cálcio (CaP) merecem destaque como substituto ósseo, principalmente a associação da hidroxiapatita (HAp) e do β -fosfato tricálcico (β -*Tricalcium Phosphate* – β -TCP),

formando um compósito que apresenta duas fases, conhecido como fosfato de cálcio bifásico (*Biphasic Calcium Phosphate – BCP*) (HABIBOVIC *et al.*, 2008). Este material é biocompatível e osteocondutor, ou seja, possui a capacidade de guiar o crescimento ósseo em sua superfície. Além disso, ele apresenta bioatividade, é um material biodegradável, permite a adesão de proteínas e pode ser confeccionado com poros interconectados por meio de uma substância que funciona como um espaçador (LEGEROS, 2002). Todavia, mesmo com todas estas características desejáveis, os biomateriais, a base de fosfato de cálcio, apresentam uma baixa resistência a fratura e não são adequados para serem utilizados em áreas nas quais o esforço mecânico é frequente (JARCHO, 1981; DE GROOT, 1984; AOKI, 1994).

De acordo com Legeros (2008), as apatitas que são identificadas na natureza deveriam ser consideradas como hidroxiapatitas carbonatadas (CHA), cuja fórmula química aproximada é $(Ca,Na,Mg)_{10}(PO_4,HPO_4,CO_3)_6(OH,Cl,F)_2$. Ao se comparar com a hidroxiapatita pura (HAp), $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, fica evidente a grande variabilidade de apatitas existentes. Quando o osso é analisado, ele pode ser caracterizado como um fosfato de cálcio na forma de nanocristais de apatita carbonatada (LEGEROS, 2002).

Com a finalidade de realizar a avaliação *in vitro* de um material em termos de potencial para formar tecido ósseo em sua superfície, a imersão do material geralmente é realizada em fluido corpóreo simulado (*Simulated Body Fluid – SBF*). Se a bioatividade for confirmada *in vitro*, ela é previsível *in vivo* (KOKUBO e TAKADAMA, 2006). A formação de CHA *in vitro* ocorre por meio de um processo de precipitação que pode ser evidenciado pela captação de íons presentes no SBF. Quando isto ocorre em sítios ortotópicos ou ectópicos, as células devem participar do processo de dissolução e/ou precipitação do material implantado (LEGEROS e DACULSI, 1990). Desta forma, a atividade celular mediada por macrófagos ou osteoclastos e o pH ácido do meio resulta em uma dissolução parcial das cerâmicas a base de fosfato de cálcio que resulta na liberação de íons cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (HPO_4^{3-} , PO_4^{3-}). Isto provoca uma supersaturação no fluido e causa a precipitação da CHA. A concentração de CHA na superfície do material está relacionada com a capacidade de dissolução das cerâmicas bifásicas, quanto menor a razão Hap/ β -TCP, maior será a quantidade de TCP e, como consequência, maior é a formação de CHA na superfície do material (LEGEROS, 2008).

Osteoindução

A osteoindução é a capacidade que um tecido ou material tem de promover a diferenciação de células mesenquimais em células osteogênicas e como resultado disso, iniciar a produção de tecido ósseo numa localização diferente da esperada. Esta análise normalmente é realizada em sítio ectópico (SCOTT *et al.*, 2012).

O processo de osteogênese ectópica depende de vários fatores, dentre eles a espécie animal utilizada. Isso fica evidente ao analisarmos o estudo de Yang e colaboradores (1996), que implantaram materiais cerâmicos de Ca-P, com poros, em diferentes espécies por 120 dias e observaram formação de osso ectópico em cachorros e porcos, o que não ocorreu em cabras, ratos e coelhos. Os autores relatam que a osteoindução depende tanto da espécie animal como do tipo de cerâmica (YANG, *et al.*, 1996).

A avaliação da formação óssea em cerâmicas bifásicas e hidroxiapatitas implantadas em músculos de cães mostra que o processo segue uma sequência de etapas que incluem a adesão de células na parede dos poros, proliferação e diferenciação celular nos poros, formação de matriz óssea por meio de células semelhantes aos osteoblastos, mineralização da matriz óssea na superfície dos poros, remodelação óssea, formação de medula óssea e, finalmente, a formação de osso maduro. Entretanto, todas estas etapas aconteceram primeiramente no material bifásico quando se comparou com a hidroxiapatita pura (YUAN *et al.*, 2006b).

Segundo alguns autores, a osteoindução pode ser observada em primatas, cães, porcos, cabras, coelhos e camundongos (RIPAMONTI, 1991; RIPAMONTI, 1996; YANG *et al.*, 1997; YUAN *et al.*, 2002; YUAN *et al.*, 2006a; YE *et al.*, 2007; KASTEN *et al.*, 2008; LE NIHOANNEN *et al.*, 2008) e com menor frequência, em ratos (YANG *et al.*, 1996). Além disso, a formação óssea ectópica pode estar relacionada com o tempo de observação do estudo (BARRADAS *et al.*, 2011). Neste contexto, o estudo de Ripamonti e colaboradores (2009) mostraram que após 90 dias de implantação não ocorreu a formação óssea ectópica em sítio intramuscular em nenhum dos materiais avaliados, contudo, após 365 dias de observação, todas as cerâmicas exibiram formação óssea ectópica (RIPAMONTI *et al.*, 2009).

Osteoindução intrínseca

Os materiais cerâmicos possuem características de osteocondução bem relatadas na literatura (ZHANG *et al.*, 2017). Entretanto, quando se analisa o processo de osteoindução, isso não é evidente. Todavia, existem alguns materiais que auxiliam a formação de tecido ósseo em sítios ectópicos sem a adição de fatores osteogênicos, como a hidroxiapatita sintética porosa, hidroxiapatita obtida a partir de corais, β -TCP, material bifásico poroso, além do fosfato de octacálcio como material de revestimento sobre ligas de titânio (LEGEROS, 2008). Pelo fato destes materiais exibirem certo grau de indução óssea, tem sido proposto que são materiais osteoindutores “intrínsecos”. Esta característica pode ser atribuída a topografia, geometria, composição, tamanho dos poros e a porcentagem de porosidade do material que, provavelmente, permitem a retenção e a concentração de fatores de crescimento ósseo circulantes e de células osteoprogenitoras permitindo a formação óssea por indução (LEGEROS, 2008).

Além dos fatores topográficos, o material osteoindutor deve permitir a formação da camada de hidroxiapatita carbonatada (CHA) em sua superfície após a implantação em sítio ectópico, permitindo a adesão de proteínas sobre as quais as células osteoprogenitoras podem se conectar, proliferar, diferenciar e produzir matriz extracelular que, eventualmente, leva a biomineralização ou formação de osso.

É importante ressaltar que as hidroxiapatitas podem funcionar como material osteoindutor pelo fato de agir como uma “esponja” que absorve os fatores de crescimento do organismo, situação bem distinta dos materiais ditos osteoindutores. Neste tipo de material que apresenta a osteoindução intrínseca, os materiais, como por exemplo a matriz óssea desmineralizada e os enxertos autógenos ou alógenos, possuem os fatores osteogênicos intrinsecamente e, posteriormente, liberam no interior do organismo e promove a formação de tecido ósseo (LEGEROS, 2008).

Osteoindução programada

Os materiais a base de fosfato de cálcio, independentemente das características físicas macro e microscópicas, quando associados às células osteoprogenitoras (células-tronco, células da medula óssea, células da polpa dentária ou condrócitos), aos fatores de crescimento ósseo (BMPs), às proteínas bioativas (colágeno, fibrina) ou a alguns tipos de

peptídeos (normalmente fragmentos de aminoácidos estruturais da sialoproteína óssea) aumentam a capacidade do material de formar osso. A lógica no processo de engenharia de biomateriais para aumentar a formação de tecido ósseo recai no aumento da adesão de células, diferenciação, formação de matriz e biomineralização.

No caso das cerâmicas bifásicas, a relação HAp/ β -TCP pode interferir na quantidade de formação de osso. Desta forma, quando se compara materiais com diferentes relações entre a HAp e o β -TCP, os materiais que apresentam 20%/80% de relação HAp/ β -TCP produzem mais osso que os de 60%/40%, que é maior em comparação com a hidroxiapatita pura ou com o β -TCP puro (LIVINGSTON *et al.*, 2004; ARINZEH *et al.*, 2005).

A cascata de formação óssea associada com as Proteínas Morfogenéticas do Osso (*Bone Morphogenetic Protein* – BMP) pode ser resumida da seguinte maneira: I. Quimiotaxia¹ de células mesenquimais indiferenciadas; II. Proliferação e diferenciação celular em condroblastos e condrócitos; III. Formação de matriz extracelular cartilaginosa; IV. Maturação e subsequente mineralização de condrócitos hipertróficos; V. Remoção da cartilagem calcificada pelos osteoclastos; VI. Produção de matriz óssea pelos osteoblastos; VII. Remodelação óssea (WOZNEY e ROSEN, 1998; DE BRUIJN *et al.*, 2008).

O processo de degradação é bem diferente entre o β -TCP e a hidroxiapatita. Diversos estudos mostram que o TCP se degrada numa velocidade maior do que a hidroxiapatita (HOLLINGER e BATTESTONE, 1980; KLEIN *et al.*, 1983; SHIMAZAKI e MOONEY, 1985; YAMAMURO, HENCH e WILSON, 1993; KURASHINA *et al.*, 2002). Este processo de degradação é um fator que deve ser considerado no processo de formação óssea ectópica pois permite a liberação de íons cálcio e fosfato para o meio (FRAYSSINT *et al.*, 1993; YUAN *et al.*, 1998). Neste contexto, o TCP apresenta uma maior taxa de dissolução que a hidroxiapatita (LEGEROS *et al.*, 2003; SCHOPPER *et al.*, 2005) e em concentrações específicas, o cálcio e o fosfato podem promover a mineralização de células ósseas (CHANG, STANFORD e KELLER, 2000). É importante que o material mantenha a estrutura tridimensional durante o reparo. Ripamonti (1996) implantou, em sítio ectópico, blocos porosos de hidroxiapatita e

¹ Locomoção celular orientada e unidirecional ao longo de um gradiente químico, causado pela diferença de concentração de determinadas substâncias denominadas quimiotratores ou agentes quimiotáticos, que podem ser liberadas por tecidos lesados, geradas por sistemas enzimáticos presentes no plasma, formadas durante reações imunes ou liberadas por microrganismos.

hidroxiapatita porosa na forma de grânulos. Após avaliar os dois materiais, constatou que ocorreu formação óssea ectópica apenas nos blocos porosos de hidroxiapatita. Em outro estudo os autores identificaram osso formado em sítio ectópico apenas no interior dos poros (KURASHINA *et al.*, 2002).

Diâmetro e distribuição dos poros

As cerâmicas a base de fosfato de cálcio apresentam alguns inconvenientes para a utilização na clínica, sendo que de uma maneira geral, elas mostram uma baixa taxa de reabsorção, principalmente quando se avaliar os materiais na forma de *bulk*, ou seja, na forma densa. Para contornar este problema, modificações na composição química associadas a incorporação de porosidade pode ser uma boa estratégia (MANGANO *et al.*, 2015). Além disso, a presença e a distribuição de uma rede de poros interconectada, com dimensões adequadas para permitir a migração celular, a angiogênese, além da troca de fluidos para que possa ocorrer a eliminação dos produtos resultantes do metabolismo celular no interior do material são características importantes para o biomaterial (JONES *et al.*, 2009).

Entretanto, não existe um consenso sobre o melhor tipo de porosidade dos materiais cerâmicos. A qualidade do osso formado e a velocidade que isso ocorre pode estar relacionado a diversos aspectos dependentes, como por exemplo o tamanho do poro, fração do volume da porosidade, tamanho da interconectividade dos poros e a densidade da interconectividade que, em última instância, caracterizam a permeabilidade estrutural e mecânica do material (HING, 2005). Somado aos aspectos anteriormente listados, a microestrutura de suporte e a geometria dos poros foram consideradas como muito importantes para que o material possa permitir o “aprisionamento” e recrutamento de fatores de crescimento e das proteínas da matriz (HING, 2005). No que diz respeito ao tamanho dos poros, não existe um consenso, mas alguns autores afirmam que ele deve ter um tamanho entre 50 e 400 μm (SANZANA *et al.*, 2013). Existem trabalhos que afirmam que os poros poderiam ter um diâmetro mínimo de 50 μm quando se utiliza implantes de hidroxiapatita ou β -TCP (LU *et al.*, 1999), enquanto outros estudos restringem os valores a intervalos ligeiramente maiores, com poros variando entre 100 a 135 μm para permitir uma maior taxa de penetração de tecido ósseo em implantes de polietileno (KLAWITTER *et al.*, 1976).

Pelo fato de existir uma grande divergência na literatura com relação ao tamanho do poro, alguns autores parecem preconizar que o tamanho dos poros não é o fator que controla a quantidade de osso formado e, sim, a interconectividade dos poros que está relacionada, normalmente, com o tamanho dos poros, mas, também, com a extensão desta porosidade, como sendo o ponto principal em termos da velocidade e manutenção da formação de tecido ósseo para o interior do biomaterial (HING *et al.*, 2004). Esta característica foi demonstrada quando se implantou cilindros de Hidroxiapatita e β -TCP com poros bem conectados de 50 a 100 μm e comparados com os mesmos materiais, mas com menor interconectividade entre os poros de 200 a 400 μm , utilizando o modelo em coelhos. Estes autores demonstraram que a primeira conformação aumentou a integração entre o tecido ósseo e os implantes em comparação com a segunda arquitetura (EGGLI, MULLER e SCHENK, 1988).

Para os materiais na forma de arca-bouço não reabsorvível existe um consenso geral que a porosidade deve ter um limite de até 60% para que ocorra a formação de osso entre a periferia e as regiões mais centrais (HING, BEST e BONFIELD, 1999; LI *et al.*, 2003) que pode ser explicado pois no caso de porosidade abaixo de 60% a taxa resultante no tamanho e na frequência das interconexões dos poros fica bem pequena, comprometendo a quantidade de osso formado (BOHNER e BAUMGART, 2004). Este aspecto deixa de ter tanta importância no caso de materiais reabsorvíveis pois eles se apresentam, com o passar do tempo, mais “abertos”, demonstrando que a taxa de porosidade neste tipo de material pode ser menor e, mesmo assim, não existe comprometimento na proliferação de vasos sanguíneos para o interior do material e nem mesmo na quantidade de osso formada (HING, 2005). Além da macroporosidade, outro aspecto importante na formação de osso associada aos biomateriais é a microporosidade, principalmente com o formato das concavidades superficiais dos biomateriais. Isso foi demonstrado utilizando técnica de imunolocalização para a BMP-3 e BMP-7 e ficou demonstrado uma maior concentração desses fatores de crescimento dentro dessas concavidades superficiais, o que favoreceria a formação de tecido ósseo adjacente aos biomateriais (RIPAMONTI, VAN DEN HEEVER e VAN WYK, 1993; RIPAMONTI, 1996; KUBOKI *et al.*, 1998).

Modelos para avaliação ectópica

A palavra “ectópico” vem originalmente da palavra grega *ektopos* ou "fora do lugar" e osso ectópico se refere à ossificação fora do seu local de origem. A formação de osso ectópico é mais frequentemente induzida experimentalmente, mas também tem relevância clínica em algumas situações, como nos casos de malformação congênita (SINGH e VERMA, 2011) ou em complicação de paraplegia (FURMAN, NICHOLAS e JIVOFF, 1970). Nestes casos, os sítios de formação óssea são chamados heterotópicos (SCOTT *et al.*, 2012).

A indução experimental de ossificação ectópica pode ser feita em músculo, no tecido subcutâneo ou ainda na cápsula renal (SCOTT *et al.*, 2012). Os modelos de formação de osso ectópico reduzem o número de variáveis envolvidas na formação óssea, eliminando (ou reduzindo) os efeitos da estimulação por citocinas, por células osteogênicas e células tronco endógenas e, ainda, evitando a mecanotransdução potencialmente estimulada pelo osso e, portanto, favorecem o estudo do efeito osteoindutor de biomateriais (SCOTT *et al.*, 2012).

O modelo de implante subcutâneo é o mais simples, entretanto tem capacidade inferior de formação óssea em relação a outros modelos, o que pode ser atribuído principalmente à pobre vascularização. Comumente requer adição de células mesenquimais e a suplementação com citocinas ou modificações moleculares (DRAGOO *et al.*, 2005; LEVI *et al.*, 2011). Outra consideração para a formação óssea subcutânea é que não existe grande concentração de células-tronco com potencial para formar osso no interior do ambiente intradérmico (SCOTT *et al.*, 2012).

Portanto, da mesma forma que a engenharia de tecidos progride com a descoberta de novos materiais e com o uso de células osteogênicas progenitoras, os modelos de ossificação ectópica tornam-se cada vez mais comuns, contribuindo para a otimização da formação óssea. A compreensão da biologia da formação do osso ectópico pode ainda facilitar o avanço nos tratamentos das debilidades, como o osso heterotópico.

Compósito bifásico a base de hidroxiapatita originada de ossos de peixe

Existem diversos métodos para se obter a hidroxiapatita pura como a mecanossíntese, o processo hidrotermal, o do sol-gel entre outros. Entretanto, todos estes métodos necessitam de equipamentos dispendiosos ou do controle rigoroso das condições

necessárias para a obtenção do material. O BCP utilizado como precursor neste estudo foi obtido a partir da calcinação *in natura* de ossos de peixe a uma temperatura de 900 °C e pressão ambiente (BONADIO, 2014). Além disso, para confeccionar um composto bifásico macroporoso, partículas de lactose com diâmetro de 150 a 250 µm foram utilizadas como elemento espaçador.

Entretanto, a cerâmica bifásica apresenta uma resistência diminuída e, como consequência, limitar sua utilização para regiões submetidas a menor estresse mecânico (BADR-MOHAMMADI, HESARAKI e ZAMANIAN, 2014). Desta forma, o pentóxido de nióbio pode ser incorporado à cerâmica por meio da metalurgia do pó (WEINAND, 2009; BONADIO, 2014). Neste processo, a cerâmica bifásica e o pentóxido de nióbio são homogeneizados e, posteriormente, moídos em moinho de alta energia. Este processo facilita a ocorrência de reações de estado sólido, estimulando as transições de fase para que ocorra a formação dos compósitos (NASCIMENTO, 2009; RODRIGUES, 2009). Neste contexto, o reforço da cerâmica bifásica por pentóxido de nióbio aumenta a resistência do material obtido e de acordo com trabalhos realizados no Departamento de Física e no Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá, pode-se concluir que os biomateriais utilizados nestes estudos apresentam características de biocompatibilidade, osteocondução e, além disso, indícios de serem osteoindutores. O presente trabalho procurou avaliar o aspecto osteoindutor tanto da cerâmica bifásica, como dela reforçada por pentóxido de nióbio em dois sítios ectópicos para a formação óssea: sítio subcutâneo e sítio subfascial. Os detalhes do estudo serão apresentados nas sessões seguintes.

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS	ix
CONTEXTUALIZAÇÃO	x
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVO.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	5
3.1. Materiais precursores	6
<i>Cerâmica bifásica BCP</i>	<i>6</i>
<i>Pentóxido de nióbio (Nb₂O₅)</i>	<i>6</i>
<i>Compósito BCP/Nb₂O₅</i>	<i>6</i>
<i>Preparação dos “scaffolds” de BCP e do BCP/Nb₂O₅</i>	<i>7</i>
3.2. Análise da porosidade (Princípio de Arquimedes)	7
3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS).....	8
3.4. Difração de Raios X (DRX)	8
3.5. Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-PAS)....	9
3.6. Espectroscopia micro-Raman	9
3.7. Estudo <i>in vivo</i>.....	9
<i>Procedimento experimental para o implante subcutâneo e subfascial</i>	<i>10</i>
4. RESULTADOS.....	13
4.1. Porosidade (Método de Arquimedes)	13
4.2. MEV-EDS.....	13
4.3. Difração de Raios X (DRX)	15
4.4. Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	16
4.5. Espectroscopia micro-Raman	17
4.6. Estudo <i>in vivo</i>.....	18
<i>Avaliação clínica</i>	<i>18</i>
<i>Estudo histológico</i>	<i>18</i>
<i>Implantes subcutâneos.....</i>	<i>18</i>
<i>Implante subfascial.....</i>	<i>22</i>
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO	35
ANEXOS	50

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido dinâmico, com capacidade de auto regeneração em casos de injúrias de pequena extensão, com o reestabelecimento da sua arquitetura original. Contudo, grandes defeitos ósseos não se regeneram espontaneamente e representam um desafio clínico maior nas cirurgias ortopédicas e craniomaxilofaciais (VISSER *et al.*, 2017).

Para que ocorra a regeneração de defeitos ósseos de maior extensão faz-se necessário algum tipo de preenchimento que promova suporte mecânico e seja capaz de induzir a regeneração óssea. O osso autógeno ou auto-enxerto ainda é considerado o "padrão ouro" sendo o mais efetivo método para a regeneração óssea, porém apresenta desvantagens como suprimento limitado de osso e a morbidade do sítio doador (BOULER *et al.*, 2017). Os substitutos ósseos constituem uma alternativa para os enxertos autógenos (KHAN, TOMIN e LANE, 2000; MANGANO *et al.*, 2015; JORDANA *et al.*, 2017).

Nas últimas décadas, a engenharia de tecidos e a medicina regenerativa surgiram como estratégias promissoras para a reconstituição óssea (HABIBOVIC *et al.*, 2005; BARRADAS *et al.*, 2011; CHAI *et al.*, 2012; SAMAVEDI *et al.*, 2013) devido a uma demanda cada vez maior por transplantes de órgãos e, ao mesmo tempo, a uma grave escassez de disponibilidade de doadores (KHAN, TOMIN e LANE, 2000; MIRON e ZHANG, 2012). A engenharia de tecidos promove o desenvolvimento de estruturas projetadas por meio da combinação de arcabouços macroporosos, células e/ou fatores mecânicos/solúveis (ROSETI *et al.*, 2017). Entretanto, o uso de células mesenquimais pode apresentar limitações relacionadas com a perda do potencial de diferenciação, durante sua expansão *in vitro* e baixa taxa proliferativa. Quando se utilizam fatores de crescimento, são necessárias altas concentrações para a obtenção de resultados clínicos, apresentam instabilidade, alto custo, podem desencadear efeitos colaterais relacionados à produção de osso em locais indesejáveis e reações imunológicas (ROSE e OREFFO, 2002; PENG *et al.*, 2005; ARAVAMUDHAN *et al.*, 2013; SEGAR, OGLE e BOTCHWEY, 2013).

Os biomateriais osteoindutores representam uma alternativa para contornar as desvantagens da engenharia de tecidos e dos enxertos autógenos (HABIBOVIC e DE GROOT, 2007; YUAN *et al.*, 2010), pois apresentam a capacidade de induzir a diferenciação de células-tronco em células de linhagem osteogênica (HABIBOVIC e DE GROOT, 2007) aumentando a velocidade de formação óssea em pequenos defeitos,

estimulando a formação óssea nas margens de defeitos ósseos de maior extensão e induzindo a diferenciação de células para a formação de osso a distância, promovendo uma regeneração óssea mais rápida (YANG *et al.*, 1996; YUAN *et al.*, 2006b; HABIBOVIC e DE GROOT, 2007).

Para que a osteoindução ocorra é necessário que o material seja capaz de (1) recrutar células mesenquimais osteoprogenitoras, (2) induzir as células mesenquimais a se diferenciarem em osteoblastos maduros e ainda (3) deve ser capaz de induzir o crescimento ósseo quando implantado em sítios ectópicos (MIRON e ZHANG, 2012). Nas últimas décadas, um grande número de publicações tem demonstrado a capacidade osteoindutora das cerâmicas a base de fosfato de cálcio (HABIBOVIC e DE GROOT, 2007; CHENG *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2017). Este material se destaca devido sua biocompatibilidade, ser osteocondutor (TANG *et al.*, 2017) e pode ser elaborado com características morfológicas que favoreçam a osteoindução, como a presença de uma estrutura macroporosa, uma superfície com microporos e a comunicação entre os poros (HABIBOVIC *et al.*, 2005). A composição de fase e a solubilidade do biomaterial são características igualmente importantes para que seja osteoindutor (BARRADAS *et al.*, 2011; CHAI *et al.*, 2012; SAMAVEDI *et al.*, 2013).

Os fosfatos de cálcio bifásicos, (BCPs), obtidos de forma natural ou sintética, são constituídos por hidroxiapatita (HAp - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e β -fosfato tricálcico (β -TCP - $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$). Os BCPs, em diferentes composições de fase, têm sido estudados com o intuito de potencializar a osteoindução intrínseca (sem o uso de células ou fatores de crescimento) dos materiais obtidos (BARRADAS *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014b). A porcentagem de HAp e de β -TCP podem ser diferentes entre os materiais e provoca respostas biológicas diferentes após sua implantação *in vivo* (OWEN, DARD e LARJAVA, 2018; TANG *et al.*, 2018). Quando se relaciona a solubilidade dos materiais com a osteoindução, as cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio demonstram maior capacidade osteoindutora que a HAp e o β -TCP utilizados isoladamente (WANG *et al.*, 2014a). Isso ocorre por que a HAp apresenta uma baixa taxa de solubilidade e, como consequência, uma pequena concentração iônica (Ca^{+2} e PO_4^{-3}) na região, dificultando a osteoindução; já o β -TCP, isoladamente, possui uma alta taxa de solubilidade que promove a destruição da estrutura porosa do material, diminuindo o substrato sobre o qual o osso poderia ser formado, durante o tempo desejado para a osteoindução (YUAN *et al.*, 2001). Quando se utiliza os materiais bifásicos ocorre um aumento na concentração iônica local via dissolução e/ou atividade celular e, ao mesmo

tempo, a arquitetura dos *scaffolds* é mantida, favorecendo a osteoindução (BOULER *et al.*, 2017).

A melhor forma de avaliar o potencial osteoindutor dos biomateriais é por meio de implantes em sítios ectópicos (BARRADAS *et al.*, 2011). Esta metodologia permite afirmar que a origem do osso *de novo* é atribuída somente à sua propriedade osteoindutora, eliminando, assim, um eventual processo de osteocondução, caso o material fosse implantado em um sítio ortotópico, que seria o local de implantação onde naturalmente se espera que a formação óssea aconteça (DAVIES e HOSSEINI, 2000). O modelo ectópico permite reduzir o estímulo das citocinas ósseas, minimiza a possibilidade de interação celular com as células formadoras de osso e com as células-tronco endógenas, além de diminuir a possibilidade de ocorrer a formação de osso por meio da mecanotransdução permitindo, desta forma, que se tenha um modelo experimental de formação óssea *in vivo* relativamente controlado (SCOTT *et al.*, 2012).

O tecido subcutâneo e o tecido intramuscular são sítios ectópicos frequentemente usados para avaliar o potencial osteoindutor dos materiais (HEINEN JR, DABBS e MASON, 1949; WLODARSKI e REDDI, 1986). O sítio intramuscular normalmente demonstra maior potencial osteogênico em comparação com o tecido subcutâneo (YANG *et al.*, 1996; HABIBOVIC e DE GROOT, 2007) pois possui células-satélites e maior fluxo sanguíneo (SCOTT *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2015).

Apesar de exibirem propriedades químicas adequadas, a hidroxiapatita, o β -TCP ou o BCP apresentam uma baixa resistência mecânica e são indicados para aplicações clínicas que não exijam grandes esforços mecânicos (BADR-MOHAMMADI, HESARAKI e ZAMANIAN, 2014). Todavia, tais materiais podem ser reforçados com outros elementos, como o estrôncio, o magnésio, o zinco (COX *et al.*, 2014) ou o nióbio (TAMAI *et al.*, 2007; OBATA *et al.*, 2012; DA ROCHA, DE ANDRADE e DA SILVA, 2013). A adição destes elementos na estrutura das cerâmicas de fosfato de cálcio melhora as propriedades estruturais, a estabilidade térmica, as propriedades mecânicas e a carga elétrica de superfície, quando expostos às condições fisiológicas (CAPANEMA *et al.*, 2015). O nióbio, na forma de pentóxido de nióbio (Nb_2O_5), aumenta as propriedades biológicas dos materiais e pode ser associado às ligas de titânio para implantes, devido sua biocompatibilidade, alto grau de resistência mecânica, baixa corrosão e desintegração (CHALLA, MALI e MISRA, 2013). Há estudos *in vitro* demonstrando sua ação estimuladora sobre a função de osteoblastos humanos (YAMAMOTO, HONNA e SUMITA, 1998; TAMAI *et al.*, 2007).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado as propriedades biológicas do BCP extraído de ossos de peixe, na forma pura ou enriquecida por pentóxido de nióbio (BCP/Nb₂O₅). Tanto o BCP como o BCP/Nb₂O₅ foram biocompatíveis, bioativos e osteocondutores (KIYOCHI JUNIOR, 2013; CANDIDO, 2014; PASQUINELLI, 2015).

Na forma de BCP/Nb₂O₅, o material apresentou evidência de ter potencial osteoindutor, induzindo a formação de blastemas ósseos imunorreativos para osteocalcina, no tecido conjuntivo a certa distância do sítio de regeneração, em defeitos de tamanho crítico, na calvária de ratos (CANDIDO, 2014).

Em função das excelentes propriedades biológicas destes materiais, levantamos a hipótese de que eles são capazes de recrutar células mesenquimais multipotentes, estimular sua diferenciação em osteoblastos e induzir o crescimento de osso em sítio ectópico, cumprindo todos os requisitos necessários para ser considerado um biomaterial osteoindutor. Para testar esta hipótese, a capacidade osteoindutora do BCP e do BCP/Nb₂O₅ foi avaliada por meio da implantação destes materiais em sítios ectópico, sem a adição de fatores de crescimento ou de células osteogênicas. Somado a isso, a relação dos biomateriais com os tecidos adjacentes e a morfologia do tecido formado nos poros foram analisadas nos dois materiais.

2. OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade osteoindutora do BCP e do BCP/Nb₂O₅ por meio da implantação dos materiais em sítio subcutâneo e sítio subfascial de ratos, sem a adição de fatores de crescimento ou de células osteogênicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos para a obtenção da cerâmica bifásica foram realizados no Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá – Laboratório de Materiais Metálicos e Biomateriais. Os procedimentos laboratoriais para caracterizar os materiais foram realizados no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP-UEM), da Universidade Estadual de Maringá.

3.1. Materiais precursores

Cerâmica bifásica BCP

Ossos de peixes jovens, *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado), cedidos pelo Núcleo de Pesquisas em Limnologia Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUPELIA-UEM) foram utilizados como matéria-prima para obtenção da BCP. Os ossos foram limpos para remoção dos tecidos moles, secos ao ar e então calcinados por 8 h a 900 °C. O material resultante constitui na biocerâmica composta pelas fases hidroxiapatita (HAp) e beta-fosfato tricálcico (β -TCP) em acordo com os padrões JCPDS 09-0432 e 09-0169, respectivamente. Após a calcinação, o material foi moído por 8 h a 300 r.p.m. em moinho planetário (Retsch® PM 100, Haan, Alemanha) sendo utilizado vaso de moagem e esferas de zircônia e uma razão de massa esferas/massa pó de 6/1 (WEINAND, 2009).

Pentóxido de nióbio (Nb_2O_5)

O pentóxido de nióbio (Nb_2O_5), na forma de pó, foi cedido pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM, Araxá, Brasil). O material, como recebido, foi submetido a tratamento térmico a temperatura de 1100 °C por 2 h, em atmosfera livre, para eliminar as formas polimórficas existentes, restando apenas a fase monoclinica do grupo espacial P2/m (10), em conformidade com a ficha padrão JCPDS 37-1468. Após o tratamento térmico, o material foi submetido ao processo de moagem em moinho de alta energia (Retsch® PM 100, Haan, Alemanha) por 1 h e 30 min a 300 rpm, em atmosfera de ar, utilizando vaso de moagem e esferas de zircônia e uma razão de massa esferas/massa pó de 6/1 (BONADIO, 2014).

Compósito BCP/ Nb_2O_5

Para a produção do compósito, os pós dos precursores BCP e Nb_2O_5 foram misturados na proporção de 1:1 em volume percentual, de acordo com a regra das misturas (LIMA, 1999), homogeneizados e subsequentemente moídos em um moinho de alta energia (Retsch® PM 100, Haan, Alemanha) a 300 rpm por 3 h, em atmosfera de ar,

sendo vaso de moagem e esferas de zircônia e uma razão de massa esferas/massa pó igual a 6/1 (BONADIO, 2014).

Preparação dos “scaffolds” de BCP e do BCP/Nb₂O₅

A produção dos suportes macroporosos (*scaffolds*) foi realizada utilizando aglomerados esféricos de lactose monohidratada *SuperTab® SD* (DFE pharma, Goch, Alemanha), obtidos pela técnica *spray-dried* (seca por pulverização), como elemento espaçador. Os aglomerados foram selecionados por meio do levantamento granulométrico utilizando um conjunto de peneiras com abertura compreendida no intervalo de 75 e 300 μm , selecionando-se, para a manufatura dos *scaffolds*, os aglomerados com diâmetro entre 150 e 250 μm .

Os pós de BCP e de BCP/Nb₂O₅ foram misturados, em recipientes separados, aos aglomerados esféricos de lactose na proporção de 1:1, homogeneizados manualmente por 10 minutos e, então, conformados uniaxialmente em uma matriz rígida de aço-ferramenta a 450 MPa em uma prensa hidráulica (PHP, Metal PEM, Maringá, Brasil). As amostras conformadas em disco com dimensões de 5,1 mm de diâmetro e 2,3 mm de espessura, foram sinterizadas em um forno tubular a 1080 °C por 2 h, em atmosfera livre. Após a sinterização, as amostras foram lixadas com lixa de grão 400 até a espessura de 1,0 mm e, em seguida, foram limpas em ultrassom por 10 min em banhos sucessivos de acetona, álcool e água deionizada para eliminar os resíduos resultantes da sinterização e do lixamento. Os *scaffolds* foram secos em uma mufla à temperatura de 80 °C por 24 horas (BONADIO, 2014).

3.2. Análise da porosidade (Princípio de Arquimedes)

O método de deslocamento de líquido baseado no princípio de Arquimedes foi usado para medir a porosidade dos *scaffolds* (STANDARD, 1999; WEINAND, 2009). A água deionizada foi utilizada como meio líquido. A massa das amostras secas, impregnadas e em imersão foram medidas em uma balança digital Shimadzu AUW220D (Shimadzu, Kyoto, Japão), com cinco casas decimais, utilizando o acessório *Specific Gravity Measurement Kit* (Shimadzu, Kyoto, Japão). Os *scaffolds* foram secos por 24 horas em uma estufa à temperatura de 100 °C. A seguir, as amostras secas foram colocadas em uma câmara a vácuo entre 10⁻¹ e 10⁻² Torr por 2 horas. As amostras ficaram

em contato com o meio líquido e após 30 minutos foram tomadas as medidas da massa da amostra impregnada e da massa da amostra sob empuxo do líquido. Os valores da porosidade correspondem ao valor médio das medidas realizadas em 6 amostras. A porosidade aberta foi calculada mediante a equação:

$$\gamma (\%) = \frac{(ms-mi)}{(ms-me)} \times 100 \quad (1),$$

onde:

$\gamma (\%)$ = porosidade aberta.

(ms) = a massa da amostra sinterizada e seca.

(mi) = massa da amostra impregnada com o meio líquido.

(me) = massa da amostra impregnada sob empuxo do líquido.

3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS)

A análise por MEV-EDS foi realizada em discos sem uso e em dois discos implantados no sítio subcutâneo por 45 dias. As amostras foram recobertas por um filme condutor de ouro pelo processo de *sputtering* em um metalizador Shimadzu IC-50 IonCoater (Shimadzu, Kyoto, Japão) para aumentar a condutividade do material. Posteriormente, elas foram analisadas em um microscópio FEI QUANTA 250 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) trabalhando entre 5 a 30 kV. A análise de EDS foi realizada em equipamento Oxford (Oxford Instruments, Oxon, Reino Unido), acoplado ao microscópio eletrônico de varredura.

3.4. Difração de Raios X (DRX)

A difratometria de Raios X, utilizando amostras na forma de pó, foi realizada em um difratômetro Shimadzu XRD-7000 (Shimadzu, Kyoto, Japão) com radiação CuK_α ($\lambda=0,15418$ nm), geometria Bragg-Brentano, operando a 40 kV e 30 mA. O intervalo angular utilizado (2θ) foi entre 10 e 80° e a varredura foi feita a velocidade de 0,5°/min e incremento angular de 0,02°. A identificação das fases foi realizada utilizando um banco de dados do comitê internacional (*Joint Committee of Powder Diffraction Standards – JCPDS*) (FILE, 2000), onde são encontrados os registros (fichas) dos padrões de difração que podem ser comparados aos resultados experimentais por meio do programa específico.

Para a análise quantitativa das fases cristalinas foi realizado um refinamento estrutural pelo método de Rietveld, utilizando o programa *FullProf Suite* (YOUNG, 1995; ROISNEL, 2000), que é empregado na caracterização de materiais estudados por DRX. Com esse método, é possível fazer um ajuste dos parâmetros da estrutura cristalina dos materiais medidos pelo DRX. Desta forma, é possível obter informações estruturais da amostra como posições atômicas, parâmetro de rede, proporção entre as fases cristalinas, entre outros. Esses parâmetros são ajustados minimizando a diferença entre as intensidades calculada e experimental dos picos obtidos no difratograma.

3.5. Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-PAS)

A espectroscopia FTIR-PAS das amostras na forma de pó foi realizada em um espectrofotômetro VERTEX 70 V (Bruker, Billerica, USA) acoplado a uma célula fotoacústica PAS (*Photoacoustic Spectroscopy* – PAS) (Bruker, Billerica, USA).

3.6. Espectroscopia micro-Raman

As análises por espectroscopia micro-Raman foram realizadas nos materiais na forma de ..., previamente à implantação nos animais, utilizando um espectrômetro micro-Raman Confocal (SENTERRA, Bruker, Billerica, USA) com ampliação óptica de 20x, utilizando laser de excitação com comprimento de onda de 532 nm e potência de 20 mW, utilizando um total de 20 varreduras (*scans*) por amostra.

3.7. Estudo *in vivo*

Todos os procedimentos em animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA N° 7351180216) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e estão de acordo com o artigo 8 da Lei Federal 11.794/2008.

Foram utilizados 48 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos, com peso variando entre 180 e 200 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá - UEM. Deste número total, vinte e quatro animais foram selecionados para os experimentos com implantes subcutâneos e 24 animais para experimentos com implantes subfasciais.

Durante todo o período experimental os animais receberam ração (Nuvilab®/Nuvital®, Sogorb®, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*.

Procedimento experimental para o implante subcutâneo e subfascial

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de uma solução 1:1 de Ketamina (Dopalen®, Sespo®, Paulínia, Brasil) e Xilazina (Rompum®, Bayer®, São Paulo, Brasil) na concentração de 1,0 mL.Kg⁻¹.

Implantes subcutâneos: Após a tricotomia da região dorsal e antissepsia com iodo tópico foram realizadas duas incisões longitudinais em relação ao maior eixo corporal, separadas por uma distância aproximada de 1 cm entre elas (Figura 1A). A partir das incisões foram criadas bolsas subcutâneas, em sentido lateral, por meio de divulsão romba (Figura 1C). Em cada animal, em uma das bolsas um disco de BCP foi implantado e na outra bolsa um de BCP/Nb₂O₅, mantendo-se uma distância de aproximadamente 3 a 4 cm entre eles (Figura 1E). Foram implantados 24 discos de BCP e 24 discos de BCP/Nb₂O₅. Após a inserção dos implantes a região foi suturada com fio de seda 4-0 (Ethicon® Johnson, Cincinnati, USA) e recebeu aplicação tópica de solução aquosa de iodo a 1% (Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil) (Figura 1G).

Implantes subfasciais: Após tricotomia dos membros inferiores do lado direito e esquerdo e antissepsia tópica com iodo, foi realizada uma incisão na pele, de aproximadamente 2 cm de comprimento, ao longo do maior eixo, em posição lateral (Figura 1B). A seguir, procedeu-se a divulsão da pele e do tecido subcutâneo até a exposição da fáscia do músculo bíceps femoral. Após sua exposição, uma segunda incisão de aproximadamente 8 mm de extensão, em posição central, foi executada e procedeu-se a divulsão da fáscia muscular criando uma bolsa para o implante do disco (Figura 1D). Um dos membros inferiores recebeu um disco de BCP e o membro inferior contralateral recebeu o implante do BCP/Nb₂O₅ (Figura 1F). Foram implantados 24 discos de cada material.

Após o implante, a fáscia foi suturada com pontos simples utilizando fio reabsorvível 5-0 Vicryl® (Johnson, Cincinnati, USA), seguida de sutura da pele com fio de seda 4-0 Ethicon® (Johnson, Cincinnati, USA). Após a sutura, a região recebeu aplicação tópica de solução aquosa de iodo a 1% (Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil) (Figura 1H).

Após os procedimentos cirúrgicos, todos os animais foram mantidos sob observação, em caixas plásticas com grade, aquecimento com luz artificial até a completa recuperação da anestesia. Após despertarem, os animais foram alocados em grupos de 4 animais/gaiola.

Os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá, sob temperatura controlada de 20 °C e água/ração *ad libitum* por um período de 15, 45 ou 60 dias. Durante todo o período experimental, os animais foram avaliados no que diz respeito à alimentação e à movimentação no interior das caixas plásticas. Passado os respectivos tempos de observação, os animais foram eutanasiados com uma sobredose de tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália, Itapira, Brasil) na dose de 120 mg/Kg. Após a avaliação clínica e constatação da morte do animal, os implantes foram removidos com uma margem de segurança de aproximadamente 1 cm.

As amostras foram colocadas em paraformaldeído a 4% e mantidas por 48 horas para fixação dos tecidos. Decorrido este tempo, o tecido foi colocado em álcool 70% por 48 horas. Posteriormente, foi realizada a troca do álcool 70% e as amostras permaneceram por no mínimo 48 horas para serem processadas para inclusão em parafina. O tecido foi cortado em 7 µm para a coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE) e em 8 µm quando a coloração por AZAN foi realizada.

Além disso, foram selecionadas amostras coradas por meio de HE e AZAN, dos períodos de 15 e 45 dias do grupo BCP a fim de obter cortes histológicos de 7 µm de espessura, cuja morfologia do disco estivesse preservada durante o processamento histológico e com matriz de colágeno para ser imunocorados para detecção da osteocalcina. Para esta imunorreação, o anticorpo primário monoclonal antiosteocalcina Osteocalcin (G-5): sc-365797 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA), produzido em camundongo, foi utilizado na diluição 1:200. O *kit* Histostain® *Plus Broad Spectrum* (Invitrogen Corporation, Camarillo, EUA) foi utilizado para revelar a reação, seguindo as instruções do fabricante.

Para a análise por meio da microscopia óptica, os cortes foram observados em microscópio óptico (Nikon Eclipse®, Shimjuku, Japão), acoplado em uma câmera de alta resolução (Nikon®, Ds-Fi1c, Shimjuku, Japão). As imagens foram obtidas em programa específico (NIS-Elements versão 4.0, Praga, República Checa).

4. RESULTADOS

4.1. Porosidade (Método de Arquimedes)

A porosidade aberta dos arcabouços macroporosos, mensurada pelo processo de deslocamento de fluido, foi da ordem de 58% para o BCP e de 59% para o BCP/Nb₂O₅.

4.2. MEV-EDS

A Figura 2 representa as eletromicrografias de varredura do BCP e do BCP/Nb₂O₅. A Figura 3 representa o resultado da análise química semiquantitativa do EDS para o BCP e para o BCP/Nb₂O₅.

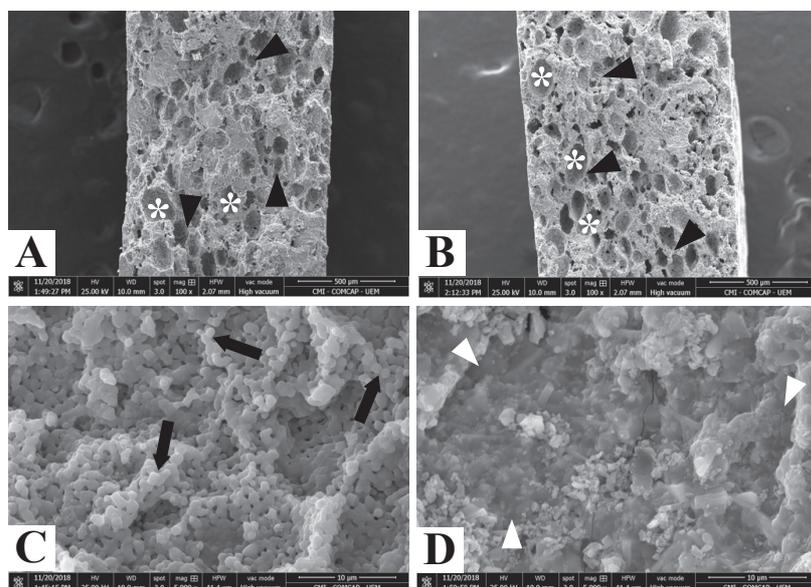


Figura 2. Eletromicrografia de varredura do BCP (A e C) e do BCP/Nb₂O₅ (B e D) realizadas antes da implantação dos materiais. As imagens A e B são da superfície da fratura e mostram a distribuição dos poros (*) por todo o material e a presença de interconectividade (cabeça de seta). As imagens C e D se referem à morfologia interna dos poros. Em C é possível visualizar os grãos arredondados ligados entre si por “pescoços”, o que caracteriza um estágio inicial de sinterização (seta), característico do BCP. Em D a microestrutura dos poros do BCP/Nb₂O₅ corresponde a etapa final de sinterização, com significativa redução de porosidade (cabeça de seta branca). Aumento de 100x nas imagens (A e B). Aumento de 5000x em (C e D).

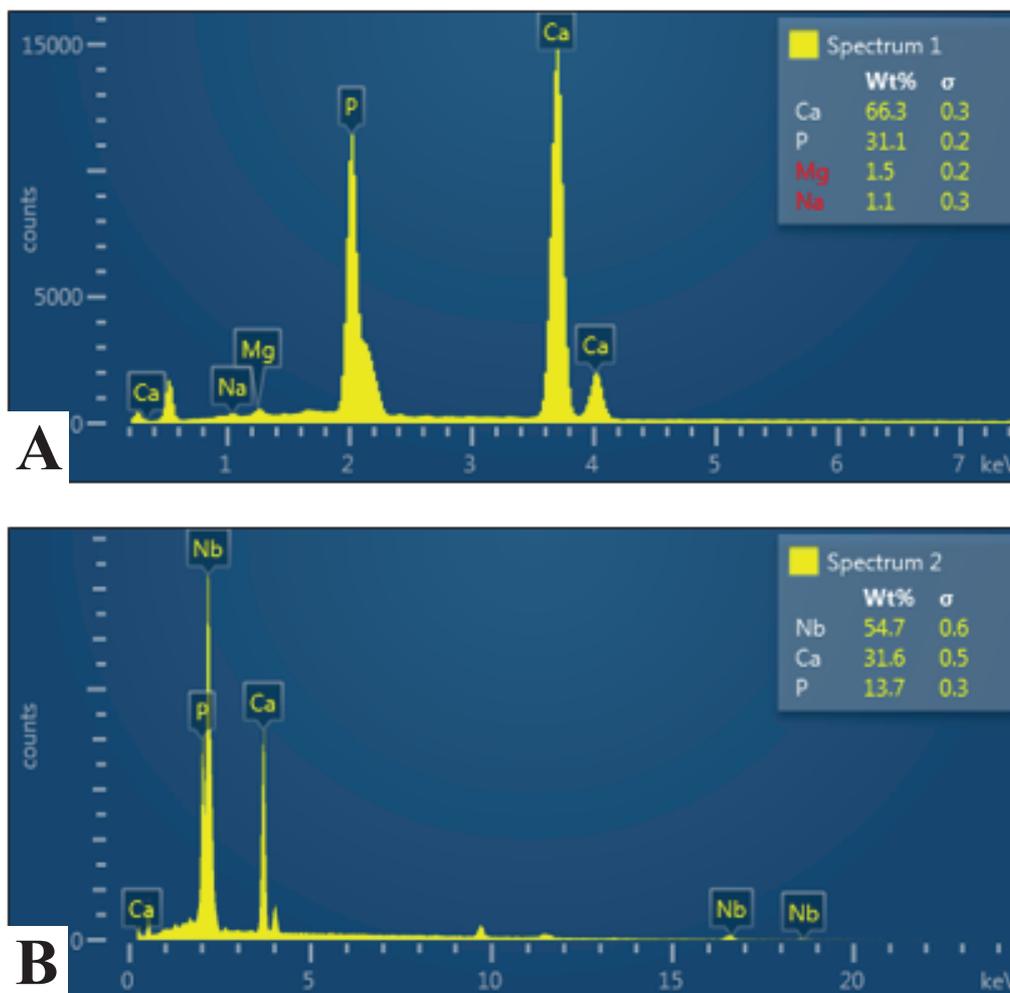


Figura 3. Análise química semiquantitativa utilizando a Espectroscopia de Raios-X por Dispersão de Energia (EDS) realizada na superfície do BCP (A) e do BCP/Nb₂O₅ (B). Os espectros mostraram os elementos químicos majoritários e suas respectivas massas percentuais (%wt) que foram: em A, Ca (66,3%), P (31,1%) e em menor quantidade, o Mg (1,5%) e o Na (1,1%). A razão molar calculada do cálcio em relação ao fósforo (razão Ca/P) foi de 1,64. A imagem B mostra o resultado para o BCP/Nb₂O₅ com as seguintes massas percentuais: Nb (54,7%), Ca (31,6%) e o P (13,7%). A razão Ca/P do BCP/Nb₂O₅ foi de 1,78.

4.3. Difração de Raios X (DRX)

A figura 4 apresenta os difratogramas do BCP e do BCP/Nb₂O₅.

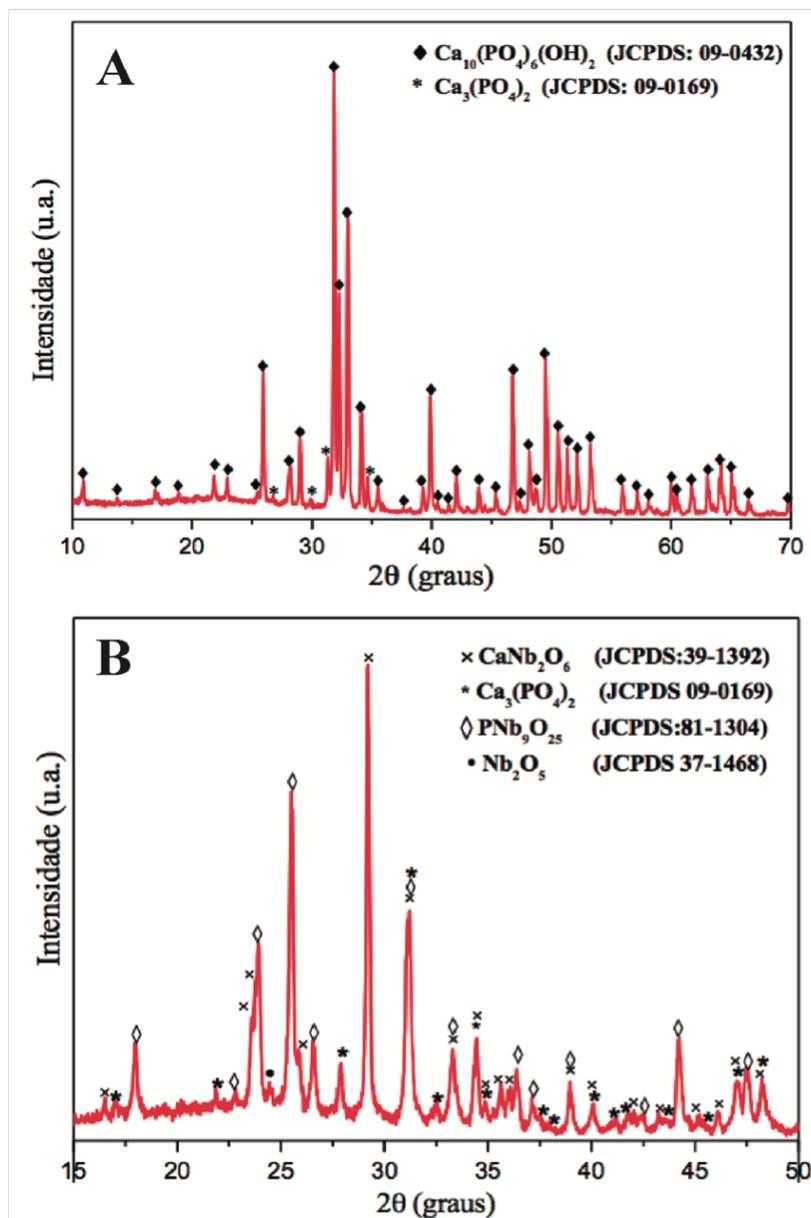


Figura 4. Difratograma de Raios X do BCP (A) e do BCP/Nb₂O₅ (B) antes de serem implantados no animal. A massa percentual (wt %) das fases HAp e do β-TCP, determinada via refinamento estrutural utilizando método de Rietveld foi de 88,79 % para a fase HAp e de 11,21% para a fase β-TCP. Em (B) é apresentado o difratograma de Raios X do BCP/Nb₂O₅ e correspondem a seguintes fases cristalinas: óxido de cálcio nióbio (Fersmita – CaNb₂O₆), óxido de fósforo nióbio (PNb₉O₂₅), β-fosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂) e pentóxido de nióbio (Nb₂O₅), em conformidade com os padrões JCPDS: 39-1392, 81-1304, 09-0169 e 37-1468, respectivamente. A massa percentual das fases identificadas foi de: Ca₃(PO₄)₂ = 34,05%, PNB₉O₂₅ = 32,55%, CaNb₂O₆ = 33,40% e traços do precursor Nb₂O₅, menor que 1%.

4.4. Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A figura 5 mostra o espectro FTIR do BCP e do BCP/Nb₂O₅.

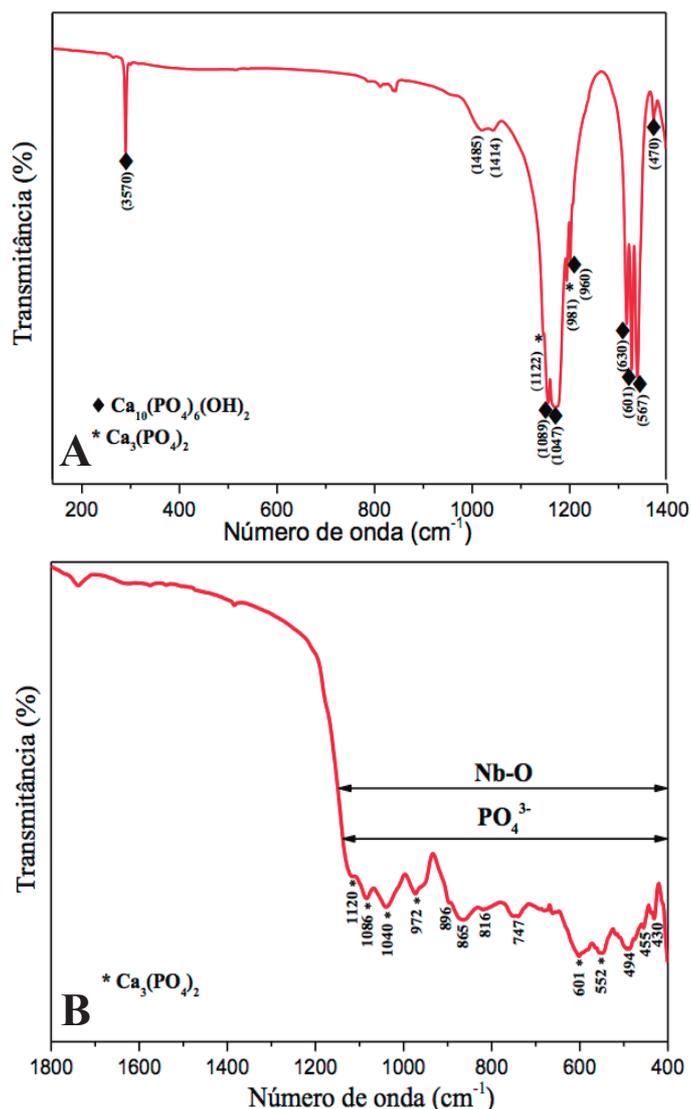


Figura 5. Espectros FTIR DO BCP (A) e do BCP/Nb₂O₅ (B). Em (A) é possível observar as bandas da HAp relativas ao íon OH⁻ são observadas em (ν_s) 3570 e (ν_L) 630 cm⁻¹, enquanto as vibrações do grupo funcional PO₄³⁻, da fase HAp são detectadas em (ν_2) 470, (ν_s) 567, (ν_4) 601, (ν_1) 960, (ν_3) 1047 e (ν_3) 1089 cm⁻¹. As vibrações correspondentes a fase β -TCP e associadas aos íons PO₄³⁻ estão localizadas em 981 e 1120 cm⁻¹. As bandas localizadas em 1414 e 1485 cm⁻¹ estão relacionadas aos íons CO₃²⁻. O espectro vibracional FTIR relativo ao BCP/Nb₂O₅ é mostrado em (B). São observadas as bandas características das fases identificadas, ou seja: Ca₃(PO₄)₂, PNB₉O₂₅, CaNb₂O₆ e Nb₂O₅, notadamente na região entre 400 e 1150 cm⁻¹, que correspondem às vibrações de estiramento da ligação Nb=O, de deformação angular da ligação de Nb-O-Nb, de estiramento da ligação Ca-O e também de estiramento e de deformação grupo funcional PO₄³⁻. De forma geral, uma grande superposição dessas bandas vibracionais é observada o que dificulta identificar com precisão os picos relacionados às fases PNB₉O₂₅, CaNb₂O₆ e Nb₂O₅. As bandas associadas à fase β -TCP são observadas em ν_1 (972 cm⁻¹), ν_3 (1120, 1086 e 1040 cm⁻¹) e ν_4 (601 e 552 cm⁻¹) (MCCONNELL, ANDERSON e RAO, 1976; HARDCASTLE e WACHS, 1991; HUANG *et al.*, 1999; RISTIĆ, POPOVIĆ e MUSIĆ, 2004; MOREIRA *et al.*, 2010).

4.5. Espectroscopia micro-Raman

A figura 6 representa o espectro micro-Raman do BCP e do BCP/Nb₂O₅.

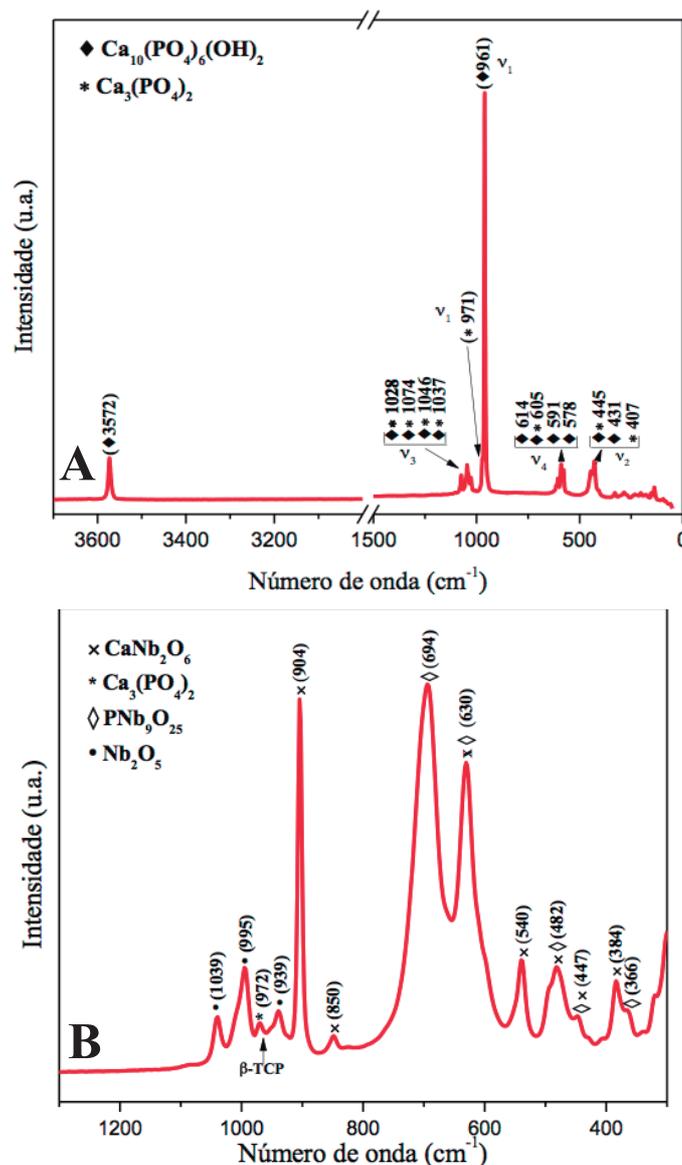


Figura 6. Espectros micro-Raman do BCP (A) e do BCP/Nb₂O₅ (B). Em (A) é possível observar, no intervalo compreendido entre 900 e 1000 cm⁻¹, as bandas do modo vibracional v₁ do grupo PO₄³⁻, no qual são observadas vibrações relacionadas às fases HAp em 961 cm⁻¹ e da fase β-TCP em 971 cm⁻¹. A banda em 3572 cm⁻¹ corresponde ao modo de estiramento v₃ do grupo funcional OH⁻, característico da fase HAp. Nos intervalos (350 a 530), (530 a 650) e (1000 a 1100) cm⁻¹, são observadas bandas de menor intensidade do grupo funcional PO₄³⁻ nos modos vibracionais v₂, v₄ e v₃, respectivamente, e estão associadas às fases HAp e β-TCP, conforme indicação na figura. Observa-se, de forma geral, uma superposição dessas bandas uma vez que, nas fases cristalinas, as vibrações ocorrem no mesmo intervalo, mas em posições diferentes (PENEL *et al.*, 1998). A Figura B mostra o espectro micro-Raman do BCP/Nb₂O₅. São observadas bandas vibracionais da fase cristalina CaNb₂O₆ (fersmita) em (v₄) 482, (v₃) 540, (v₁) 904, (v₁) 850 cm⁻¹, além de bandas da fase PNb₉O₂₅, detectadas em (v₂) 694 e (v₂) 630 cm⁻¹. As vibrações fracas, no intervalo entre 950 e 975 cm⁻¹, são atribuídas à fase β-TCP e estão relacionadas ao íon PO₄³⁻. A banda em (v₁) 995 cm⁻¹ é associada à fase Nb₂O₅ e as bandas em 1039 e 939 cm⁻¹ estão relacionadas às ligações terminais do tipo Nb=O.

4.6. Estudo *in vivo*

Avaliação clínica

Os animais foram observados após o procedimento cirúrgico e a recuperação ocorreu sem intercorrências. Um leve eritema associado a edema foi evidenciado na região cirúrgica e desapareceu após 72 horas. Não foram observadas alterações de comportamento ou da marcha dos animais utilizados no presente estudo.

Estudo histológico

O aspecto geral dos cortes corados com HE e AZAN mostraram que os poros dos discos se apresentaram irregularmente distribuídos e com boa interconectividade. Não houve desenvolvimento de resposta inflamatória aguda e tampouco fibrose no entorno dos materiais, independente do período de observação, do sítio de implantação ou do tipo de implante.

Foram observadas células gigantes multinucleadas (CGM) nas superfícies dos discos, localizadas frequentemente nas bordas laterais e no interior de poros comunicantes com o meio externo. Os poros foram invadidos por tecido conjuntivo celularizado e intensamente vascularizado, cuja morfologia variou ao longo dos períodos de observação e será descrito a seguir.

Implantes subcutâneos

Nos implantes subcutâneos de BCP e BCP/Nb₂O₅ houve migração de células e vasos sanguíneos a partir do tecido circunjacente aos discos. O tecido que se desenvolveu nos poros apresentou diferenças na sua morfologia quando comparados poros em diferentes posições e diferentes períodos de observação (Figura 7A). Os vasos que permearam os discos de BCP/Nb₂O₅ apresentaram-se hiperêmicos e com a luz de maior diâmetro, em comparação com aqueles que permearam os discos de BCP (Figura 7B e 7E). Estes implantes apresentaram muitos eritrócitos fora dos vasos. Alguns poros, em diferentes períodos apresentaram um preenchimento amorfo, homogêneo, eosinofílico, tratando-se possivelmente de fluido tecidual.

A seguir serão descritas as principais características morfológicas dos implantes subcutâneos com BCP e BCP/Nb₂O₅, nos períodos de 15, 45 e 60 dias de observação. As particularidades para cada material serão destacadas no texto.

Período de 15 dias

Após 15 dias, a maioria dos poros apresentou-se vascularizado. Os poros dos discos de BCP e BCP/Nb₂O₅ estavam preenchidos por um tecido conjuntivo frouxo com células morfológicamente distintas. Havia células arredondadas, com cromatina frouxa, e células estreladas ou fusiformes, com cromatina mais condensada. As células encontravam-se dispersas no interior da matriz ou localizadas na superfície interna dos poros (Figura 7B).

Neste período os poros mais periféricos apresentaram-se mais celularizados e houve a deposição de uma matriz mais densa ao redor dos vasos sanguíneos. A coloração azul intensa, dada pela coloração com AZAN, da matriz perivascular indica a presença de colágeno. Este mesmo padrão de formação de matriz também foi observado para ambos os materiais (Figuras 7C, 7D, 7E e 7F).

Período de 45 dias

Aos 45 dias de observação a matriz do tecido que preencheu os poros apresentou características de maturação, que ficou evidente pela visualização de uma matriz mais densa, em comparação com aquela de 15 dias (Figura 8A). No grupo BCP/Nb₂O₅ a matriz era homogênea, enquanto no grupo BCP tinha aspecto mais fibroso (Figura 8C e 8E). A morfologia das células aos 45 dias foi semelhante às das de 15 dias de observação. Uma das características mais marcantes do tecido preenchedor dos poros nos discos BCP/Nb₂O₅ era a grande quantidade de eritrócitos no interior dos vasos, de maior calibre em comparação com o grupo BCP (Figura 8A e 8E).

Período de 60 dias

Após 60 dias de implante, não se observou uma evolução na morfologia dos tecidos que ocuparam o interior dos poros, em comparação com os períodos anteriores.

O tecido apresentou basicamente as mesmas características já descritas (Figura 8B, 8D e 8F). Neste período ainda havia poros vazios.

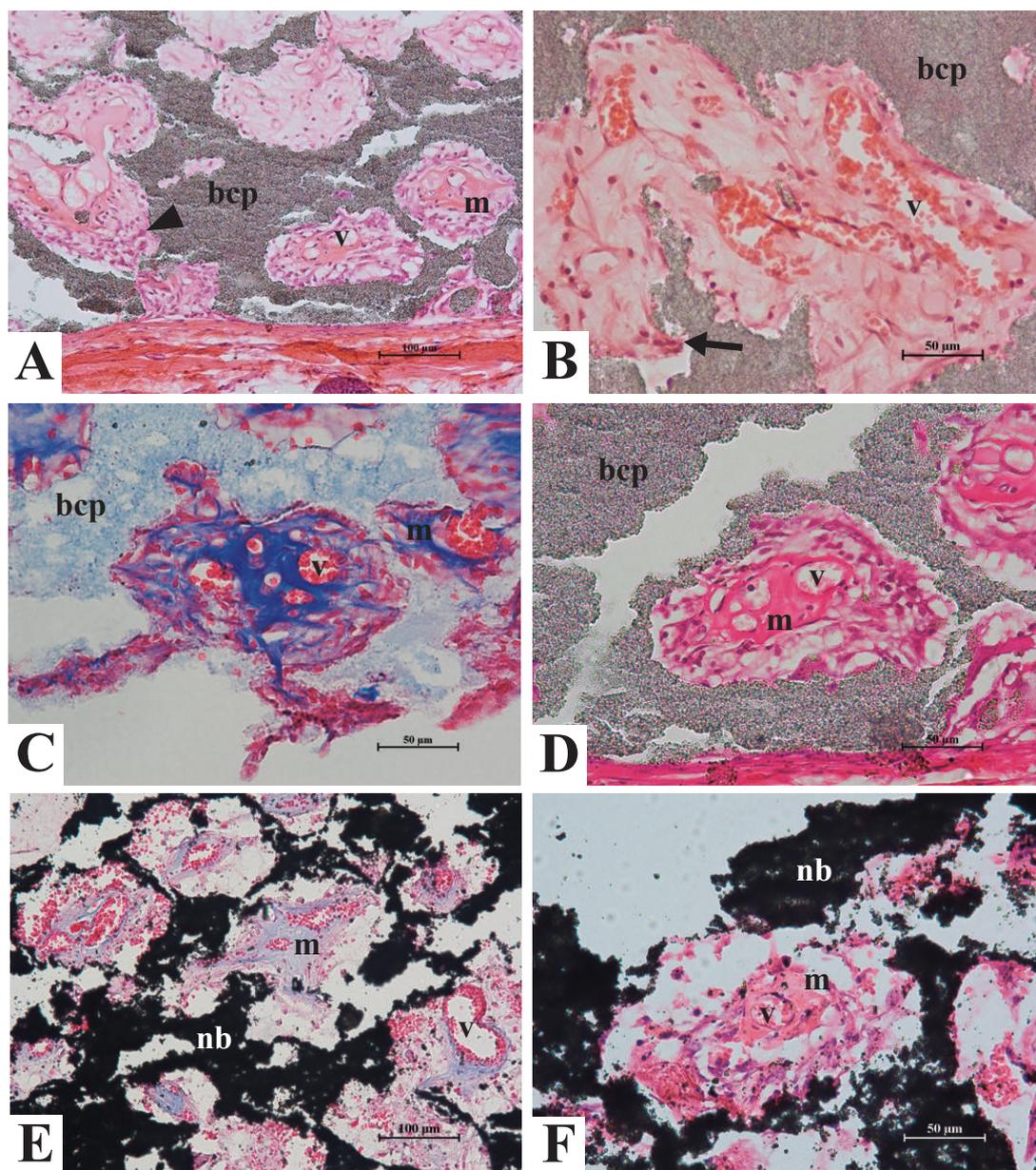


Figura 7. Fotomicrografia do BCP (A, B, C, D) e do BCP/Nb₂O₅ (E, F) implantados em sítio subcutâneo de ratos Wistar após 15 dias da cirurgia de implantação. Em (A) é possível observar um maior número de células com núcleos mais condensados (cabeça de seta) na periferia do *scaffold* em comparação com a região central. Em (B) mostra células dispersas no interior do tecido conjuntivo que preencheu os poros e na superfície interna do material (seta). Observa-se vasos sanguíneos (v) numa posição central dentro dos poros e a deposição de matriz (m) adjacente ao vaso. A coloração em azul em (D e F) confirma a presença de colágeno na composição da matriz corada em eosina (A, B, C e E), quando se utilizou a hematoxilina e eosina (HE), com disposição de fibras semelhante à matriz óssea. BCP (bcp) e BCP/Nb₂O₅ (nb). Imagens em 400x. Coloração HE: (A, B, C, E). Coloração Azan: (D, F).

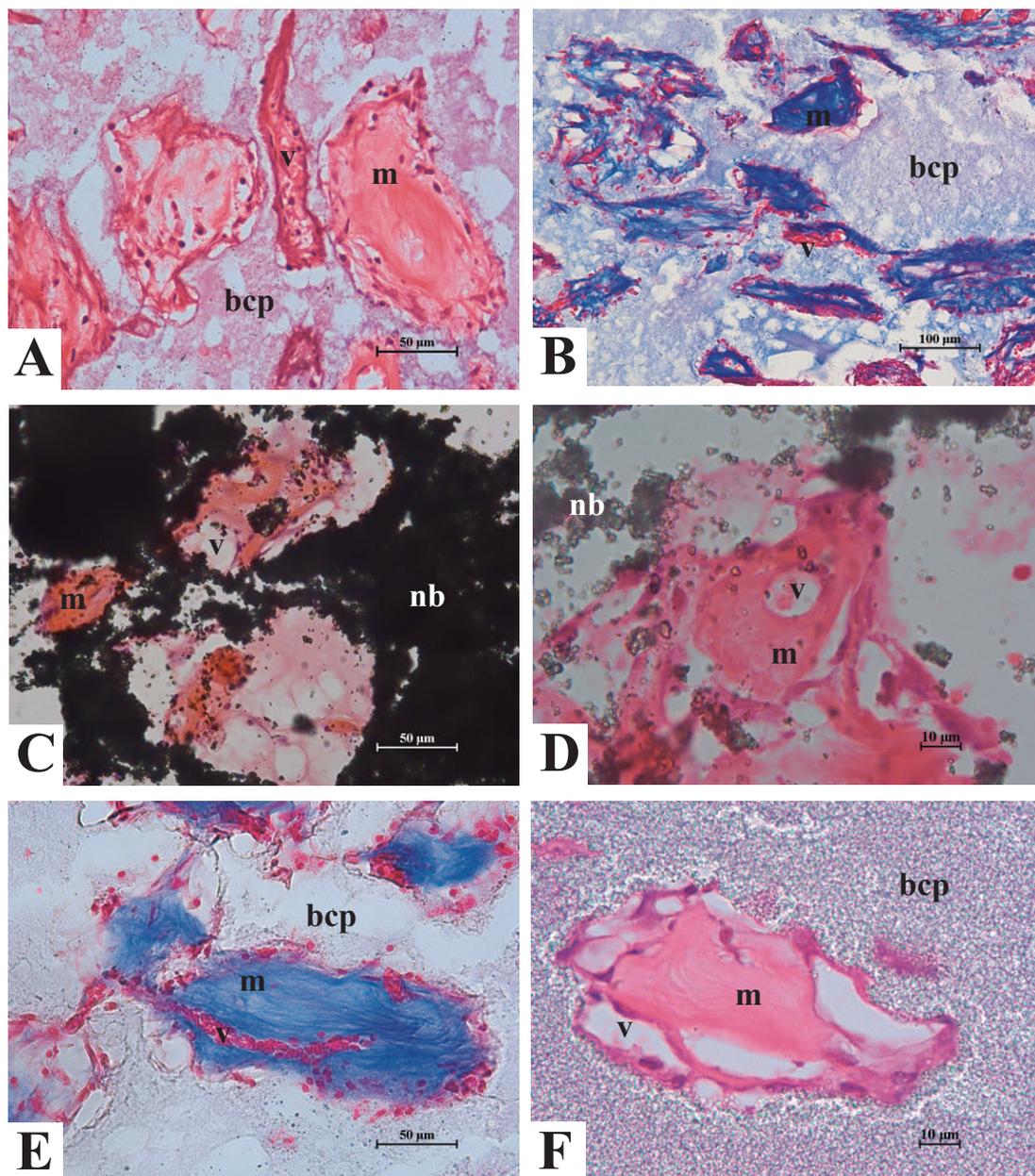


Figura 8. Fotomicrografia do BCP (bcp) e do BCP/Nb₂O₅ (nb) em sítio subcutâneo de ratos após 45 dias (A, C, E) e 60 dias (B, D, F) de implantação. Em (A) é possível ver a deposição de matriz (m) no interior de um poro e a presença de vaso sanguíneo (v). Em (C) observa-se a deposição de matriz (m) no interior dos poros e ao lado de vaso sanguíneo (v). A imagem (E) mostra a deposição de matriz (m) no interior do BCP (bcp) corada em azul demonstrando a composição de colágeno. Presença de vasos sanguíneos (v) com grande quantidade de eritrócitos. Em (B) verifica-se a matriz de colágeno corada em azul (m) preenchendo vários poros após 60 dias de implantação. Em (D) é possível perceber matriz (m) depositada ao lado de um vaso sanguíneo cortado transversalmente (v) no BCP/ Nb₂O₅. Em (F) mostra uma matriz depositada do interior de um poro de menor calibre, ao lado de vaso sanguíneo (v), com padrão de deposição de fibras semelhante à matriz óssea. Aumento de 200x em (B). Aumento de 400x em (A, C, E). Aumento de 1000x em (D, F). Coloração HE (A, C, D, F). Coloração Azan (B, E).

Implante subfascial

Os sítios de implante não apresentaram resposta inflamatória, não houve desenvolvimento de cápsula e, após 45 e 60 dias, observou-se o contato direto do tecido muscular com o implante. Grande quantidade de vasos migrou para a superfície dos discos e para o interior dos poros.

Do ponto de vista da morfologia do tecido que se desenvolveu nos poros, os implantes subfasciais apresentaram uma resposta semelhante àquela dos implantes subcutâneos.

Período de 15 dias

Quinze dias após o implante subfascial células e vasos sanguíneos oriundos dos tecidos adjacentes permearam os poros. Observou-se a deposição de matriz acidófila no interior dos poros e ao redor de vasos. As células apresentaram características morfológicas de atividade sintética, como núcleo claro e cromatina frouxa, e outras menores, com núcleos mais picnóticos (Figura 9A, 9B e 9C).

Os poros dos materiais foram preenchidos por tecido conjuntivo frouxo, bastante celularizado. A maioria das células apresentou núcleo arredondado, condensado e forte coloração basofílica. Um menor número de células fusiformes, com núcleo mais frouxo também estavam presentes (Figura 9C). Foi possível observar, ainda, a deposição de matriz eosinofílica adjacente aos vasos sanguíneos (Figura 9C e 9E). A matriz foi corada em azul pelo Azan mostrando a composição de colágeno (9D e 9F).

A presença de vasos hiperêmicos e eritrócitos fora dos vasos caracterizou os implantes subfasciais com BCP/Nb₂O₅.

Período de 45 dias

Aos 45 dias de observação o tecido de preenchimento, em ambos os materiais, apresentou graus variados de densidade. Havia poros preenchidos por um tecido conjuntivo frouxo, com células arredondadas ou fusiformes e núcleo picnótico. Na margem dos discos havia grande quantidade de vasos sanguíneos congestionados. Diversos poros apresentaram uma matriz homogênea (Figura 10A e 10C).

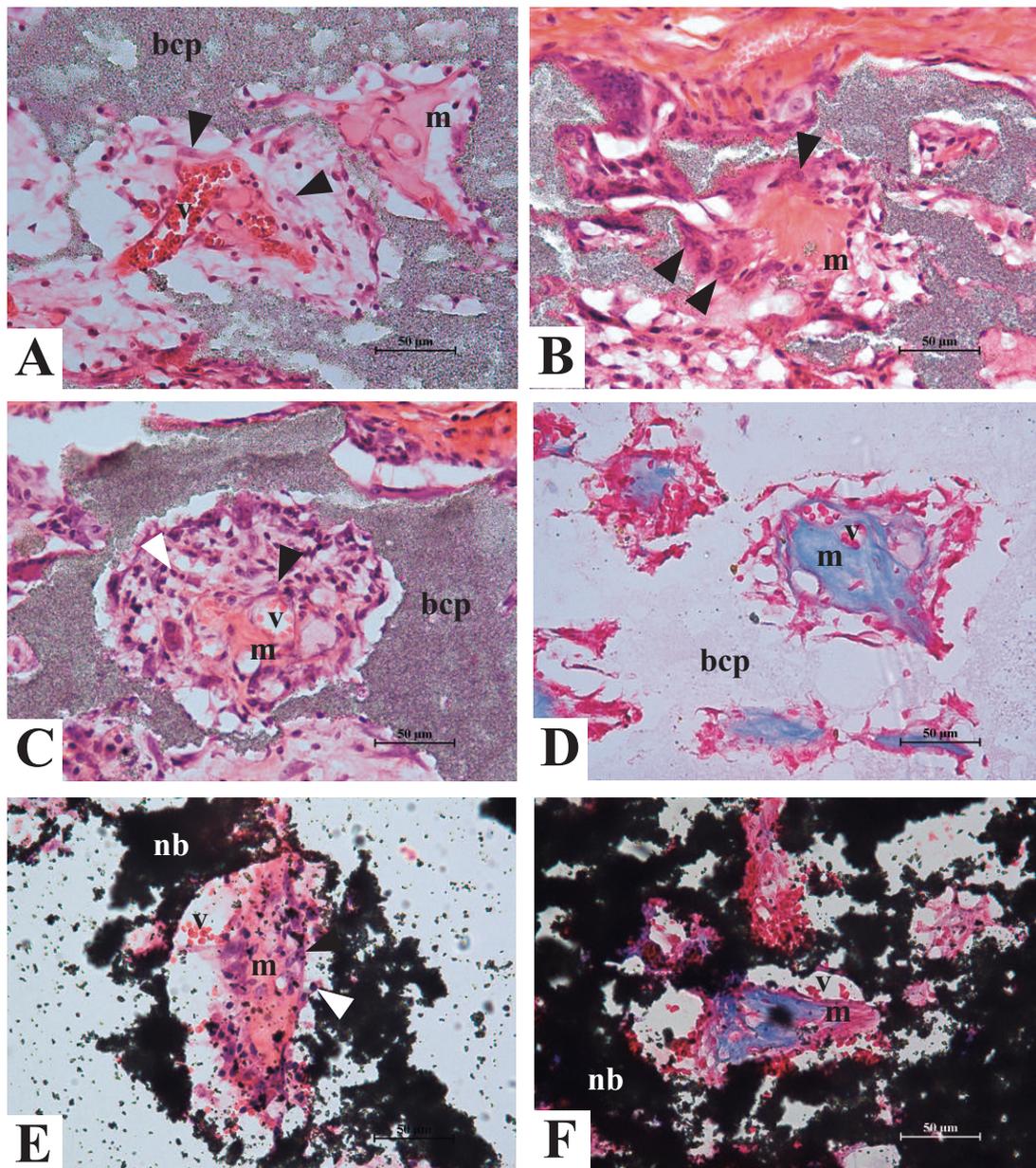


Figura 9. Fotomicrografia do BCP (bcp) e do BCP/Nb₂O₅ (nb) implantados em sítio subfascial de ratos após 15 dias de implantação. Em (A) é evidente a migração do tecido para o interior dos poros e a deposição de matriz (m) adjacente aos vasos sanguíneos (v). Existem células com cromatina pouco condensada (cabeça de seta preta) próximas à matriz. Em (B) mostra a matriz extracelular (m), depositada ao lado de vasos sanguíneos (v), com células que apresentaram o núcleo pouco condensado (cabeça de seta preta). Em (C) é possível perceber matriz (m) preenchendo os poros e depositada ao lado de vasos sanguíneos (v). Nesta imagem é visível células com núcleo pouco condensado (cabeça de seta preta) e outras células com núcleos mais condensados (cabeça de seta branca). Em (D) observa-se a deposição de matriz (m) corada em azul, no interior de poros localizados periféricamente, que ocorreu adjacente aos vasos sanguíneos (v). Em (E) podemos verificar a deposição de matriz (m) próxima a vaso sanguíneo (v) e muitas células com núcleos bem condensados (cabeça de seta branca). A imagem (F) mostra a deposição de matriz (m) corada em azul, depositada ao lado de vasos sanguíneos (v). Aumento de 400x. As imagens (A, B, C, E) coradas em HE e as imagens (D, F) foram coradas em Azan.

A maturação do tecido que preencheu os poros dos *scaffolds* de BCP/Nb₂O₅ pode ser observada devido ao aumento na densidade do tecido de preenchimento, com maior quantidade de fibras em comparação com o tempo de 15 dias (Figura 10E). As células imersas na matriz apresentaram núcleo arredondado, com cromatina frouxa (Figura 10C). Além disso, a presença de grande quantidade de vasos sanguíneos congestionados e de eritrócitos localizados fora dos vasos foi uma característica comum neste período de observação. A deposição de matriz nos poros ocorreu na periferia e no centro do biomaterial (Figura 10A e 10C).

Período de 60 dias

Neste período de observação os discos foram preenchidos por tecido conjuntivo frouxo com uma “matriz delicada” e a presença de células com núcleos condensados, mergulhadas na matriz formada (Figura 10B e 10D). Em outras regiões evidenciou-se a deposição de matriz eosinofílica adjacente aos vasos sanguíneos e eventual extravasamento de eritrócitos para a matriz (Figura 10B).

Os poros dos discos de BCP/Nb₂O₅ foram preenchidos por um tecido conjuntivo frouxo com a matriz de coloração basofílica e grande quantidade de células, ora com núcleos picnóticos e de formato arredondado, ora com núcleos arredondados a ovalados e pouco condensados (Figura 10F). Em algumas regiões ocorreu a deposição de matriz corada pela eosina, aparentemente formando delicados feixes de fibras, associada a núcleos fusiformes dispostos paralelamente às fibras (Figura 10D). Nos poros superficiais foi possível visualizar células com núcleos arredondados, com cromatina pouco condensada, imersas numa matriz eosinofílica depositada na superfície do biomaterial ou preencheu completamente o poro. A matriz depositada no interior dos poros é composta por colágeno (Figura 10F).

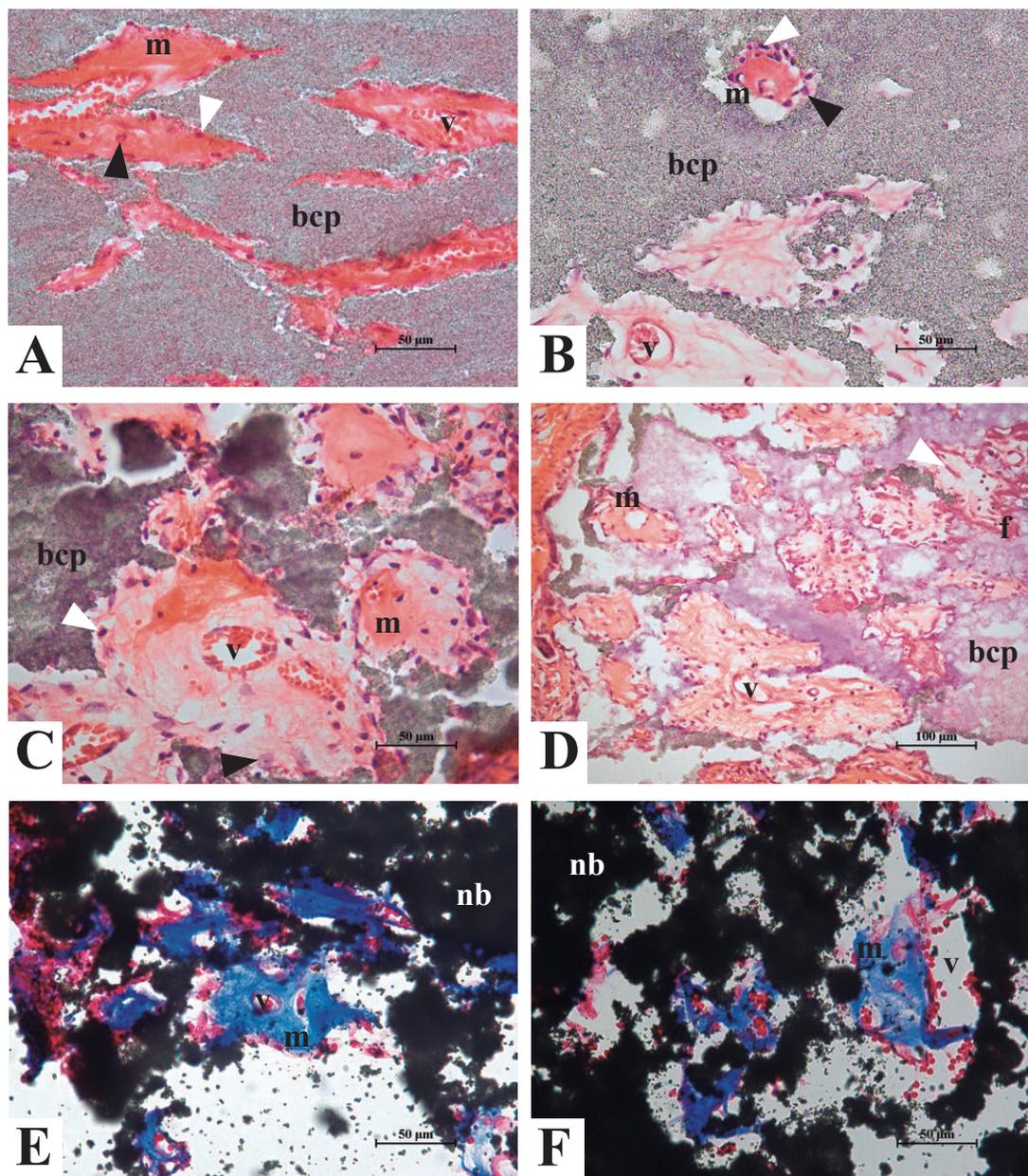


Figura 10. Fotomicrografia do BCP (bcp) e do BCP/Nb₂O₅ (nb) implantados em sítio subfascial de ratos após 45 dias (A, C, E) e 60 dias (B, D, F) de implantação. Em (A) verifica-se uma matriz (m) preenchendo os poros e adjacente aos vasos sanguíneos (v), com células que possuem núcleos condensados (cabeça de seta branca) e outras células com núcleos menos condensados (cabeça de seta preta). Em (C) mostra que algumas regiões foram preenchidas por uma matriz (m) mais corada e em outras o tecido apresenta-se menos corado. Exibe, ainda, células com núcleos mais condensados (cabeça de seta branca) e células com núcleos com cromatina mais frouxa (cabeça de seta preta). Em (E) observa-se a matriz (m) depositada no interior de poros do BCP/Nb₂O₅ após 45 dias de implante. Em (B), mostra o BCP após 60 dias de observação que foi preenchido por tecido conjuntivo frouxo e em alguns poros ocorreu deposição de matriz (m), associada às células com diferentes morfologias do núcleo (cabeça de seta branca e preta). Na imagem (D) os poros foram preenchidos por matriz (m) corada pela eosina ou composta por fibras dispostas paralelamente à superfície do poro (f). Entre estas fibras foi possível visualizar células com núcleos no formato fusiforme. Em (F) mostra matriz preenchendo os poros do BCP/Nb₂O₅ preenchidos por matriz (m) com conteúdo de colágeno, e grande quantidade de vasos sanguíneos (v). Aumento de 200x em (D). Aumento de 400x em (A, B, C, E, F). Coloração Hematoxilina e Eosina (A, B, C, D). Coloração Azan (E, F).

Imunocoloração para osteocalcina do grupo BCP em sítio subcutâneo (15 e 45 dias)

O estudo imunohistoquímico permitiu evidenciar indícios de deposição de matriz óssea na interface tecido-biomaterial, aos 15 e 45 dias de observação no grupo BCP. As células imunomarcadas apresentaram uma organização na margem dos poros do disco, bem como, evidenciou-se a presença de uma matriz amorfa. O endotélio dos vasos sanguíneos localizados na proximidade do material também apresentou reação positiva para osteocalcina (Figura 11).

Análise por meio do EDS após a implantação no sítio subcutâneo

A partir dos espectros EDS do BCP (Figura 12B e 12C) foi possível calcular um valor estimado da relação Ca/P de 1,45 para a região do espectro 1 e de 1,37 para a região do espectro 2.

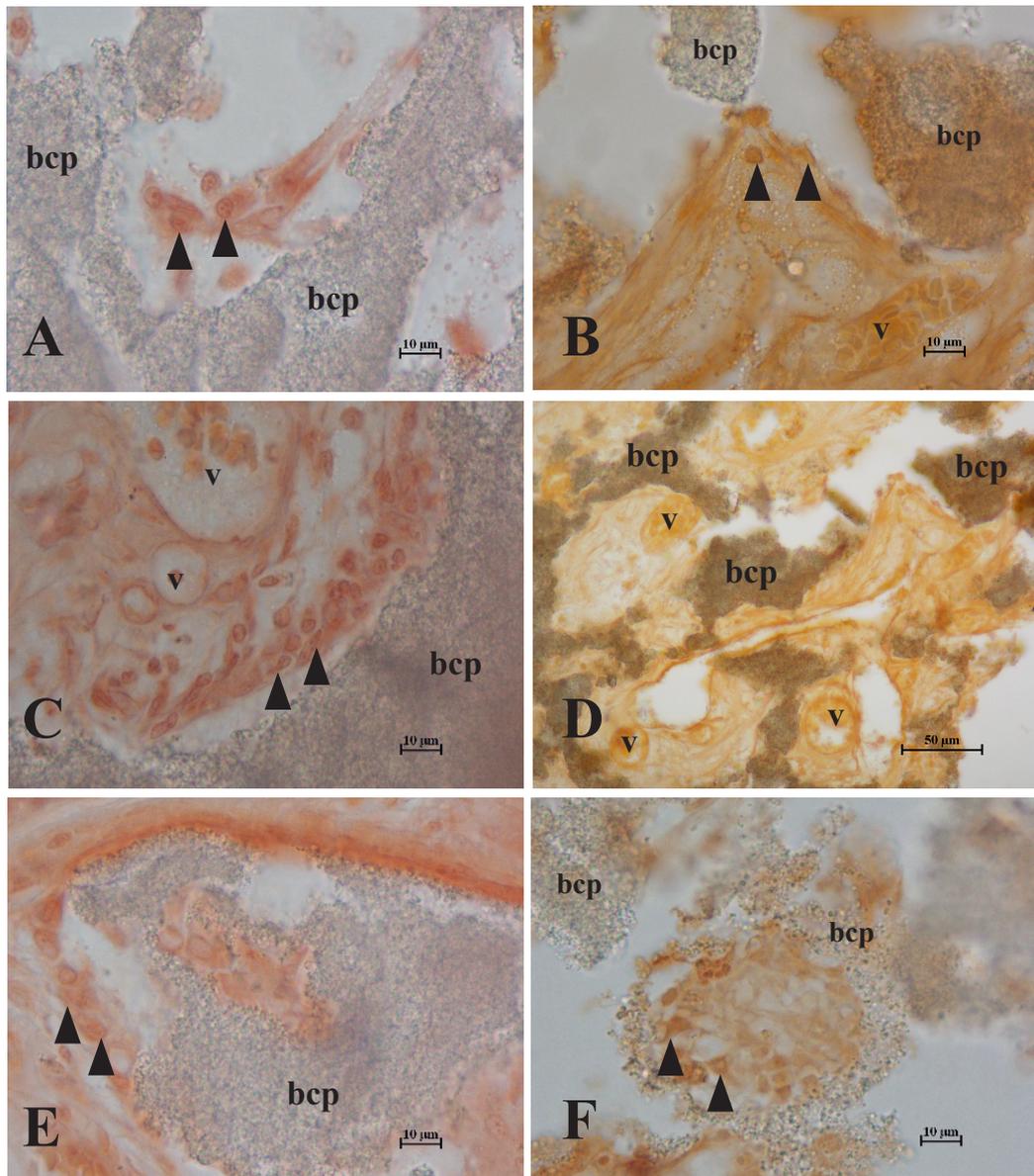


Figura 11. Fotomicrografia do BCP implantados em sítio subcutâneo de ratos após 15 dias (A, C, E) e 45 dias (B, D, F) de implantação imunocoradas com anticorpo anti-osteocalcina. Em (A) pode-se ver células que estão expressando a osteocalcina (cabeça de seta). Em (B) também é possível observar células que imunocoradas pela osteocalcina (cabeça de seta) próximas a vasos sanguíneos (v). Em (C) pode-se observar células que expressam osteocalcina (cabeça de seta) localizadas adjacente a parede interna de um poro, próximas de vasos sanguíneos (v). A imagem (D) mostra imunocoloração por células endoteliais localizadas na parede dos vasos sanguíneos (v). Em (E) é possível observar imunomarcção para osteocalcina em células (cabeça de seta) localizadas na superfície do material (bcp). Em (F) mostra células com coloração positiva para osteocalcina (cabeça de seta), na superfície interna de um poro. Aumento de 400x em (D). Aumento de 1000x (A, B, C, E, F). Imunohistoquímica com anticorpo anti-osteocalcina diluído na concentração de 1:200, revelado por meio de DAB e peroxidase.

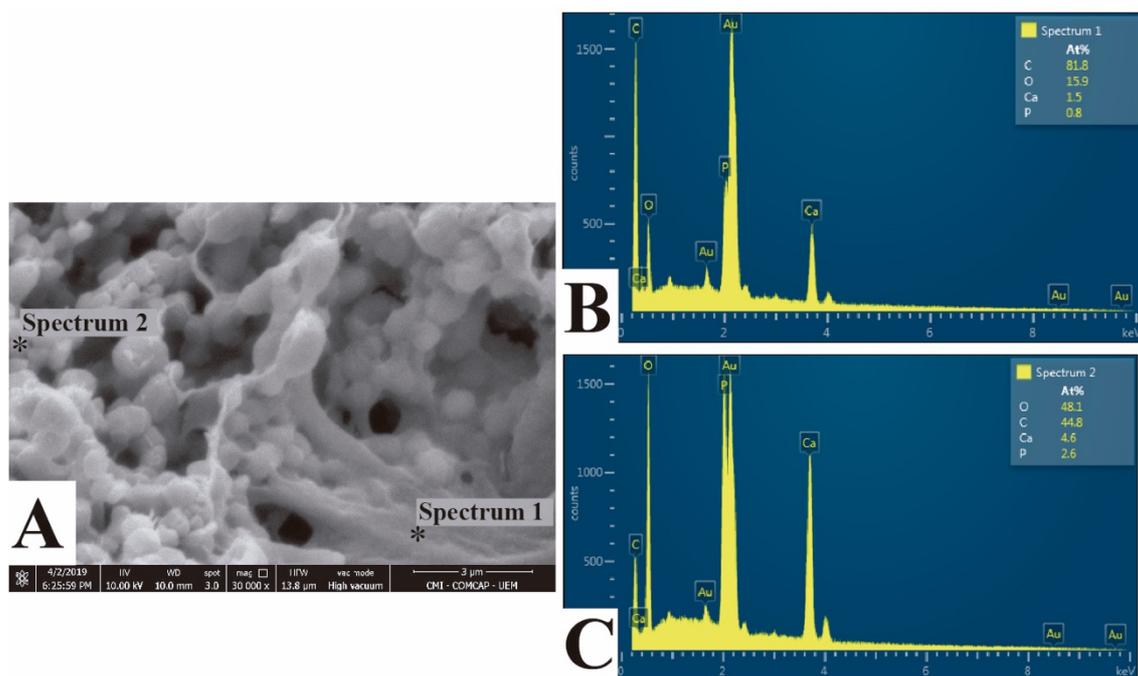


Figura 12. Espectros EDS obtidos de eletromicrografias de varredura de discos de BCP após 45 dias de implantação no tecido subcutâneo de ratos Wistar. Em (A) observa-se a eletromicrografia de varredura do disco de BCP e os locais onde foram obtidos os dois espectros EDS que estão em (B) e (C). Os espectros EDS permitem calcular a relação Ca/P para as duas regiões. O valor calculado para o spectrum 1 foi de 1,45 (B), e para o spectrum 2 foi de 1,37 (C).

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, o potencial osteoindutor de discos de BCP e de BCP/Nb₂O₅, na forma de arcabouços macroporosos foi avaliado após permanecerem implantados nos tecidos subcutâneo e subfascial (sítios ectópicos) em ratos Wistar, pelos períodos de 15, 45 e 60 dias. A composição química dos materiais e a morfologia das cerâmicas porosas foram avaliadas para determinar se houve o desenvolvimento de tecido ósseo no interior dos poros. Os excelentes resultados alcançados por estas biocerâmicas em estudos anteriores, *in vivo*, em sítio de regeneração óssea (KIYOCHI JUNIOR, 2013; CANDIDO, 2014; PASQUINELLI, 2015) impulsionaram este estudo em sítios ectópicos.

A hidroxiapatita (HAp), o β -tricálcio fosfato (β -TCP) e, principalmente, a associação destes dois materiais em diferentes proporções, constituindo os BCPs (fosfatos de cálcio bifásicos), estão entre os materiais mais empregados para substituir os enxertos ósseos (TANG *et al.*, 2018). Os BCPs têm mostrado melhores resultados no organismo do que a HAp ou o β -TCP empregados isoladamente (YUBAO *et al.*, 1997; LIU e LUN, 2012) porque a HAp pura é reabsorvida muito lentamente *in vivo* (1 a 2% ao ano) e apresenta alta fragilidade devido às propriedades mecânicas pobres. No que diz respeito ao uso do β -TCP isoladamente, apresenta piores resultados do que o BCP pois sofre reabsorção mais rápida (LIU e LUN, 2012) via dissolução e fragmentação (CHEN *et al.*, 2015). Todavia, estas duas substâncias apresentam boas propriedades quando utilizadas num mesmo material pois a HAp proporciona um ambiente favorável para a proliferação e diferenciação dos osteoblastos, enquanto o β -TCP fornece íons cálcio e fósforo, úteis para diferenciação e a maturação dos osteoblastos e ambos são capazes de estimular a formação de novo osso (TANG *et al.*, 2018).

As cerâmicas de fosfato de cálcio (Ca-P) são reconhecidas como excelentes enxertos ósseos devido à sua boa biocompatibilidade e osteocondutividade (LANGER e VACANTI, 1993; HENCH e POLAK, 2002). A descoberta da osteoindutividade das cerâmicas de fosfato de cálcio estabeleceu um paradigma duradouro de conferir atividade biológica regenerativa a materiais com características estruturais cuidadosamente projetadas (TANG *et al.*, 2018). Materiais osteoindutores são aqueles que induzem a diferenciação de células-tronco locais em células de linhagem osteogênica. Tais materiais devem ser apropriados para substituir, no futuro, os auto-enxertos, ainda considerados como o “padrão-ouro” (HABIBOVIC e DE GROOT, 2007).

A formação ectópica de tecido ósseo, por definição, é o processo de formação óssea fora do seu microambiente típico. Existem numerosos modelos em animais, para a indução da formação ectópica de osso com o intuito de examinar o processo de osteogênese ou avaliar o “potencial osteogênico” de um dado implante (SCOTT *et al.*, 2012).

As cerâmicas de fosfato de cálcio sintéticas são capazes de induzir osteogênese quando implantadas em sítios não ósseos, mas essa habilidade pode variar de acordo com o material testado (LE NIHOANNEN *et al.*, 2005; FELLAH *et al.*, 2008) e com o modelo animal utilizado (YANG *et al.*, 1996.). Animais como cães, porcos, macacos, babuínos, cabras, coelhos e camundongos já foram avaliados (RIPAMONTI, 1991; RIPAMONTI, 1996; YANG *et al.*, 1997; YUAN *et al.*, 2002; YUAN *et al.*, 2006a; YE *et al.*, 2007; KASTEN *et al.*, 2008; LE NIHOANNEN *et al.*, 2008). Com menor frequência são encontrados estudos em ratos (YANG *et al.*, 1996). Os métodos mais empregados em roedores incluem os implantes subcutâneo, intramuscular e a cápsula renal (ASATRIAN, CHANG e JAMES, 2014).

O primeiro experimento após o qual o conceito de osteoindução foi usado para descrever a formação ectópica de osso foi realizado por URIST *et al.*, em 1965, que mostraram a formação de matriz óssea por meio de observação histológica, após o implante de matriz óssea descalcificada (DMB – *decalcified bone matrix*) ou BMPs (*bone morphogenetic protein*) no músculo de camundongos, ratos e cobaias (TANG *et al.*, 2018).

Estudos em cães mostraram que a diferenciação na região dos poros de cerâmicas de fosfato de cálcio seguem um processo complexo envolvendo invasão de tecido conjuntivo fibrovascular nos primeiros 15 dias de observação, aparecimento de células mesenquimais polimórficas próximas aos vasos invasores e em interface com as cerâmicas por volta dos 30 dias, a diferenciação de osteoblastos, a formação de matriz óssea em contato direto com a superfície das cerâmicas por volta de 45 dias, e finalmente a remodelação do tecido conjuntivo fibroso em uma quantidade de osso por volta dos 60, 90 e 120 dias (YANG *et al.*, 1996). De acordo com Daculsi e Layrolle (2004), os primeiros eventos biológicos após o implante de cerâmicas de BCP são a difusão de fluido biológico, seguido pela colonização celular. Nos primeiros estágios, estas células são macrófagos, seguidos por células mesenquimais, fibroblastos e células angiogênicas. Este evento é acompanhado pela conversão fenotípica de tecido conjuntivo em osso normal. (GLOWACKI, 2005).

No presente estudo, nos primeiros quinze dias após o implante das cerâmicas, em ambos os sítios, observou-se a colonização dos poros por tecido conjuntivo frouxo rico em células e vasos sanguíneos. As características descritas por Yang e colaboradores (YANG *et al.*, 1996) até os 45 dias de observação, apoiam os achados deste estudo, em ratos. Aos 60 dias de observação, que representa o limite máximo de nossa observação, nenhum dos animais, em nenhum dos sítios de implante apresentou remodelação e deposição óssea lamelar, característica de osso maduro. A histologia revelou a migração de células e vasos sanguíneos e a evolução na deposição de colágeno ao redor de vasos sanguíneos e na superfície dos materiais, caracterizando um tecido ósseo imaturo (osteóide). As evidências de que houve deposição de osteóide foram reforçadas pela positividade para osteocalcina, no sítio subcutâneo, examinados por imuno histoquímica em amostras de 15 dias. A osteocalcina, conhecida por *Bone Gla Protein* (BGP), é produzida pelos osteoblastos e está presente nos estágios iniciais da osteogênese, sendo detectada antes que o processo de mineralização se inicie (NAKAMURA *et al.*, 2009). Foi possível observar a positividade para osteocalcina em algumas células localizadas na superfície interna do poro e na matriz extracelular depositada em seu interior. As células endoteliais também expressaram esta proteína. Embora não tenha ocorrido a formação de tecido ósseo maduro, a migração celular, a deposição/organização do colágeno e a positividade para osteocalcina dão fortes indícios de que os materiais possuem potencial osteoindutor.

Além disso, a análise por EDS de amostras de BCP implantadas em sítio subcutâneo e analisadas após 45 dias de observação permitiu concluir que ocorreu a deposição de matriz orgânica (com alto conteúdo do elemento carbono) e que apresenta um conteúdo de cálcio e fósforo e uma relação Ca/P calculada de aproximadamente 1,45. Desta forma, fica evidente a produção e deposição de um material que apresenta conteúdo de cálcio e fósforo na superfície do material implantado em sítio ectópico sem a utilização simultânea de fatores de crescimento ou de células-tronco exógenos, reforçando a observação do potencial osteoindutor do biomaterial.

Outros autores relatam experimentos com coelhos, nos quais não observaram o desenvolvimento de osteóide ou osso após implante subcutâneo ou intramuscular. Não encontraram evidências de formação óssea ectópica, em ratos ou coelhos, induzida por biocerâmicas macroporosas bifásicas de fosfato de cálcio (MBCP – *macroporous biphasic calcium phosphate*). Nestes pequenos animais, a formação de tecido ósseo *de novo* somente foi observada quando foi adicionada medula óssea autógena ao MBCP.

Ainda assim, a formação óssea ectópica foi limitada a uma pequena quantidade de macroporos (DACULSI e LAYROLLE, 2004).

A partir do final dos anos 1980 foi demonstrado que, por meio da otimização das características das cerâmicas de fosfato de cálcio, poderia haver indução da formação óssea, mais do que pela adição de células e fatores de crescimento (TANG *et al.*, 2018).

A composição de fase é um dos fatores mais importantes na determinação da osteoindutividade das cerâmicas de fosfato de cálcio (BARRADAS *et al.*, 2011; SAMAVEDI, WHITTINGTON e GOLDSTEIN, 2013). Embora não seja uma regra fixa, quanto maior a solubilidade do material, maior seu potencial osteoindutor. Uma solubilidade ótima pode ser alcançada com proporções variadas de uma mistura de HAp pouco solúvel e β -TCP muito solúvel (TANG *et al.*, 2018). Wang e colaboradores, em 2014, demonstraram que um material bifásico contendo 30% de HAp e 70% de β -TCP foi mais osteoindutor e promoveu maior expressão de BMP-2, em comparação com BCP constituído por 70% HAp e 30% de β -TCP, e até mesmo em comparação com o β -TCP puro e HAp pura (WANG *et al.*, 2014a).

As análises das cerâmicas por DRX, FTIR e micro-Raman mostraram que o BCP, utilizado neste estudo, era composto por 88,79% de HAp e 11,21% de β -TCP e o BCP/Nb₂O₅ que ao final do processamento apresentou 34% de β -TCP (além de 32,6% de PNB₉O₂₅ – óxido de fósforo nióbio e 33,4% de CaNb₂O₆, conhecido por fersmita). A literatura não deixa claro qual é a melhor razão entre as fases que compõem os materiais (EBRAHIMI, BOTELHO e DOROZHKIN, 2017) mas, de acordo com estudos anteriores, tanto o BCP como o BCP/Nb₂O₅ são biocompatíveis, osteocondutores e favoreceram a formação de tecido ósseo, quando implantados em sítio ortotópico (KYIOCHI JÚNIOR, 2013; CANDIDO, 2014; PASQUINELLI, 2015). Neste estudo, a diferença em termos de composição dos dois materiais avaliados parece não influenciar a resposta tecidual após a implantação em sítio subcutâneo ou em sítio subfascial.

Após a identificação das fases dos materiais e dos respectivos valores percentuais, foi possível calcular um valor estimado da razão Ca/P, para ambos os materiais, antes de serem implantados nos sítios ectópicos. O BCP apresenta uma razão Ca/P calculada igual a 1,64 caracterizando-o como material ligeiramente deficiente em cálcio, quando comparado com a hidroxiapatita estequiométrica (razão Ca/P igual a 1,67). Os materiais de fosfato de cálcio que apresentam uma deficiência em cálcio têm sido bastante estudados no que diz respeito aos enxertos ósseos pois apresentam uma semelhança estrutural com o osso (YUFU *et al.*, 2015; ETMINANFAR *et al.*, 2016). Outros estudos,

por sua vez, afirmam que os osteoblastos exibem um melhor crescimento quando associados a materiais que apresentam uma razão Ca/P mais alta, em torno de 1,7 (BEST *et al.*, 1997; MONCHAU *et al.*, 2013). Neste contexto, o BCP/Nb₂O₅, apresentou uma razão Ca/P calculada de 1,78. É importante ressaltar que esta razão molar Ca/P de 1,78 pode estar relacionada com a presença de átomos Ca e P localizados em fases do material consideradas estruturais, ou seja, a fersmita (CaNb₂O₆) e óxido de fósforo nióbio (PNb₉O₂₅), as quais contribuem igualmente, em termos percentuais, para a composição do material, mas não participam diretamente como fornecedores de íons para o sítio de implantação.

Acredita-se que os íons Ca⁺² e PO₄⁻³ são importantes para a osteoindução pois o aumento na concentração desses íons tem impacto sobre a proliferação, migração e diferenciação de osteoblastos (DVORAK e RICCARDI, 2004; ZAYZAFOON, 2006; BREITWIESER, 2008; CHAI *et al.*, 2012) e na mineralização da matriz (MURSHED *et al.*, 2005; CHAI *et al.*, 2012). O ambiente iônico pode iniciar a indução óssea por afetar a adsorção de proteínas como fibrinogênio, insulina e colágeno tipo I. Essa adsorção é maior sobre BCP do que sobre HA_P (ZHU *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2010).

Além da composição de fase e do ambiente iônico, os implantes devem exibir duas características para induzir formação ectópica de osso: uma superfície com microporos e uma estrutura de macroporos (DACULSI e LAYROLLE, 2004). Neste sentido, ambos os materiais apresentam características que indicam um potencial osteoindutor.

O BCP e o BCP/Nb₂O₅ se apresentaram muito semelhantes em termos de porosidade, do formato e do diâmetro dos poros e da quantidade de canais interconectantes. Apresentaram boa macroporosidade, mensurada pelo processo de deslocamento de fluido (método de Arquimedes), na ordem 58% para o BCP e 59% para o BCP/Nb₂O₅ que permitiu a difusão de fluidos e a migração de células. Embora não exista um consenso com relação aos parâmetros estruturais ideais dos materiais, uma porosidade entre 40 e 80%, com poros entre 100 e 400 µm, a presença de grande quantidade de microporos (<20 µm) e a existência de canais que conectam os poros internamente e com o meio externo são aspectos importantes para que ocorra a osteoindução (HONG *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012; CAMPANA *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2018).

A comparação dos materiais por meio das eletromicrografias de varredura revelou que os dois materiais são diferentes no que diz respeito a microtopografia da superfície

dos poros (Figura 2). O BCP apresentou um padrão regular constituído por uma estrutura de grão arredondados ligados por pescoços, com um grau maior de microporosidade (Figura 2C). O compósito BCP/Nb₂O₅, por sua vez, apresentou uma diminuição da microporosidade (Figura 2D) que pode estar associada à temperatura de sinterização, de 1080 °C. Nesta temperatura, o BCP está iniciando o processo de coalescência dos grãos, e se observa a formação do “pescoço” que une os grãos. Nesta mesma temperatura o BCP/Nb₂O₅ já ultrapassou o estágio de coalescência dos grãos justificando a menor quantidade de microporosidade observada em sua superfície. Esta diferença, em termos de microrugosidade dos materiais, parece não ter influenciado a resposta do tecido, visto que a análise histológica demonstrou uma morfologia tecidual semelhante, independente do sítio de implantação e do material avaliado.

A função dos poros no arcabouço é acomodar células em crescimento, enquanto o papel do poro interconectado é permitir passagem de fluidos, vasos sanguíneos e células para o centro do arcabouço, bem como adequar a troca de oxigênio e nutrientes (YANG *et al.*, 1996; YUAN *et al.*, 1998; HONG *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012). No caso de materiais osteoindutores, os vasos sanguíneos também têm a função adicional de levar células com capacidade de se diferenciarem em osteoblastos (CHEN *et al.*, 2015).

A microporosidade é importante para que ocorra a penetração dos fluidos corpóreos e fatores osteoindutores, aumenta a rugosidade superficial que favorece a implantação celular e o fenótipo osteogênico, além de diminuir o estresse de cisalhamento sobre as células e sobre as proteínas aderidas à superfície do material (ZHANG *et al.*, 1992; YUAN *et al.*, 1998; HONG *et al.*, 2010; BARRADAS *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012; SAMAVEDI, WHITTINGTON e GOLDESTEIN, 2013).

O estudo mostrou que a reduzida microporosidade da estrutura da cerâmica de BCP/Nb₂O₅ parece não ter sido um fator limitante para a difusão de fluidos, crescimento de vasos e migração de células para as regiões mais íntimas do arcabouço, *in vivo*. A passagem desses componentes pode ter sido favorecida pela composição química do compósito. A maior e mais rápida dissolução da cerâmica, após o seu implante, resultante do maior percentual de β -TCP, pode ter favorecido a dissolução química ou degradação mediada por células (YUAN *et al.*, 2001) e, como consequência, vários espaços seriam criados (EBRAHIMI, BOTELHO e DOROZHKIN, 2017).

6. CONCLUSÃO

Os arcabouços macroporosos do BCP e do BCP/Nb₂O₅ apresentam as condições morfológicas que favorecem a osteogênese ectópica. Houve deposição de matriz semelhante ao tecido osso nos arcabouços de BCP e de BCP/Nb₂O₅ tanto no sítio subcutâneo como em sítio subfascial, mas a dissolução rápida do β-TCP pode ser um dos fatores que não favoreceu a mineralização.

7. REFERÊNCIAS

AOKI, H. Aoki, H. **Medical Applications of Hydroxyapatite**. Ishiyaku Euro America, p. 13-74, 1994.

ARAVAMUDHAN, A.; RAMOS, D. M.; NIP, J.; SUBRAMANIAN, A.; JAMES, R.; HARMON, M. D.; YU, X.; KUMBAR, S. G. Osteoinductive small molecules: growth factor alternatives for bone tissue engineering. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 19, p. 3420-3428, 2013.

ARINZEH, T. L., TRAN, T.; MCALARY, J.; DACULSI, G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. **Biomaterials**, v. 26, n. 17, p. 3631-3638, 2005.

ASATRIAN, G.; CHANG, L.; JAMES, A. W. Muscle Pouch Implantation: an ectopic bone formation model. In: **Animal Models for Stem Cell Therapy**. Human Press, New York, NY, 2014. p. 185-191.

BADR-MOHAMMADI, M. R.; HESARAKI, S.; ZAMANIAN, A. Mechanical properties and in vitro cellular behavior of zinc-containing nano-bioactive glass doped biphasic calcium phosphate bone substitutes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 1, p. 185-197, 2014.

BARRADAS, A. M. C.; YUAN, H. P.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; HABIBOVIC, P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. **European Cells and Materials**, v. 21, p. 407-429, 2011.

BEST, S. M.; PORTER, A. E.; THIAN, E. S.; HUANG, J. Bioceramics: past, presente and for the future. **Journal of European Ceramic Society**, v. 28, n. 7, p. 1319-1327, 2008.

BEST, S.; SIM, B.; KAYSER, M.; DOWNES, S. The dependence of osteoblastic response on variations in the chemical composition and physical properties of hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 8, p. 97-103, 1997.

BOHNER, M.; BAUMGART, F. Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes, **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3569–3582, 2004.

BONADIO, T. G. B. **Biocompósitos de pentóxido de nióbio, hidroxiapatita e β -fosfato tricálcio: produção, caracterização e estudos in vivo como suportes ósseos densos e porosos**. 2014. Tese (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Física. Universidade Estadual de Maringá. Maringá.

BONADIO, T. G. M.; SATO, F.; MEDINA, A. N.; WEINAND, W. R.; BAESSO, L. Bioactivity and structural properties of nanostructured bulk composites containing Nb_2O_5 and natural hydroxyapatite. **Journal of Applied Physics**, v. 113, n. 22, p. 223505, 2013.

BOULER, J. M.; PILET, P.; GAUTHIER, O.; VERRON, E. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: a review of biological response. **Acta Biomaterialia**, v. 53, p. 1-12, 2017.

BREITWIESER, G. E. Extracellular calcium as an integrator of tissue function. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 8, p. 1467-1480, 2008.

CAMPANA, V.; MILANO, G.; PAGANO, E.; BARBA, M.; CICIONE, C.; SALONNA, G.; LATTANZI, W.; LOGROSCINO, G. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, p. 2245-2461, 2014.

CANDIDO, A. G. **Compósito baseado em HA- β TCP- Nb_2O_5 estimula a osteoindução durante o reparo de defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos**. 2014. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Maringá. Maringá.

CAPANEMA, N. S. V.; MANSUR, A. A. P.; CARVALHO, A. M.; SILVA, A. R. P.; CIMINELLI, V. S.; MANSUR, H. S. Niobium-doped hydroxyapatite bioceramics: synthesis, characterization and in vitro cytocompatibility. **Materials**, v. 8, n. 7, p. 4191-4209, 2015.

CHAI, Y. C.; CARLIER, A.; BOLANDER, J.; ROBERTS, S. J.; GERIS, L.; SCHROOTEN, J.; VAN OOSTERWYCK, H.; LUYTE, F. P. Current views on calcium

phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 11, p. 3876-3887, 2012.

CHALLA, V. S. A.; MALI, S.; MISRA, R. D. K. Reduced toxicity and superior cellular response of preosteoblasts to Ti-6Al-7Nb alloy and comparison with Ti-6Al-4V. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101, n. 7, p. 2083-2089, 2013.

CHANG, Y. L.; STANFORD, C. M.; KELLER, J. C. Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: Implication for hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 52, p. 270-278, 2000.

CHEN, Y.; WANG, J.; ZHU, X. D.; TANG, Z. R.; YANG, X.; TAN, Y. F.; FAN, Y. J.; ZHANG, X. D. Enhanced effect of b-tricalcium phosphate phase on neovascularization of porous calcium phosphate ceramics: in vitro and in vivo evidence. **Acta Biomaterialia**, v. 11, p. 435-448, 2015.

CHENG, L.; SHI, Y.; YE, F.; BU, H. Osteoinduction of calcium phosphate biomaterials in small animals. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 3, p. 1254-1260, 2013.

COX, S. C.; JAMSHIDI, P.; GROVER, L. M.; MALLICK, K. K. Preparation and characterization of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 35, p. 106-114, 2014.

DA ROCHA, D. N.; DE ANDRADE, L. G.; DA SILVA, M. H. P. Production and characterization of niobate apatite. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 2, n. 1, p. 24-29, 2013.

DACULSI, G.; LAYROLLE, P. Osteoinductive properties of micro macroporous biphasic calcium phosphate bioceramics. In: **Key Engineering Materials**. Trans Tech Publications, v. 254-256, p. 1005-1008, 2004.

DAVIES, J. E.; HOSSEINI, M. M. Histodynamics of endosseous wound healing. **Bone Engineering**, v. 1, p. 1, 2000.

DE BRUIJN, J. D.; SHANKAR, K.; YUAN, H.; HABIBOVIC, P. In: **Handbook of Bioceramics and Their Applications**. KOKUBO, T. (Ed); London: Woodhead Publishing Ltda. 2008. 199 p.

DE GROOT, K. **Bioceramics of calcium phosphate**. *Journal of Clinical Engineering*, v. 9, n. 1, p. 52. 1984.

DRAGOO, J. L.; LIERBERMAN, J. R.; LEE, R. S.; DEUGARTE, D. A.; LEE, Y.; ZUK, P. A.; HENDRICK, M. H.; BENHAIM, P. Tissue-engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 115, p. 1665–1673, 2005.

DVORAK, M. M.; RICCARDI, D. Ca²⁺ as an extracellular signal in bone. **Cell Calcium**, v. 35, n. 3, p. 249–255, 2004.

EBRAHIMI, M.; BOTELHO, M. G.; DOROZHKIN, S. V. Biphasic calcium phosphate bioceramics (HA/TCP): concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 1293-1312, 2017.

EGGLI, P. S.; MÜLLER, W.; SCHENK, R. K. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 232, p. 127-138, 1988.

ETMINANFAR, M. R.; KHALIL-ALLFI, J.; MONTASERI, A.; VATANKHAH-BARENJI, R. Endothelialization and the bioactivity of Ca-P coatings of different Ca/P stoichiometry electrodeposited on the Nitinol superelastic alloy. **Materials Science and Engineering C**, v. 62, p. 28-35, 2016.

FELLAH, B. H.; GAUTHIER, O.; WEISS, P.; CHAPPARD, D.; LAYROLLE, P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. **Biomaterials**, v. 29, n. 9, p. 1177-1188, 2008.

FILE, Powder Diffraction. International Centre for Powder Diffraction Data. **Swarthmore, Pa., Card**, n. 29-193, 2000.

FRAYSSINT, P.; TROUILLET, J. L.; ROUQUET, N.; AZIMUS, E.; AUTEFAGE, A. Osteointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. **Biomaterials**, v. 14, p. 423-429, 1993.

FURMAN, R.; NICHOLAS, J. J.; JIVOFF, L. Elevation of the serum alkaline phosphatase coincident with ectopic-bone formation in paraplegic patients. **JBJS**, v. 52, p. 1131–1137, 1970.

GAO, C.; DENG, Y.; FENG, P.; MAO, Z.; LI, P.; YANG, B.; DENG, J.; CAO, Y.; SHUAI, C.; PENG, S. Current progress in bioactive ceramic scaffolds for bone repair and regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 4714-4732, 2014.

GLOWACKI, J. A review of osteoinductive testing methods and sterilization processes for demineralized bone. **Cell and Tissue Banking**, v. 6, n. 1, p. 3-12, 2005.

GONZALEZ-FERNANDEZ, T.; SIKORSKI, P.; LEACH, J. K. Bio-instructive materials for musculoskeletal regeneration. **Acta Biomaterialia**, 2019.

HABIBOVIC, P.; DE GROOT, K. Osteoinductive biomaterials – properties and relevance in bone repair. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 25-32, 2007.

HABIBOVIC, P.; KRUYT, M. C.; JUHL, M. V.; CLYENS, S.; MARTINETTI, R.; DOLCINI, L.; THEILGAARD, N.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 10, p. 1363-1370, 2008.

HABIBOVIC, P.; YUAN, H.; VAN DER VALK, C. M.; MEIJER, G.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; DE GROOT, K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. **Biomaterials**, v. 26, n. 17, p. 3565-3575, 2005.

HARDCASTLE, F. D.; WACHS, I. E. Determination of niobium-oxygen bond distances and bond orders by Raman spectroscopy. **Solid State Ionics**, v. 45, n. 3-4, p. 201-213, 1991.

HEINEN JR, J. H.; DABBS, G. H.; MASON, H. A. The experimental production of ectopic cartilage and bone in the muscles of rabbits. **JBJS**, v. 31, n. 4, p. 765-775, 1949.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-generation biomedical materials. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1014-1017, 2002.

HING, K. A. Bioceramic bone graft substitutes: Influence of porosity and chemistry. **International Journal of Applied Ceramic Technology**, v. 2, p. 184-199, 2005.

HING, K. A.; BEST, S. M.; BONFIELD, W. Characterization of porous hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 10, p. 135-145, 1999.

HING, K. A.; BEST, S. M.; TANNER, K. E.; BONFIELD, W.; REVELL, P. A. Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. **Journal of**

Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, v. 68, p. 187-200, 2004.

HOLLINGER, J. O.; BATTESTONE, G. C. Biodegradable bone repair materials. **Clinical Orthopaedics**, v. 207, p. 290-305, 1980.

HONG, Y.; FAN, H.; LI, B.; GUO, B.; LIU, M.; ZHANG, X. Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphate nanoceramics. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 70, n. 3-6, p. 225-242, 2010.

HUANG, B. X.; WANG, K.; CHURCH, J. S.; LI, Y. S. Characterization of oxides on niobium by Raman and infrared spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 44, n. 15, p. 2571-2577, 1999.

ISHACK, S.; MEDIERO, A.; WILDER, T.; RIXXI, J. L.; CRONSTEIN, B. N. Bone regeneration in critical bone defects using three-dimensionally printed β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffolds is enhanced by coating scaffolds with either dipyridamole or BMP-2. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 105B, n. 2, p. 366-375, 2017.

JARCHO, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 157, p. 259-278, 1981.

JONES, J. R.; ATWOOD, R. C.; POOLOGAZUNDAAMPILLAI, G.; YUE, S.; LEE, P. D. Quantifying the 3D macrostructure of tissue scaffolds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, p. 463-471, 2009.

JORDANA, F.; LE VISAGE, C.; WEISS, P. Bone substitutes. **Medecine Sciences: M/S**, v. 33, n. 1, p. 60-65, 2017.

KASTEN, P.; BEYEN, I.; NIEMEYER, P.; LUGINBÜHL, R.; BOHNER, M.; RICHTER, W. Porosity and pore size of β -tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 6, p. 1904-1915, 2008.

KHAN, S. N.; TOMIN, E.; LANE, J. M. Clinical applications of bone graft substitutes. **Orthopedic Clinics**, v. 31, n. 3, p. 389-398, 2000.

KLAWITTER, J. J.; BAGWELL, J. G.; WEINSTEIN, A. M.; SAUER, B. W. An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 10, p. 311-323, 1976.

KLEIN, C. P. A. T.; DRIESSEN, A. A.; DE GROOT, K.; VAN DEN HOOFF, A. Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 17, p. 769-784, 1983.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, p. 2907-2915, 2006.

KUBOKI, Y.; TAKITA, H.; KOBAYASHI, D.; TSURUGA, E.; INOUE, M.; MURATA, M.; NAGAI, N.; DOHI, Y.; AHGUSHI, H. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures topology of osteogenesis. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials**, v. 39, p. 190-199, 1998.

KURASHINA, K.; KURITA, H.; WU, Q.; OHTSUKA, A.; KOBAYASHI, H. Ectopic osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits. **Biomaterials**, v. 23, p. 407-412, 2002.

KYIOCHI JÚNIOR, J. K. **Estudo *ex vivo* da cerâmica bifásica composta de hidroxiapatita beta fosfato tricálcio (HA- β -TCP) e pentóxido de nióbio (Nb₂O₅) como biomaterial empregado para o reparo ósseo em defeitos de calvária**. 2013. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada. Universidade Estadual de Maringá. Maringá.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-926, 1993.

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 11, p. 4742-4753, 2008.

LEGEROS, R. Z.; DACULSI, G. **Handbook in Bioactive Ceramics**. YAMAMURO, T.; HENCH, L.; WISON-HENCH, J. (Ed). CRC Press: Boca Raton, v. 2, p. 17, 1990.

LEGEROS, R. Z.; LIN, S.; ROHANIZADEH, R.; MIJARES, D.; LEGEROS, J. P. Biphasic calcium phosphate bioceramics: Preparation, properties and applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, p. 201-209, 2003.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 395, p. 81-98; 2002.

LE NIHOUANNEN, D.; DACULSI, G.; SAFFARZADEH, A.; GAUTHIER, O.; DELPACE, S.; PILET, P.; LAYROLLE, P. Ectopic bone formation by microporous

calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. **Bone**, v. 36, n. 6, p. 1086-1093, 2005.

LE NIHOANNEN, D.; SAFFARZADEH, A.; GAUTHIER, O.; MOREAU, F.; PILET, P.; SPAETHE, R.; LAYROLLE, P.; DACULSI, G. Bone tissue formation in sheep muscles induced by a biphasic calcium phosphate ceramic and fibrin glue composite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n.2, p. 667-675, 2008.

LEVI, B.; NELSON, E. R.; LI, S.; JAMES, A. W.; HYUN, J. S.; MONTORO, D. T.; LEE, M.; GLOZBACH, J. P.; COMMONS, G. W.; LONGAKER, M. T. Dura mater stimulates human adipose-derived stromal cells to undergo bone formation in mouse calvarial defects. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 29, p. 1241–1255, 2011.

LI, S.; DE WIJN, J. R.; LI, J.; LAYROLLE, P.; DE GROOT, K. Macro porous biphasic calcium phosphate scaffold with high permeability/porosity ratio. **Tissue Engineering**, v. 9, p. 535-548, 2003.

LIMA, W. M. **Materiales compuestos de matriz acero inoxidable austenítico reforzado com intermetálicos: comportamiento mecânico, a corrosión y desgaste**. 1999. Tese (Doutorado). Universidad Carlos III de Madrid. Madrid.

LIVINGSTON, T. L.; GORDON, S.; ARCHAMBAULT, M.; KADIYALA, S.; MACINTOSH, K.; SMITH, A.; PETER, S. J. Mesenchymal stem cells combined with biphasic calcium phosphate ceramics promote bone regeneration. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, n. 3, p. 211-218, 2003.

LIU, B.; LUN, D. X. Current applications of β -tricalcium phosphate composites in orthopaedics. **Orthopaedic Surgery**, v. 4, n. 3, p. 139-144, 2012.

LU, J. X.; FLAUTRE, B.; ANSELME, K.; HARDOUIN, P.; GALLUR, A.; DESCAMPS, M.; THIERRY, B. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 10, p. 111-120, 1999.

MA, J.; YANG, F.; BOTH, S. K.; PRINS, H. J.; HELDER, M. N.; PAN, J.; CUI, F. Z.; JANSEN, J. A.; VAN DEN BEUCKEN, J. J. P. Bone forming capacity of cell-and growth factor-based constructs at different ectopic implantation sites. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 2, p. 439-450, 2015.

MANGANO, C.; SINJARI, B.; SHIBLI, J. A.; MANGANO, F.; HAMISCH, S.; PIATTELLI, A.; PERROTTI, V.; IEZZI, G. A human clinical, histological, histomorphometrical, and radiographical study on biphasic HA-BETA-TCP 30/70 in

maxillary sinus augmentation. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 17, n. 3, p. 610-618, 2015.

MCCONNELL, A. A.; ADERSON, J. S.; RAO, C. N. R. Raman spectra of niobium oxides. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 32, n. 5, p. 1067-1076, 1976.

MEDTECH, Evaluate. **World Preview 2018: Outlook to 2024**, 2018.

MIRON, R. J.; ZHANG, Y. F. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. **Journal of Dental Research**, v. 91, n. 8, p. 736-744, 2012.

MOREIRA, R. L.; TEIXEIRA, N. G.; ANDREETA, M. R. B.; HERNANDES, A. C.; DIAS, A. Polarized micro-Raman scattering of CaNb_2O_6 single crystal fibers obtained by laser heated pedestal growth. **Crystal Growth & Design**, v 10, n. 4, p. 1569-1573, 2010.

MONCHAU, F.; HIVART, Ph.; GENESTIE, B.; CHAI, F.; DESCAMPS, M.; HILDEBRAND, H. F. Calcite as a bone substitute. Comparison with hydroxyapatite and tricalcium phosphate with regard to the osteoblastic activity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 1, p. 490-498, 2013.

MURPHY, W.; BLACK, J.; HASTINGS, G. (Ed). **Handbook of Biomaterial Properties**. New York: Springer, 2016.

MURSHED, M.; HARMEY, D.; MILLÁN, J. L.; MCKEE, M. D.; KARSENTY, G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. **Genes & Development**, v. 19, n. 9, p. 1093-1104, 2005.

NAKAMURA, A.; DOHI, Y.; AKAHANE, M.; OHGUSHI, H.; NAKAJIMA, H.; FUNOAOKA, H.; TAKAKURA, Y. Osteocalcin secretion as an early marker of *in vitro* osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 15, n. 2, p. 169-180, 2009.

NASCIMENTO, W. J.; BONADIO, T. G. M.; FREITAS, V. F.; WEINAND, W. R.; BAESSO, M. L.; LIMA, W. M. Nanostructured Nb_2O_5 -natural hydroxyapatite formed by the mechanical alloying method: A bulk composite. **Materials Chemistry and Physics**, v. 130, n. 1-2, p. 84, 2011.

OBATA, A.; TAKAHASHI, Y.; MIYAJIMA, T.; UEDA, K.; NARUSHIMA, T.; KASUGA, T. Effects of niobium ions released from calcium phosphate invert glass containing Nb_2O_5 on osteoblast-like cell functions. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 4, n. 10, p. 5684-5690, 2012.

OWEN, G. R.; DARD, M.; LARJAVA, H. Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. **Journal of Biomedical Material Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 106, n. 6, p. 2493-2512, 2018.

PASQUINELLI, H. B. A. **Compósito de hidroxiapatita-pentóxido de nióbio β HAP-NB na forma de arcabouço induz regeneração óssea em defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos.** 2015. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada. Universidade Estadual de Maringá. Maringá.

PENEL, G.; LEROY, G.; REY, C.; BRES, E. MicroRaman spectral study of the PO_4 and CO_3 vibrational modes in synthetic and biological apatites. **Calcified Tissue International**, v. 63, n. 6, p. 475-481, 1998.

PENG, H.; USAS, A.; HANNALLAH, D.; OLSHANSKI, A.; COOPER, G. M.; HUARD, J. Noggin improves bone healing elicited by muscle stem cells expressing inducible BMP4. **Molecular Therapy**, v. 12, n. 2, p. 239-246, 2005.

QI, X.; HUANG, Y.; HAN, D.; ZHANG, J.; CAO, J.; JIN, X.; HUANG, J.; LI, C.; WANG, T. Three-dimensional poly (ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite/collagen scaffolds incorporating bone marrow mesenchymal stem cells for the repair of bone defects. **Biomedical Materials**, v. 11, n. 2, p. 025005, 2016.

RATNER, B.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. An introduction to materials in medicine. **Biomaterials Science**, Elsevier, Canadá, 2013.

RIPAMONTI, U. Bone induction in nonhuman primates. An experimental study on the baboon. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 269, p. 284-294, 1991.

RIPAMONTI, U.; CROOKS, J.; KHOALI, L.; RODEN, L. The induction of bone formation by coral-derived calcium carbonate/hydroxyapatite constructs. **Biomaterials**, v. 30, n. 7, p. 1428-1439, 2009.

RIPAMONTI, U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. **Biomaterials**, v. 17, n. 1, p. 31-35, 1996.

RIPAMONTI, U.; VAN DEN HEEVER, B.; VAN WYK, J. Expression of the osteogenic phenotype in porous hydroxyapatite implanted extraskelally in baboons. **Matrix**, v. 13, p. 491-502, 1993.

RISTIĆ, M.; POPOVIĆ, S.; MUSIĆ, S. Sol-Gel Synthesis and characterization of Nb_2O_5 powders. **Materials Letters**, v. 58, n. 21, p. 2658-2663, 2004.

RODRIGUEZ, C. A.; LARA-PADILHA, H.; DEAN, D. Bioceramics for musculoskeletal regenerative medicine: materials and manufacturing process

compatibility for synthetic bone grafts and medical devices. **3D Printing and Biofabrication**, p. 161-193, 2018.

ROISNEL, T.; RODRIGUEZ-CARVAJAL, J.; DELHEZ, R.; MITTENMEIJER, E. J. WinPLOT: a Windows tool for powder diffraction patterns analysis. In: **Materials Science Forum**. Transtec Publications; 1999, 2001, p. 118-123.

ROSE, F. R. A. J.; OREFFO, R. O. C. Bone tissue engineering: hope vs hype. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, p. 1-7, 2002.

ROSETI, L.; PARISI, V.; PETRETTA, M.; CAVALLO, C.; DESANDO, G.; BARTOLOTTI, I.; GRIGOLO, B. Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. **Materials Science and Engineering: C**, v. 78, p. 1246-1262, 2017.

SANZANA, E. S.; NAVARRO, M.; GINEBRA, M. P.; PLANELL, J. A.; OJEDA, A. C.; MONTECINOS, H. A. Role of porosity and pore architecture in the in vivo bone regeneration capacity of biodegradable glass scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, n. 6, p. 1767-1773, 2014.

SAMAVEDI, S.; WHITTINGTON, A. R.; GOLDSTEIN, A. S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 9, p. 8037-8045, 2013.

SCHOPPER, C.; ZIYA-GHAZVINI, F.; GORIWODA, W.; MOSER, D.; WANSCHITZ, F.; SPASSOVA, E.; LAGOIANNIS, G.; AUTERITH, A.; EWERS, R. HA/TCP compounding of a porous CaP biomaterial improves bone formation and scaffold degradation: A long-term histological study. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 74, p. 458-467, 2005.

SCOTT, M. A.; LEVI, B.; ASKARINAM, A.; NGUYEN, A.; RACKOHN, T.; TING, K.; SOO, C.; JAMES, A. W. Brief review of models of ectopic bone formation. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 5, p. 655-667, 2012.

SEGAR, C. E.; OGLE, M. E.; BOTCHWEY, E. A. Regulation of angiogenesis and bone regeneration with natural and synthetic small molecules. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 19, p. 3403-3419, 2013.

SHIMAZAKI, K.; MOONEY, V. Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 3, n. 3, p. 301-310, 1985.

SINGH, G. K.; VERMA, V. Progressive osseous heteroplasia in a 10-year-old male child. **Indian Journal of Orthopaedics**, v. 45, p. 280–282, 2011.

STANDARD, A. S. T. M. Standard test method for water absorption, bulk density, apparent density and the apparent specific gravity of fired whiteware products. **Annual Book ASTM Standard**, v. 15, p. 112-113, 2006.

TAMAI, M.; ISAMA, K.; NAKOAKA, R.; TSUCHIYA, T. Synthesis of a novel b-tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties. **Journal of Artificial Organs**, v. 10, n. 1, p. 22-28, 2007.

TANG, Z.; LI, X.; TAN, Y.; FAN, H.; ZHANG, X. The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics. **Regenerative Biomaterials**, v. 5, n. 1, p. 43-59, 2018.

TANG, Z.; TAN, Y.; NI, Y.; WANG, J.; ZHU, X.; FAN, Y.; CHEN, X.; YANG, X.; ZHANG, X. Comparison of ectopic bone formation process induced by four calcium phosphate ceramics in mice. **Materials Science and Engineering: C**, v. 70, p. 1000-1010, 2017.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 3698, p. 893-899, 1965.

VALLET-REGÍ, M.; SALINAS, A. J. Ceramics as bone repair materials. In: PAWELEC, K.; PLANELL, J. A. (Ed). **Bone repair biomaterials: regeneration and clinical applications**. 2^a ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2019. cap. 6, p. 141-178.

VISSER, R.; RICO-LLANOS, G. A.; PULKKINEN, H.; BECERRA, J. Peptides for bone engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 244A, p. 122-135, 2016.

WANG, J.; CHEN, Y.; ZHU, X.; YUAN, T.; TAN, Y.; FAN, Y.; ZHANG, X. Effect of phase composition on protein adsorption and osteoinduction of porous calcium phosphate ceramics in mice. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102A, n. 12, p. 4234-4243, 2014a.

WANG, L.; ZHANG, B.; BAO, C.; HABIBOVIC, P.; HU, J.; ZHANG, X. Ectopic osteoid and bone formation by three calcium-phosphate ceramics in rats, rabbits and dogs. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107044, 2014b.

WANG, Z.; TANG, Z.; QING, F.; HONG, Y.; ZHANG, X. Applications of calcium phosphate nanoparticles in porous hard tissue engineering scaffolds. **Nano: Brief Reports and Reviews**, v. 7, n. 4, p. 1230004, 2012.

WEINAND, W. R. **Hidroxiapatita natural obtida por calcinação de osso de peixe e sua aplicação na produção de materiais compósitos cerâmicos biocompatíveis**. 2009. Tese (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Física. Universidade Estadual de Maringá. Maringá.

WLODARSKI, K. H.; REDDI, A. H. Importance of skeletal muscle environment for ectopic bone induction in mice. **Folia Biologica**, v. 34, n. 4, p. 425-434, 1986.

WOZNEY, J. M.; ROSEN, V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene Family in bone formation and repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 346, p. 26-37, 1998.

YAMAMOTO, A.; HONMA, R.; SUMITA, M. Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials**, v. 39, n. 2, p. 331-340, 1998.

YAMAMOTO, T.; HENCH, L. L.; WILSON, J. **An introduction to Bioceramics**, World Scientific, Singapore, p. 89-103, 1993.

YANG, Z. J.; YUAN, H.; ZOU, P.; TONG, W.; QU, S.; ZHANG, X. D. Osteogenic responses to extraskeletally implanted synthetic porous calcium phosphate ceramics: an early stage histomorphological study in dogs. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 8, n. 11, p. 697-701, 1997.

YANG, Z.; YUAN, H.; TONG, W.; ZOU, P.; CHEN, W.; ZHANG, X. Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animal. **Biomaterials**, v. 17, n. 22, p. 2131-2137, 1996.

YE, F.; LU, X.; LU, B.; WANG, J.; SHI, Y.; ZHANG, L.; CHEN, J.; LI, Y.; BU, H. A long-term evaluation of osteoinductive HA/beta-TCP ceramics in vivo: 4.5 years study in pigs. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 11, p. 2173-2178, 2007.

YOUNG, R. A. **The Rietveld Method**. International Union of Crystallography, 1993.

YUAN, H.; DE BRUIJN, J. D.; LI, Y.; FENG, J.; YANG, Z.; DE GROOT, K.; ZHANG, X. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous α -TCP e β -TCP. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 12, p. 7-13, 2001.

YUAN, H.; FERNANDES, H.; HABIBOVIC, P.; DE BOER, J.; BARRADAS, A. M.; DE RUITER, A.; WALSH, W. R.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; DE BRUIJN, J. D. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. **Proceedings National Academy of Sciences**, v. 107, n. 31, p. 13614-13619, 2010.

YUAN, H.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; DE GROOT, K.; DE BRUIJN, J. D. Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 6, p. 1607-1615, 2006a.

YUAN, H.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; DE GROOT, K.; DE BRUIJN, J. D. A comparison of bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) implanted in muscle and bone of dogs at different time periods. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 78, n. 1, p. 139-147, 2006b.

YUAN, H.; VAN DEN DOEL, M; LI, S.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; DE GROOT, K.; DE BRUIJN, J. D. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 13, n. 12, p. 1271-1275, 2002.

YUAN, H.; YANG, Z.; LI, Y.; ZHANG, X.; DE BRUIJN, J. D.; DE GROOT, K. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 9, n. 12, p. 723-726, 1998.

YUAN, H.; ZOU, P.; YANG, Z.; ZHANG, X. Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 9, p. 717-721, 1998.

YUBAO, L.; XINGDONG, Z.; DE GROOT, K. Hydrolysis and phase transition of alpha tricalcium phosphate cement. **Biomaterials**, v. 18, n. 10, p. 737-741, 1997.

YUFU, R.; ZHOU, H.; NABIYOUNI, M.; BHADURI, S. B.; Rapid coating of AZ31 magnesium alloy with calcium deficient hydroxyapatite using microwave energy. **Materials Science and Engineering C**, v. 49, p. 364-372, 2015.

ZAYZAFOON, M. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 97, n. 1, p. 56-70, 2006.

ZHANG, X. D.; ZHOU, J. M.; CHEN, W. Q.; WU, C.; ZHOU, P. A calcium phosphate, bioceramics with osteoinduction. In: **The 4th World Biomaterials Congress, Berlin, Germany**. 1992. p. 24-28.

ZHANG, J.; SUN, L.; LUO, Z.; BARBIERI, D.; DE BRUIJN, J. D.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; MORONI, L.; YUAN, H. Cells responding to surface structure of calcium phosphate ceramics for bone regeneration. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 11, n. 11, p. 3273-3283, 2017.

ZHU, X. D.; ZHANG, H. J.; FAN, H.S.; LI, W.; ZHANG, X. D. Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 4, p. 1536-1541, 2010.

ZHU, X.; FAN, H.; LI, D.; XIAO, Y.; ZHANG, X. Protein adsorption and zeta potentials of a biphasic calcium phosphate ceramic under various conditions. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 82, n. 1, p. 65-73, 2007.

ANEXOS



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Estadual de Maringá

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise do potencial osteogênico de um compósito a base de hidroxiapatita-pentóxido de nióbio em sítio ectópico.", protocolado sob o CEUA nº 7351180216, sob a responsabilidade de **Luzmarina Hernandes e equipe; Alessandro Gavazzoni; Karina Morikawa; Marcelo Augusto Seron; Sidney Barnabé Peres** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 15/04/2016.

We certify that the proposal "Analysis of the osteogenic potential of an hydroxyapatite-niobium pentoxide based composite in ectopic defect.", utilizing 80 Heterogenics rats (80 males), protocol number CEUA 7351180216, under the responsibility of **Luzmarina Hernandes and team; Alessandro Gavazzoni; Karina Morikawa; Marcelo Augusto Seron; Sidney Barnabé Peres** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 04/15/2016.

Vigência da Proposta: de 04/2016 a 04/2019 Área: Ciências Morfológicas

Procedência: Biotério Central da UEM

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 90 a 90 dias

N: 80

Linhagem: Wistar

Peso: 200 a 250 g

Resumo: A regeneração óssea é importante para a neurocirurgia, ortopedia, traumatologia e odontologia. Após um trauma, o tecido ósseo não regenera espontaneamente. Desta forma, um arcabouço de origem natural ou sintética pode iniciar ou guiar o crescimento de tecido para a área afetada. Entretanto, até o momento não existe um enxerto ósseo ou material substituto ideal para ser utilizado, principalmente em condições de defeitos mais extensos. Para o desenvolvimento de arcabouços de biomateriais com ótimo desempenho no reparo ósseo, é extremamente importante compreender a interação entre as células osteogênicas e o arcabouço. A hidroxiapatita (HA) é um dos materiais que apresenta maior biocompatibilidade e bioatividade mas tem a desvantagem de não oferecer resistência à pressão. Entretanto, a HA pode ser enriquecida com outros materiais, como o nióbio (Nb), para aumentar sua resistência, formando um compósito hidroxiapatita-pentóxido de nióbio (HA-?TCP-Nb2O5). O pentóxido de nióbio é biocompatível, resistente à corrosão e capaz de nuclear-se com a apatita, tornando-se bioativo. Estudos prévios demonstraram que o compósito associa as características de bioatividade da HA e a maior dureza e resistência do Nb. A biocompatibilidade e o potencial osteoindutor do compósito foram demonstrados em modelo de defeito de tamanho crítico, na calvária de ratos. O objetivo deste estudo é demonstrar se o compósito tem potencial para induzir a osteogênese em sítios ectópicos, ou seja, sítios de regeneração localizados fora do tecido ósseo. Para este estudo serão utilizados 80 ratos Wistar (90 dias de idade) com peso entre 200 e 250g. O compósito, como peça única, na forma de disco, com 5mm de diâmetro e 1,5mm de altura será implantado na fascia do músculo gastrocnêmio da pata direita de cada animal. Na pata esquerda será implantado um disco composto por HA pura. Os discos serão elaborados na forma de arcabouço (scaffold), com poros variando entre 100 e 250 µm. Após 3, 7, 15, 30 e 45 dias os animais (8 animais/tempo/grupo) serão submetidos à eutanásia e as amostras de tecido serão removidas e processadas para estudo histológico. Será realizado o estudo histopatológico (hematoxilina e eosina) para avaliação da morfologia e estudo imunohistoquímico para verificar a expressão de osteocalcina, osteopontina e RANKL.

Maringá, 18 de abril de 2016

Prof. Dra. Vilma Aparecida Ferreira de Godoi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Maringá