



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

ALINE GABRIELA CANDIDO

COMPÓSITO BASEADO EM HA- β TCP-Nb₂O₅ ESTIMULA A OSTEOINDUÇÃO DURANTE O REPARO DE DEFEITOS DE TAMANHO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATOS

MARINGÁ
2014

ALINE GABRIELA CANDIDO

COMPÓSITO BASEADO EM HA- β TCP-Nb₂O₅ ESTIMULA A OSTEOINDUÇÃO DURANTE O REPARO DE DEFEITOS DE TAMANHO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATOS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos do Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Luzmarina Hernandes

**MARINGÁ
2014**

ALINE GABRIELA CANDIDO

COMPÓSITO BASEADO EM HA- β TCP-Nb₂O₅ ESTIMULA A OSTEOINDUÇÃO DURANTE O REPARO DE DEFEITOS DE TAMANHO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATOS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos do Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada, para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 28 de Maio de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Luzmarina Hernandes
(Orientador)
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. Newton Cesar Kamei
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof^a. Dr^a. Eneri Vieira de Souza Leite Mello
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, por me apoiarem em mais uma etapa, dando todo apoio, carinho, atenção e amor necessários para que mais um sonho pudesse ser realizado. Vocês me ensinaram a seguir em frente mesmo com todas as dificuldades e principalmente não desistir dos meus sonhos. Tudo o que sou e consegui até hoje é resultado da dedicação de vocês, que não cessaram esforços para proporcionar o melhor para mim.

A Deus, por guiar meus passos sempre em direção ao caminho certo, me confortar nos momentos difíceis, estando sempre ao meu lado. Sou muito abençoada por tudo que o Senhor me proporciona.

A Prof^a. Dr^a. Luzmarina Hernandes, pela sua dedicação e por ter aceitado me orientar durante esta jornada. Obrigada pelas horas dedicadas, pelo conhecimento compartilhado e pela amizade.

A banca examinadora Prof. Dr. Newton Cesar Kamei e Prof^a. Dr^a. Eneri Vieira de Souza Leite Mello, por se disponibilizarem a estarem presentes neste dia, enriquecendo este trabalho com suas considerações.

Aos Professores do Departamento de Odontologia, pelos ensinamentos, pela oportunidade de convívio, e pelas oportunidades que surgiram no decorrer desses dois anos.

A minha irmã, Graciela Cristina Candido, que mesmo estando longe, sempre esteve ao meu lado, me ajudando e facilitando a minha caminhada, através dos seus conselhos, do seu conhecimento, da sua amizade. Obrigada por toda ajuda, atenção, companheirismo, todos os momentos de conversa e alegrias compartilhados.

Aos colegas da turma de mestrado, pelo convívio e conhecimentos compartilhados.

As amigas Joana Yumi Uchimura e Larrissa Ferraz Dalla Costa, pela amizade, companheirismo e carinho. Que Deus ilumine a vida de vocês sempre guiando para o melhor caminho a ser seguido.

Ao amigo Alessandro Gavazzoni, pelos momentos e dificuldades compartilhados durante as atividades laboratoriais, amizade, conversas e risadas.

Ao Hélio Kiyochi Júnior, pelas horas dedicadas juntamente comigo para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Aos alunos, Ângela Patrão, Bruno Viotto e Jonathan Ferezini, pelo suporte nas atividades laboratoriais.

Às técnicas Maria Euride Carlos Cancino, Maria dos Anjos Moreira Fortunato e Maria Ângela Moreira por todo apoio, ensinamento e orientações durante a parte laboratorial deste estudo. Sem a colaboração de vocês, este trabalho não seria possível.

A Taiana Bonadio, pelas horas dedicadas para confeccionar o material utilizado neste estudo, e por sempre estar disponível para ajudar.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos e apoio financeiro.

Por fim, agradeço toda a minha família e amigos que, mesmo distantes, nunca deixaram de estarem presentes em minha vida durante esse período, sempre tentando ajudar de alguma forma, e que, assim, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina”*

Cora Coralina

COMPÓSITO BASEADO EM HA- β TCP-Nb₂O₅ ESTIMULA A OSTEOINDUÇÃO DURANTE O REPARO DE DEFEITOS DE TAMANHO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATOS

RESUMO

Nas últimas décadas um grande progresso foi feito no desenvolvimento de materiais que são indispensáveis nas áreas da saúde em função da necessidade de recuperação dos defeitos ósseos provocados por traumas, infecções e malformações, eles são os biomateriais. O objetivo deste trabalho foi avaliar por meio de análise morfológica e imunohistoquímica se o compósito baseado em hidroxiapatita- β -fosfato tricálcio e pentóxido de nióbio (HA- β TCP-Nb₂O₅) apresenta a propriedade de osteoindução. Um defeito de tamanho crítico (8mm) foi confeccionado na calvária de ratos Wistar machos. Nos animais do grupo compósito, o defeito foi preenchido com uma pastilha baseada em HA- β TCP-Nb₂O₅ e nos grupos controle (positivo) o defeito foi preenchido com uma pastilha contendo hidroxiapatita- β -fosfato tricálcio (HA- β TCP). Os animais foram mortos após 7, 15, 30 e 45 dias de observação e as amostras da calvária foram coletadas e processadas para inclusão em parafina. Os cortes seriados, posicionados em lâminas diferentes foram imunocorados com osteocalcina e coloração com H&E e Azan. Os tecidos adjacentes ao defeito (periósteo, dura-máter e ósseo) foram analisados. O compósito apresentou potencial osteoindutor demonstrado por sua capacidade de induzir ossificação intramembranosa na dura-máter e de formar blastemas ósseos imunopositivos para osteocalcina, no periósteo. O tecido ósseo remanescente apresentou crescimento a partir das bordas e sofreu remodelação durante todo o período de observação. A maior intensidade de coloração imunohistoquímica ocorreu no sétimo e 30º dia de observação, nas áreas de remodelação, nas áreas de tecido neoformado, em células endoteliais e células osteoprogenitoras na medula óssea. Conclui-se que o compósito apresentou atividade osteoindutora.

Palavras-chave: Defeito de tamanho crítico; osteocalcina; β -fosfato tricálcio; compósito hidroxiapatita - β -fosfato tricálcio - pentóxido de nióbio; regeneração óssea; osteoindução.

COMPOSITE BASED ON HA- β TCP-Nb₂O₅ INDUCE OSTEOINDUCTION DURING THE REPAIR OF CRITICAL SIZE DEFECTS IN RAT CALVARIA

ABSTRACT

In the last decades great progress has been made in the development of materials that are indispensable in health due to the need for recovery of bone defects caused by trauma, infections and malformations, these are biomaterials. The aim of this study was to evaluate by morphological and immunohistochemical analysis if the composite based on hydroxyapatite- β -tricalcium phosphate niobium pentoxide (HA- β TCP-Nb₂O₅), has the property of osteoinduction. A critical size defect (8mm) was made in the calvaria of male Wistar rats. In the animals of composite group, the defect was filled with a tablet based on HA- β -TCP-Nb₂O₅, and control groups (positive) the defect was filled with a tablet containing hydroxyapatite- β -tricalcium phosphate (HA- β TCP). The animals were killed after 7, 15, 30 and 45 days of observation and the samples of calvaria were collected and processed for paraffin inclusion. The serial sections positioned on different slides were immunostained with osteocalcin and stained with H&E and Azan. Tissues adjacent to the defect (periosteum, dura mater and bone) were analyzed. The composite presented osteoinductive potential demonstrated by its ability to induce intramembranous ossification in the dura mater and form immunopositive osseous blastema for osteocalcin, in periosteum. The remaining bone tissue presented growth from edges and suffered remodeling during the whole period of observation. The highest intensity of immunohistochemical staining occurred in the seventh and 30th day of observation in the areas of resorption, newly formed tissue, endothelial cells and osteoprogenitor cells in bone marrow. It is concluded that the composite showed osteoinductive activity.

Keywords: Critical size defect; osteocalcin; β -tricalcium phosphate; hydroxyapatite- β -tricalcium phosphate-niobium pentoxide composite; bone regeneration; osteoinduction.

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	11
2.	Revisão de literatura.....	13
2.1.	Tecido ósseo.....	13
2.1.1.	Células.....	14
2.1.2.	Perióstio e endóstio.....	15
2.1.3.	Tecido ósseo maduro e imaturo.....	15
2.1.4.	Ossificação intramembranosa e endocondral.....	16
2.2.	Células-tronco mesenquimais.....	16
2.3.	Osteoblastos.....	17
2.4.	Osteócitos.....	19
2.5.	Osteoclastos.....	20
2.6.	Remodelação óssea.....	21
2.7.	Reparo e Regeneração óssea.....	22
2.8.	Regeneração óssea in vivo – defeito ósseo craniano.....	23
2.9.	Biomateriais.....	25
2.10.	Biocerâmicas.....	26
2.11.	Nióbio.....	29
2.12.	Osteoindução, osteogênese, osteocondução e osseointegração.....	30
2.13.	Osteocalcina.....	31
3.	Materiais e Método.....	32
3.1.	Obtenção de hidroxiapatita (HA- β TCP) e pentóxido de nióbio (Nb ₂ O ₅).....	32
3.2.	Produção das pastilhas de HA- β TCP e do compósito baseado em HA- β TCP- Nb ₂ O ₅	32
3.3.	Procedimento experimental em animais.....	33
3.4.	Estudo microscópico.....	35
4.	Resultados.....	37
4.1.	Observação aos 7 dias.....	37
4.2.	Observação aos 15 dias.....	38
4.3.	Observação aos 30 e 45 dias.....	39
5.	Discussão.....	50
6.	Conclusão.....	55
7.	Referências.....	56

1. INTRODUÇÃO

A perda óssea, independente de sua causa é funcionalmente debilitante, socialmente incapacitante e economicamente onerosa aos sistemas de saúde de todo o mundo (Szpalski *et al.*, 2010; Conz *et al.*, 2011). Nas últimas décadas um grande progresso foi feito no desenvolvimento de materiais que são indispensáveis nas áreas da saúde em função da necessidade de recuperação dos defeitos ósseos provocados por traumas, infecções e malformações (Kawachi *et al.*, 2000; Pretel, 2005). Tais materiais, chamados biomateriais, devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta regenerativa adequada dos mesmos (Kawachi *et al.*, 2000).

O potencial regenerativo dos biomateriais é governado por três mecanismos fundamentais: (a) osteocondução, no qual o biomaterial permite o crescimento ósseo sobre sua superfície ou para o interior de poros; (b) osteoindução, no qual os biomateriais induzem as células mesenquimais a se diferenciarem em células formadoras de osso maduro e (c) osteogênese, no qual fornecem células osteogênicas contidas em seu interior, capazes de produzir nova matriz óssea (Miron e Zhang, 2012).

Demonstramos recentemente, em estudo estrutural da interface biomaterial-osso que o compósito trifásico baseado em hidroxiapatita β -fosfato tricálcio e pentóxido de nióbio (HA- β TCP Nb₂O₅) na forma de pastilha, foi bioativo, biocompatível e promoveu osteocondução e osseointegração quando implantado em defeito de tamanho crítico na calvária de ratos. Grande quantidade de vasos sanguíneos, células osteogênicas e osteoclastos foram vistos na superfície dos materiais, entretanto a micro porosidade das pastilhas (de 1 a 2,5 μ m no seu maior eixo) dificultou a migração de células e tecidos para o seu interior. Do ponto de vista químico, o compósito apresentou, após a sinterização, 47,43% de β TCP em comparação com a pastilha controle, de hidroxiapatita, que continha 12,39%; além disso, apresentou dureza 66% maior do que a pastilha controle (Kiyochi Junior, 2013).

As características morfológicas observadas na interface biomaterial-osso demonstram que o compósito representa um material promissor como substituto ósseo e nos levaram a elaborar as seguintes hipóteses: (a) o compósito é também um biomaterial com propriedade osteoindutora e (b) o compósito tem potencial para estimular a formação de tecido ósseo nas membranas que recobrem o defeito.

Para comprovar estas hipóteses, o objetivo deste estudo é avaliar quanto à morfologia e expressão de osteocalcina, os tecidos localizados ao redor do defeito de tamanho crítico na calvária de ratos Wistar, preenchidos com o compósito trifásico baseado em hidroxiapatita β -fosfato tricálcio e pentóxido de nióbio (HA- β TCP-Nb₂O₅) na forma de pastilha.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A perda óssea, independente de sua causa é funcionalmente debilitante, socialmente incapacitante e economicamente onerosa aos sistemas de saúde de todo o mundo (Szpalski *et al.*, 2010; Conz *et al.*, 2011).

A engenharia de tecidos oferece uma alternativa de tratamento promissora para o uso clínico, bem como um modelo controlável para estudos da função celular (Bhumiratana *et al.*, 2011), sendo uma grande promessa no fornecimento de estratégias que resultarão em regeneração completa do osso e restauração de sua função (Zambuzzi *et al.*, 2009).

2.1.TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo dinâmico, rígido, que tem a capacidade única de cicatrizar e remodelar sem deixar cicatriz (Sommerfeldt e Rubin, 2001; Kanczler e Oreffo, 2008; Titorencu *et al.*, 2014).

Este tecido fornece suporte estrutural para os músculos esqueléticos transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. Também atua exercendo proteção física de órgãos vitais como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal medular. Aloja e protege a medula óssea, formadora das células sanguíneas. Concomitantemente, os ossos também atuam como principal depósito de cálcio e fosfato (Bab e Sela, 2012; Junqueira e Carneiro, 2013; Titorencu *et al.*, 2014).

Apesar do seu aspecto aparentemente inerte, os ossos são estruturas altamente dinâmicas, crescem, remodelam-se e mantêm-se ativos durante toda a vida do organismo (Judas *et al.*, 2012).

Como em todos os tecidos conjuntivos, o constituinte básico do tecido ósseo, consiste em uma matriz composta de proteínas e íons, e diversos tipos celulares que atuam na remodelação e síntese de novo tecido ósseo (Titorencu *et al.*, 2014).

A matriz óssea consiste em um componente orgânico (sintetizado pelos osteoblastos), acrescido de depósitos de sais de cálcio inorgânico. Colágeno do tipo I e uma matriz extra-fibrilar (proteoglicanos ou proteínas não colágenas) constituem o componente orgânico da matriz. As fibras de colágeno correspondem a aproximadamente 90% do total de proteínas do osso e estão orientadas de forma a conferir a estrutura lamelar do tecido ósseo. Os 10% restantes da fase orgânica da matriz é composto por, proteoglicanos (sulfato de condroitina e sulfato de heparina); proteínas de adesão celular (fibronectina, trombospondina, osteopontina e sialoproteína óssea) (Somerman *et al.* 1988; Robey *et al.*, 1989), osteocalcina [proteínas γ -carboxiladas (gla)] (Robey *et al.*, 1989), e proteínas relacionados ao

crescimento, como fator de crescimento transformante β (TGF- β - *transforming growth factor* β), e fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF – *insulin growth factor*) (Hauschka *et al.*, 1988; Canalis *et al.*, 1989). Estes complexos aniônicos possuem elevada capacidade de ligação com íons, e desempenham um papel importante no processo de calcificação. Cristais minerais são depositados no interior desta rede orgânica tridimensional. Eles são compostos principalmente por cálcio e fosfato, que se combinam para formar cristais de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, que possuem cerca de 30-50 nm de comprimento, 15-30 nm de largura e, 2-10 nm de espessura (Eppell *et al.*, 2001).

2.1.1. Células

O tecido ósseo é formado e sofre remodelação ao longo da vida, através da ação de duas linhagens de células; as células formadoras de tecido ósseo (osteoblastos, osteócitos e *lining cells*), e as células de reabsorção óssea (osteoclastos), que juntas com seus precursores e células associadas (células endoteliais, células nervosas) encontram-se organizadas em unidades especiais, as unidades básicas multicelulares (BMUs – *basic multicellular unit*) (Frost, 2001). O tecido produzido pela atividade dos osteoblastos é mantido pela ação dos osteócitos e *lining cells*, que constituem diferentes formas de osteoblastos (Robling *et al.*, 2006). As células formadoras de tecido ósseo e as células de reabsorção óssea possuem diferentes origens: as células produtoras de tecido ósseo são derivadas de células mesenquimais progenitoras, já os osteoclastos, são derivados de células progenitoras hematopoiéticas. Estas células proliferam-se e diferenciam-se em resposta ao estímulo de hormônios osteotrópicos, citocinas e vários outros estímulos (Titorencu *et al.*, 2014).

A geração e a estimulação das células são reguladas por citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF- *fibroblast growth factor*), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF – *platelet derived growth factor*), fator do crescimento semelhante à insulina e o TGF- β (Pretto e Pagnoncelli, 2005).

2.1.2. Perióstio e endóstio

As superfícies internas e externas dos ossos são recobertas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, que constituem o endóstio e perióstio. A camada mais superficial do perióstio contém principalmente fibras colágenas e fibroblastos. Na sua porção profunda, o perióstio é mais celular, e apresenta células osteoprogenitoras, as quais se multiplicam por mitose, e diferenciam-se em osteoblastos, desempenhando papel importante no crescimento dos ossos e reparo das fraturas (Junqueira e Carneiro, 2013).

O endósteo é geralmente constituído por uma camada de células osteogênicas achatadas revestindo as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, canais de Havers e os canais de Volkmann (Junqueira e Carneiro, 2013).

As principais funções do endósteo e periósteo são a nutrição do tecido ósseo, e fornecimento de novos osteoblastos, para o crescimento e reparo do tecido ósseo (Junqueira e Carneiro, 2013).

2.1.3. Tecido ósseo maduro e imaturo

Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: o imaturo ou primário, e o maduro, secundário ou lamelar. Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz, o que os diferencia, é a orientação das fibras colágenas, no tecido primário as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida, já, no lamelar, as fibras se organizam em lamelas. O osso primário tem menor quantidade de minerais e maiores proporções de osteócitos do que o lamelar. Este por sua vez possui fibras colágenas organizadas em lamelas de três a sete micrômetros de espessura, que ou ficam paralelas umas às outras, ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando o sistema de Havers ou ósteons. Cada ósteon é um cilindro, às vezes bifurcado, formado por quatro a 20 lamelas ósseas concêntricas. No centro desse cilindro ósseo existe um canal revestido de endósteo, o canal de Havers, que contém vasos e nervos. Os canais de Havers comunicam-se entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso por meio de canais transversais ou oblíquos, que atravessam as lamelas, os canais de Volkmann (Junqueira e Carneiro, 2013).

2.1.4. Ossificação intramembranosa e endocondral

O processo pelo qual o tecido ósseo é formado chama-se de ossificação ou osteogênese, podendo ser originado de duas formas: a ossificação intramembranosa, atualmente também conhecida como endoconjuntiva e a ossificação endocondral (Pretto e Pagnoncelli, 2005).

Tanto a ossificação intramembranosa quanto a endocondral, ocorrem próximas a uma área de crescimento vascular. A ossificação intramembranosa é caracterizada por invasão de capilares nas zonas mesenquimais, e o surgimento e diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos maduros. Estes osteoblastos produzem e secretam matriz óssea continuamente, levando a formação de espículas de tecido ósseo. Essas espículas crescem e se desenvolvem, e eventualmente, acabam se fundindo umas com as outras, formando então, trabéculas ósseas. Com o aumento das trabéculas em tamanho e número, elas se tornam interligadas formando tecido ósseo desorganizado, e com uma grande quantidade de osteócitos (Kanczler e Oreffo, 2008; Junqueira e Carneiro, 2013; Knight & Hankenson, 2012).

Ossificação endocondral utiliza as propriedades funcionais da cartilagem e do osso, para que haja a formação e o crescimento do esqueleto ósseo (Kanczler e Oreffo, 2008). Este processo é o responsável

pela formação dos ossos curtos e longos. Tem início sobre uma peça de cartilagem hialina. Consiste essencialmente em dois processos, primeiro, a cartilagem hialina sofre modificações, havendo hipertrofia dos condrócitos, redução da matriz cartilaginosa a finos tabiques, mineralização da matriz e morte dos condrócitos por apoptose. Após isto, as cavidades previamente ocupadas pelos condrócitos são invadidas por capilares sanguíneos e células osteogênicas vindas do conjuntivo adjacente. Estas células diferenciam-se em osteoblastos, que depositarão matriz óssea sobre os tabiques de cartilagem calcificada (Junqueira e Carneiro, 2013).

2.2.CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais, são uma população heterogênea de células progenitoras pluripotentes capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, miócitos, cardiomiócitos, fibroblastos, miofibroblastos, células epiteliais e neurônios (Bab e Sela, 2012; Miron e Zhang, 2012).

Durante a diferenciação osteogênica, as células-tronco passam por diversos estágios sucessivos do desenvolvimento, tais como: 1) célula-tronco mesenquimal; 2) células osteoprogenitoras; 3) pré-osteoblastos; 4) osteoblastos; e 5) osteócitos (Heng *et al.*, 2004).

Durante a diferenciação, as células adquirem morfologia semelhante à dos osteoblastos, com formato cuboidal ou poligonal e produzem fosfatase alcalina, que é um marcador precoce da diferenciação osteogênica, colágeno tipo I, e matriz extracelular rica em cálcio (Bruder *et al.*, 1998; Payushina *et al.*, 2006). Essas células também expressam osteocalcina, osteopontina, osteonectina dentre outras proteínas não colagênicas importantes para a mineralização da matriz óssea (Pittenger *et al.*, 1999; Minguell *et al.*, 2001; Payushina *et al.*, 2006).

2.3.OSTEOBLASTOS

A formação óssea e reparação pelos osteoblastos são à base de cicatrização de lesões ósseas (Bab e Sela, 2012). Os osteoblastos tornam-se maduros quando atingem a superfície óssea e apresentam-se como células cúbicas, altamente polarizadas, dispostas em paliçada (frequentemente designadas por epitélio osteóide) (Judas *et al.*, 2012), e capazes de sintetizar osteóide (Miron e Zhang, 2012), a fase orgânica da matriz óssea, constituída por colágeno tipo I, proteínas não colagênicas (osteocalcina, osteopontina, osteonectina, fibronectina e tenascina) (Robey, 1989; Nefussi *et al.*, 1997; Bellows *et al.*, 1999), e proteoglicanos (sulfato de condroitina), dentre outros (Robey, 1989; Ocarino e Serakides, 2006). Este osteóide torna-se mineralizado pela formação de hidroxiapatita (Miron e Zhang, 2012). Além da produção

dos componentes da matriz, estas células também funcionam como transmissores de sinais para a remodelação (Katchburian e Arana, 2004).

Entre estas células formam-se junções comunicantes (*gap junctions*), que são fundamentais para a ligação e comunicação com células adjacentes (Judas *et al.*, 2012). Estas células localizam-se na superfície das trabéculas, do canal de Havers do tecido ósseo e no perióstio. Quando o osteoblasto fica completamente circundado pela sua matriz, passa a ser chamado de osteócito e desempenha um papel central na remodelação óssea. Outro caminho que esta célula pode seguir é torna-se uma célula de revestimento (*lining cell*) ou sofrer apoptose (Miron e Zhang, 2012).

Dentre as proteínas sintetizadas pelos osteoblastos estão o colagénio tipo I e proteínas não colagênicas como a osteopontina, a osteocalcina e a sialoproteína óssea. Estas proteínas não colagênicas têm importância fundamental no processo de mineralização, ou seja, na ligação do colágeno aos cristais minerais de hidroxiapatita. Além disto, os osteoblastos sintetizam vários fatores de crescimento, que ficam incorporados na matriz óssea, desempenhando papel determinante, tanto na formação do tecido ósseo como na diferenciação e atividade dos osteoclastos (Judas *et al.*, 2012).

Os osteoblastos apresentam numerosos prolongamentos citoplasmáticos, que se projetam para a matriz óssea e se interdigitam e comunicam-se com os prolongamentos dos osteócitos. Este fato permite o estabelecimento de importantes relações entre os osteoblastos ativos na superfície óssea e os osteócitos que estão no seio da matriz calcificada (Judas *et al.*, 2012).

Estas células funcionam, ainda, como receptores e transmissores de sinais para a remodelação óssea. Com exceção da calcitonina, quase todos os hormônios e muitos fatores de crescimento e citocinas que controlam a reabsorção do tecido ósseo, possuem receptores nos osteoblastos e não nos osteoclastos. Portanto, tudo indica que são as células osteoblásticas e não os osteoclastos que desencadeiam o processo de reabsorção óssea, considerando que a maioria dos fatores osteotrópicos estimulam a formação e ativação osteoclástica, através das células osteoblásticas (Judas *et al.*, 2012).

Estas células são completamente diferenciadas e não apresentam capacidade de migração e proliferação, mas metabolicamente são muito ativas (Judas *et al.*, 2012). Assim, para permitir que ocorra a formação óssea em um sítio determinado, células progenitoras mesenquimais indiferenciadas (células osteoprogenitoras) podem migrar para o sítio e proliferar para se tornarem osteoblastos. A diferenciação e o desenvolvimento dos osteoblastos pelas células osteoprogenitoras depende da liberação das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs – *bone morphogenetic protein*) e de outros fatores de crescimento, tais como fatores de crescimento da insulina (IGF), fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e fatores de crescimento dos fibroblastos (FGF- *fibroblast growth factor*) (Lynch *et al.*, 1999; Lindhe *et al.*, 2005). Os osteoblastos são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz e em fase de síntese apresentam características ultra estruturais de células produtoras de proteínas (Junqueira e Carneiro, 2013).

Terminado o período de secreção ativa, os osteoblastos achatam-se e transformam-se em células de revestimento ósseo (*lining cells*) ou em osteócitos, podendo desaparecer do local de formação óssea, provavelmente por apoptose. As *lining cells* formam uma camada contínua de células achatadas que reveste a maior parte da matriz calcificada, situando-se ao longo das superfícies do endóstio. Estas células apresentam capacidade de síntese reduzida, sendo consideradas quiescentes ou de repouso. Porém, podem reverter-se em células osteoblásticas ativas quando devidamente estimuladas, sendo-lhes atribuído um papel cada vez mais relevante nos processos de remodelação óssea (Judas *et al.*, 2012; Titorencu *et al.*, 2014).

Tem sido sugerida a existência de uma célula osteocondroprogenitora que poderá se diferenciar em osteoblasto ou condroblasto, como resposta a pequenas variações das condições locais. De fato, as células mesenquimatosas indiferenciadas têm a capacidade de se diferenciarem numa grande variedade de tipos celulares, dependendo do seu *habitat* e dos fatores reguladores presentes no meio. Em relação a este último aspecto, está hoje perfeitamente demonstrado que em áreas ricamente vascularizadas, a diferenciação das células com potencial osteogénico vai, naturalmente, conduzir ao aparecimento de osteoblastos e de matriz óssea. Todavia, em regiões onde a rede capilar não esteja suficientemente desenvolvida (locais mecanicamente instáveis e menos vascularizados), existindo uma baixa tensão de oxigênio, as células osteoprogenitoras podem originar condroblastos ou mesmo fibroblastos, situação muitas vezes verificada nos processos pouco eficazes de reparação de fraturas (Judas *et al.*, 2012).

2.4.OSTEÓCITOS

O osteócito é a forma madura do osteoblasto (Bab e Sela, 2012). São células com formato estrelado, achatadas, que exibem pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi pouco desenvolvido e núcleo com cromatina condensada (Junqueira e Carneiro, 2013).

Estas células encontram-se aprisionadas no interior da matriz óssea mineralizada, ocupando lacunas das quais partem canalículos. Cada lacuna contém apenas um osteócito. Dentro dos canalículos os prolongamentos destas células, estabelecem contatos através de junções comunicantes, por onde podem passar pequenas moléculas e íons, de um osteócito para o outro (Junqueira e Carneiro, 2013), e com as células na superfície do osso (Bab e Sela, 2012). Esse arranjo permite aos osteócitos, participarem na regulação da homeostasia do cálcio sanguíneo, perceber a carga mecânica e transmitir essa informação às outras células dentro do osso (Junqueira e Carneiro, 2013).

A mineralização da matriz completa a maturação osteocítica. O osteócito incorporado na matriz mineralizada é residente estacionário responsável pela função de metabolismo do tecido ósseo (Bab e Sela, 2012).

Os osteócitos são viáveis por anos, até mesmo décadas, enquanto os osteoblastos vivem apenas semanas e os osteoclastos alguns dias (Bab e Sela, 2012).

Osteócitos enviam sinais tanto para a reabsorção quanto para formação óssea. Tem sido sugerido, que próximo à sua morte enviam sinais que iniciam a reabsorção. Além disso, acredita-se que os osteócitos atuam como orquestradores, direcionando tanto a atividade dos osteoclastos quanto dos osteoblastos no osso (Bab e Sela, 2012).

2.5.OSTEOCLASTOS

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas (Bab e Sela, 2012; Judas *et al.*, 2012), e extensamente ramificadas, que se originam da fusão de células da linhagem monócito-fagocítica dos tecidos hematopoiéticos (Bab e Sela, 2012; Jilka, 2013), e fazem parte das unidades básicas multicelulares (BMUs) (Jilka, 2013). Estas células circulam no sangue, e deixam a circulação, no local onde são requeridas (Jilka, 2013), desempenhando uma função essencial na remodelação e na renovação do tecido ósseo (Judas *et al.*, 2012).

Podem ser encontrados nas superfícies ósseas, principalmente no endóstio e, ocasionalmente, na superfície do perióstio. Estas células são altamente especializadas nos processos de reabsorção da matriz óssea, desenvolvendo, para este fim, uma eficaz e complexa maquinaria (que lhes confere características e capacidades únicas). A região óssea que será reabsorvida apresenta a forma de uma cripta ou lacuna recebendo a designação de lacuna de *Howship* (Judas *et al.*, 2012).

Estas células reabsorvem osso e morrem por apoptose, sendo a vida média de um osteoclasto cerca de 12 dias (Jilka, 2013).

O osso reabsorvido começa a ser substituído por uma equipe de novos osteoblastos, este processo demora cerca de três meses. Durante este processo, os osteoblastos tornam-se progressivamente mais planos e amplos; alguns passam a ser considerados como osteócitos, à medida que ficam completamente envoltos por matriz óssea, outros morrem por apoptose (Jilka, 2013).

A atividade dos osteoclastos é coordenada por citocinas e por hormônios como a calcitonina, produzida pela glândula tireóide, e o paratormônio, secretado pelas glândulas paratireóides (Hernández-Gil *et al.*, 2006; Junqueira e Carneiro, 2013).

A reabsorção propriamente dita é um processo altamente organizado e sequencial (ocorre na lacuna *Howship*) constituído por duas fases consecutivas. A primeira fase consiste em um processo de acidificação da lacuna (através da produção de prótons H^+ e ânions Cl^-), provocando a dissolução dos cristais de hidroxiapatita, constituintes da fase mineral da matriz óssea. Na segunda fase, ocorre a degradação completa da fase orgânica por ação de numerosas enzimas proteolíticas (catepsinas e metaloproteinases da matriz) (Judas *et al.*, 2012).

2.6.REMODELAÇÃO ÓSSEA

A remodelação óssea é um processo fisiológico, lento, que ocorre durante um longo período de tempo (pode durar mais de quatro meses) (Cacchioli *et al.*, 2006). O tecido ósseo perde a integridade estrutural, à medida que envelhece, sofrendo processo de reabsorção, realizado pelos osteoclastos, ao mesmo tempo em que ocorre a síntese de osso novo, pelos osteoblastos, processo denominado de remodelação óssea (Cacchioli *et al.*, 2006; Bab e Sela, 2012; Chim *et al.*, 2013; Jilka, 2013). Durante este processo, o osso primário é substituído por osso maduro secundário (Cacchioli *et al.*, 2006).

O equilíbrio entre a atividade dos osteoclastos e osteoblastos é essencial na regulação da quantidade de reabsorção e deposição óssea, a fim de manter o tamanho, forma e integridade estrutural do osso (Chim *et al.*, 2013).

Os processos de reabsorção e formação de osso novo são intimamente ligados, e ocorrem dentro das chamadas Unidades Básicas Multicelulares (BMUs), nas quais se encontram presentes osteoclastos, osteoblastos, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo (Jilka, 2013). Os osteoclastos reabsorvem o osso velho e danificado, após se fixarem à sua superfície. A área de reabsorção é então ocupada por osteoblastos que desempenham papel importante na mineralização óssea e deposição de nova matriz óssea (Chim *et al.*, 2013).

A angiogênese desempenha papel fundamental durante a remodelação, pois os vasos sanguíneos fornecem oxigênio, nutrientes, hormônios, citocinas, bem como células precursoras de osteoblastos e osteoclastos (Kanczler e Oreffo, 2008; Chim *et al.*, 2013).

O processo de remodelação é rigidamente controlado por uma grande quantidade de fatores sistêmicos que controlam as atividades celulares. Um desequilíbrio entre o processo de formação óssea e reabsorção irá conduzir a várias doenças ósseas. Por exemplo, o aumento da reabsorção osteoclástica em relação à deposição, irá resultar em baixa massa óssea e fragilidade esquelética, que está associada com desordens ósseas tais como a osteoporose e doença de Paget (Chim *et al.*, 2013).

2.7.REPARO E REGENERAÇÃO ÓSSEA

O reparo do tecido ósseo após uma fratura, ou após a colocação de implantes osseointegrados reagem biologicamente de forma semelhante. (Pretto e Pagnoncelli, 2005).

O osso tem a capacidade única de se regenerar sem o desenvolvimento de uma cicatriz fibrosa (Sommerfeldt e Rubin, 200; Kanczler e Oreffo, 2008; Titorencu *et al.*, 2014). O processo de regeneração óssea ocorre aos poucos, incluindo o desenvolvimento de tecido de granulação e diferenciação de células osteoprogenitoras e osteoblastos, responsáveis pela deposição de matriz óssea primária (Cacchioli *et al.*, 2006).

A cicatrização óssea pode ser dividida em três eventos biológicos: a fase inflamatória, a reparativa e a fase remodeladora. A primeira etapa é caracterizada pela formação do coágulo, a segunda pela construção do calo ósseo e a terceira consiste na remodelação e formação de um novo tecido ósseo de forma lamelar (Pretto e Pagnoncelli, 2005).

O reparo de uma fratura óssea inclui a coordenação de vários eventos, como a migração, diferenciação e ativação de vários tipos celulares e tecidos. O desenvolvimento de uma microvasculatura e microcirculação é crítico para que ocorra homeostase e regeneração do osso vivo (Kanczler e Oreffo, 2008). A angiogênese pode regular a formação de osso novo em um ambiente estabilizado, através do fornecimento de fatores osteogênicos para as células-tronco mesenquimais no local da fratura, ou através da apresentação de células osteoprogenitoras. Baixa tensão de oxigênio também pode estimular a formação de osso novo (Thompson *et al.*, 2002).

O reparo ósseo pode ocorrer através de duas modalidades diferentes, dependendo da estabilidade mecânica da região onde foi realizada a fratura (Yu *et al.*, 2012). Em ambos os casos, células mesenquimais migram para o local da ferida em resposta ao aumento local dos níveis de fatores de crescimento e citocinas. No local da ferida, essas células podem se diferenciar em condrócitos ou osteoblastos. A estabilidade mecânica da região influencia o destino celular. Quando a fratura fica instável, um grande molde de cartilagem se forma no local da fratura. Este molde de cartilagem é substituído por osso para preencher as duas extremidades fraturadas, ou seja, ocorrendo ossificação endocondral. Já em fraturas estabilizadas, não há a formação de um colar cartilaginoso intermediário, e nestes casos, as células mesenquimais no local da lesão diferenciam-se diretamente em osteoblastos (Thompson *et al.*, 2002), o que ocorre, é uma ossificação intramembranosa dentro do periósteo e endósteo (Yu *et al.*, 2012). No entanto, os mecanismos específicos que regulam a transição entre esses dois processos são desconhecidos. Há evidências sugerindo que o destino da célula estaminal, em resposta ao ambiente mecânico é controlado geneticamente e pode ser alterado. A cartilagem pode ser induzida a se formar, em fraturas estáveis se a proteína morfogenética óssea (BMP) é ativada durante o reparo da fratura (Yu *et al.*, 2012).

2.8. REGENERAÇÃO ÓSSEA IN VIVO – DEFEITO ÓSSEO CRANIANO

Um defeito ósseo de tamanho crítico consiste no menor defeito realizado em uma espécie animal, que não cicatriza espontaneamente durante o tempo de vida, ou seja, este defeito deve ser grande o suficiente para que não haja cura espontânea (Cacchioli *et al.*, 2006; Cooper *et al.*, 2010; Lansdowne, 2010; Gomes e Fernandes, 2011). Mais especificamente, um defeito ósseo de tamanho crítico, tem sido descrito, como um defeito que tenha menos de 10% de regeneração óssea durante o tempo de vida do animal. Sendo que quando não for utilizado nenhum material como preenchimento, o resultado dever ser a formação de tecido conjuntivo fibroso, ao invés de osso (Lansdowne, 2010).

A cura do defeito deve ser avaliada correlacionando o tamanho da ferida com o período de reparação, mas acima de tudo com a qualidade do tecido regenerado (Cacchioli *et al.*, 2006).

O modelo em calvária é muito popular entre os pesquisadores, principalmente devido ao fato, da estrutura óssea da calvária permitir o estabelecimento de um defeito uniforme, reproduzível, e facilmente avaliado através de análise radiográfica e histológica. A localização anatômica facilita o acesso cirúrgico e o manuseio intra-operatório; a dura-máter e a pele localizadas acima do defeito criam um suporte adequado para os materiais implantados, não havendo necessidade de fixação interna ou externa (Gomes e Fernandes, 2011).

A dura-máter desempenha um papel significativo na cura dos defeitos realizados em calvária. Esta parece ser a fonte primária de células osteogênicas e fatores osteoindutores durante a cura das feridas. As técnicas cirúrgicas que empregam uma trefina para realização do defeito, podem facilmente danificar ou destruir a dura-máter subjacente, possivelmente inibindo a cura. Portanto, a cura do defeito realizado em calvária pode ser influenciada não somente pelo tamanho, mas também pela forma que foi criado (Cooper *et al.*, 2010).

Para a confecção de um defeito ósseo de tamanho crítico, muitos fatores devem ser considerados, como a raça e a idade do animal, a localização do osso, a presença ou ausência de fixação cirúrgica, e o tamanho do defeito a ser realizado (Cacchioli *et al.*, 2006; Lansdowne, 2010). Além disso, a vascularização da região, o envolvimento ou não de osso cortical e a presença de periósteo, também são fatores a serem considerados (Cacchioli *et al.*, 2006).

A localização anatômica de um defeito e a estabilidade são fatores importantes, pois, as tensões musculares, a carga exercida e o grau de mobilidade, podem afetar diretamente o resultado final da regeneração óssea (Cacchioli *et al.*, 2006).

Atualmente, vários modelos *in vivo* são utilizados para avaliar o processo de regeneração óssea, a interação osso – biomaterial, e a evidência patológica ou fisiológica de ossificação. Modelos experimentais podem ser classificados como heterotópicos ou ortotópicos. Modelo heterotópico, consiste naquele que o material a ser estudado, é introduzido por via subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou no mesentério (Gomes e Fernandes, 2011).

O modelo ortotópico, consiste naquele em que o material a ser estudado, é introduzido em defeitos ósseos, realizados em calvária, ossos longos, segmento da mandíbula (Gomes e Fernandes, 2011).

O modelo em calvária destaca-se como um modelo adequado para avaliar materiais complexos e engenharia de tecidos, visando à regeneração óssea. Especialmente para a regeneração de defeitos craniofaciais (Gomes e Fernandes, 2011).

2.9.BIOMATERIAIS

O desenvolvimento de novas tecnologias, associado ao avanço humano nas diversas áreas do conhecimento, trouxe muitos benefícios para a qualidade de vida da população relacionados à melhoria da saúde e do bem-estar. Neste processo, deve-se dar destaque especial a uma área multidisciplinar que estuda e desenvolve materiais potencialmente aplicados a sistemas biológicos danificados com finalidade de auxiliar seu reparo ou substituí-los, denominada de Biomateriais (Lima *et al.*, 2011).

Um biomaterial por definição é uma substância ou associação de duas ou mais substâncias, farmacologicamente inertes, de origem natural ou sintética, utilizadas para substituir, aumentar ou melhorar, parcial ou integralmente tecidos e órgãos (Williams, 1987). Tais materiais devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos (Kawachi *et al.*, 2000). Além disso, devem ser osteocondutores e susceptíveis a bioabsorção osteoclástica para permitir substituição pelo osso do hospedeiro no espaço do enxerto (Fleckenstein *et al.*, 2006)

Os biomateriais direcionam a forma geral e a estrutura do tecido a ser substituído, promovem a adesão celular e subsequente crescimento tecidual permitindo a difusão de nutrientes e células através do seu arcabouço (Rose *et al.*, 2004).

Na odontologia, biomateriais de enxerto ósseo podem ser utilizados para o aumento ou reconstrução do rebordo alveolar, preenchimento de defeitos intraósseos e de alvéolos dentários, implantes imediatos após exodontias, elevação do assoalho do seio maxilar, e tratamento de defeitos periimplantares (LeGeros, 2002, Murugan e Ramakrishna, 2005).

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação e origem (Teixeira, 2009). O mecanismo de ação diz respeito às suas propriedades biológicas e à interação com o leito receptor. São classificados como osteogênicos quando são capazes de promover a formação óssea por carregarem consigo células ósseas; osteoindutores quando são capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos com possibilidade de formação óssea ectópica e osteocondutores quando sua estrutura serve de arcabouço ou substrato estrutural favorável para a migração celular e deposição óssea oriunda das imediações, desta forma, o biomaterial pode ser gradativamente reabsorvido e simultaneamente substituído por novo tecido ósseo (Urist, 1984, Novaes Júnior. *et al.*, 2000, Urist, 2002).

Com relação à sua origem, os biomateriais podem ser classificados como autógenos, homógenos, xenógenos e aloplásticos (Murugan e Ramakrishna, 2005).

Os enxertos autógenos são aqueles obtidos do próprio paciente, a partir de sítios doadores intra ou extrabuciais. Apresentam melhor previsibilidade, e são considerados como o “padrão ouro” por possuírem

propriedades osteogênicas, osteocondutoras e osteoindutoras. A morbidade pós-operatória relacionada à necessidade de coleta de uma área doadora, eventuais aumento de tempo e custos de tratamento devido a procedimentos realizados em ambiente hospitalar, são vistos com alguma resistência por parte dos pacientes e por isso tem sua indicação redimensionada (Lynch *et al.*, 1999).

Os homogêneos, alógenos ou aloenxertos são obtidos de indivíduos da mesma espécie, porém com diferentes genótipos (Misch e Dietsch, 1993). O material pode provir tanto de cadáveres quanto de seres vivos que, por diferentes razões, foram submetidos a amputações terapêuticas (Chiapasco e Romeo, 2007). Os três tipos de biomateriais homogêneos mais citados na literatura são: osso congelado (raramente utilizado em função dos riscos de rejeição e transmissão de doenças); FDBA (osso seco e congelado), DFDBA (osso desmineralizado seco e congelado) (Teixeira, 2009).

Os biomateriais xenógenos, provém de doadores de outra espécie, como por exemplo, o osso de origem bovina (Bauer e Muschler, 2000). Sua resistência biomecânica é similar a do osso humano e tratamentos adequados para a sua obtenção podem evitar respostas imunológicas ou inflamatórias adversas (Misch, 2000). A ausência de proteína torna segura a utilização em humanos, restringindo seu uso apenas aos aspectos culturais e religiosos (Benke *et al.*, 2001).

Os materiais aloplásticos são dispositivos de origem sintética. Esses biomateriais cerâmicos a base de fosfato de cálcio podem ser porosos, cristalinos, amorfos, granulados, porém, sobretudo, devem garantir a formação de ligações estáveis com o osso neoformado, com o passar do tempo (Lynch *et al.*, 1999). São exemplos de biocerâmicas as hidroxiapatitas (HA), fosfato tricálcio e os biovidros (Teixeira, 2009).

2.10. BIOCERÂMICAS

Atualmente existem inúmeros materiais empregados como implantes ou enxertos, no entanto, apresentam limitações para seu uso, visto que o sucesso clínico de um material de substituição óssea depende da sua integração com áreas do tecido (Zambuzzi *et al.*, 2011).

As cerâmicas de fosfato de cálcio (naturais ou sintéticas), como a hidroxiapatita ou tricálcio fosfato (TCP-*tricalcium-phosphate*), apresentam biocompatibilidade, osteocondutividade, ausência de toxicidade e permitem o processo de substituição progressiva, sendo uma das alternativas mais comuns ao enxerto ósseo autólogo (padrão ouro) (Galois e Mainard, 2004).

Os fosfatos de cálcio têm lugar de destaque devido ao fato de sua composição ser similar à da matriz óssea (LeGeros, 2002) o que favorece a melhor interação entre o tecido vivo e o material implantado, tornando possível a formação de uma ligação biomaterial - tecido vivo (Oréfice, 2006). Dentre as cerâmicas de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita (HA) $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ é sem dúvida a cerâmica mais estudada e a mais utilizada para as finalidades clínicas (Oréfice, 2006) pois apresenta

maior biocompatibilidade e bioatividade, É um material esterilizável, relativamente não absorvível e possui uma composição uniforme (Ono *et al.*, 2000).

Considerada um material aloplástico e, portanto, osteocondutor, a HA possui a capacidade de formar um arcabouço para a migração de células angiogênicas e osteogênicas (Fleckenstein, 2006). Entre as suas indicações de uso está o reparo de defeitos ósseos em aplicações odontológicas e ortopédicas, aumento de rebordo alveolar, regeneração guiada de tecidos ósseos, reconstrução bucomaxilofacial e reparo e substituição de paredes orbitais (LeGeros, 1988; Aoki, 1991).

Outro fosfato de cálcio de grande importância como substituto ósseo é o TCP cuja fórmula estrutural é $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. O TCP pertence à classe dos materiais biologicamente reabsorvíveis e pode ocorrer em duas diferentes estruturas cristalinas: monoclinica (α -TCP) ou romboédrica (β -TCP). O TCP possui um papel importante no processo de biomineralização óssea por ser o precursor direto da apatita óssea (Elliot, 1994). O β -TCP é um material bioativo, atóxico, osteocondutor e biodegradável, logo, não há a necessidade de uma segunda operação cirúrgica para remover um dispositivo de β -TCP, após a cura se processar (Dorozhkin, 2009). O β -TCP foi um dos primeiros compostos a ser utilizado como um *scaffold* para regeneração óssea (Szpalski *et al.*, 2010).

Estruturalmente, a HA é mais parecida com o osso natural do que o β -TCP, no entanto, a HA possui a propriedade de reabsorção bem menor do que a fase β -TCP. A velocidade de dissolução do β -TCP é de 3 a 12 vezes maior que a da HA estequiométrica. Isso quer dizer que enquanto a hidroxiapatita implantada permanece no organismo por anos, a fase β -TCP é reabsorvida em semanas (Hench *et al.*, 1993). A combinação das propriedades destes dois materiais resulta em uma cerâmica bifásica de fosfato de cálcio (HA- β TCP) reabsorvível, capaz de desenvolver uma fixação bioativa na interface tecido-implante (Bouler, 2001; Dorozhkin, 2011). As cerâmicas bifásicas são biologicamente mais ativas que a HA pura (Yubao *et al.*, 1997).

As biocerâmicas, como β -TCP, sulfato de cálcio e hidroxiapatita são muito utilizados em cirurgias ortopédicas como enxertos ósseos (Liu e Lun, 2012).

Fosfatos de cálcio bifásico são misturas de β -TCP e HA. Este compósito apresenta inúmeras vantagens. Como um *scaffold* o β -TCP é reabsorvido *in vivo*, libera íons de cálcio e fosfato no microambiente e estes íons podem, então, ser utilizados para construir o osso de novo num processo equilibrado entre reabsorção e formação (Szpalski *et al.*, 2010). Quando utilizado como um material osteocondutor, o β -TCP tem algumas desvantagens. Suas propriedades mecânicas são pobres, apresenta ligeira fragilidade o que o torna incapaz de resistir à fadiga, tornando-se suscetível ao colapso. Além disso, apesar de apresentar capacidade de osteoindução, é pouco osteogênico (Liu e Lun, 2012).

A hidroxiapatita proporciona um ambiente favorável para a proliferação e diferenciação de osteoblastos. Ambos β -TCP e HA podem promover a formação de osso novo. No entanto, em comparação com a HA ou β -TCP isolados, o compósito β -TCP/HA, leva a formação de osso mais rapidamente (Liu e Lun, 2012).

As cerâmicas de fosfato de cálcio podem ainda ser enriquecidas com outros tipos de materiais a fim de superar as desvantagens e melhorar suas propriedades físicas e biológicas, como a proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2), o plasma rico em plaquetas (PRP), materiais osteogênicos (célula-tronco mesenquimal [MSC] da medula óssea) e materiais osteocondutores. Adicionalmente, alguns íons metálicos também podem ser adicionados para regular a degradação do β -TCP por ativação ou inibição da atividade de osteoclastos ou de osteoblastos (Liu e Lun, 2012) ou mesmo ser associados a materiais mecanicamente mais resistentes, como o nióbio (Nb), um metal que apresenta baixa toxicidade (Yamamoto *et al.*, 2004), promove a calcificação por células NHOst (NHOst – *normal human osteoblasts*) e estimula a atividade da fosfatase alcalina, um importante fator na geração de osso novo (Isama e Tsuchiya, 2003; Tamai *et al.*, 2007).

Os metais têm um merecido destaque no emprego como substitutos ósseos devido ao fato de possuírem excelentes propriedades mecânicas como dureza, módulo elástico e resistência à fadiga (Park, 2007). Entretanto, esses materiais podem apresentar certos inconvenientes como rejeições biológicas, infecções, perda de massa óssea e deslocamento na interface osso-implante devido à falta de compatibilidade estrutural e de superfície (Bento, 2003). Além disso, essas ligas são materiais biotoleráveis, não sendo capazes de ligar-se ao tecido ósseo. Por outro lado, os materiais bioativos, como as cerâmicas de fosfato de cálcio criam ligações químicas fortes com o tecido ósseo, mas não resistem a altas tensões mecânicas (Long *et al.*, 1998; Ramírez *et al.*, 2011).

2.11. NIÓBIO

O Brasil detém a liderança na oferta de nióbio no cenário mundial, atingindo aproximadamente 93% da produção mundial (Silva, 1994), estando às reservas brasileiras concentradas nos Estados de Minas Gerais (73,11%), Amazonas (25,42%) e Goiás (1,47%) (Silva, 2001).

Apenas duas empresas respondem pela produção nacional do minério, do concentrado e dos produtos finais de nióbio: a Companhia Brasileira de Mineração e Metalurgia (CBMM) em Araxá, Minas Gerais, e a Mineração Catalão de Goiás Ltda., em Goiás. A jazida de Araxá constitui a maior reserva mundial de nióbio (Silva, 2001).

Uma das mais promissoras aplicações do nióbio processado via metalurgia do pó (P/M) é o uso em implantes cirúrgicos. Os materiais metálicos porosos biocompatíveis possuem uma superfície específica elevada que favorece a interação do implante com o osso (Leite *et al.*, 2011).

A porosidade de um material varia, de modo geral, com a temperatura e o tempo de sinterização. A sinterização em altas temperaturas (~2.000°C) sob alto vácuo promove a densificação do nióbio. Desse modo, a porosidade poderia ser controlada de modo a assegurar uma superfície específica elevada para facilitar a etapa de osteointegração (Leite *et al.*, 2011).

O nióbio apresenta afinidade por oxigênio formando facilmente o pentóxido de nióbio (Nb_2O_5). Esse óxido é biocompatível, resistente à corrosão e possui o grupo funcional Nb – OH em sua superfície que induz a nucleação de apatita tornando-o bioativo. Neste sentido, os estudos com Nb_2O_5 podem ser uma alternativa para redução dos custos de produção devido ao fato de sua síntese ser realizada em atmosfera de ar, em temperaturas menores que a dos metais. Além disso, o pentóxido de nióbio pode ser moído junto com a hidroxiapatita. Este processo possibilita a formação de reações de estado sólido facilitando as transições de fase na formação dos compósitos (Nascimento *et al.*, 2011).

No entanto o número de publicações nacionais e internacionais explorando a biocompatibilidade do nióbio ainda é muito menor do que a do titânio.

2.12. OSTEOINDUÇÃO, OSTEOGÊNESE, OSTEOCONDUÇÃO E OSSEOINTEGRAÇÃO

O potencial regenerativo dos enxertos ósseos é governado por três mecanismos fundamentais: (a) deve fornecer uma matriz osteocondutora, que permite a invasão celular e vascularização, (b) fornecer fatores osteoindutivos, que recrutam e induzem as células mesenquimais a se diferenciarem em células formadoras de osso maduro e ou, (c) fornecer células osteogênicas, contidas no interior do enxerto ósseo, capazes de produzir nova matriz óssea (Miron e Zhang, 2012).

Osteoindução ocorre quando células mesenquimais indiferenciadas devidamente estimuladas por agentes indutores transformam-se em pré-osteoblastos, em seguida, em osteoblastos, iniciando o processo de osteogênese, e a formação de um novo tecido ósseo (Albrektsson *et al.*, 2001; Lindhe *et al.*, 2005; Miron e Zhang, 2012).

Osteogênese consiste na formação e desenvolvimento do osso (Lindhe *et al.*, 2005), é o processo associado com a função celular, no qual células em diferentes estágios de diferenciação são recrutadas, ativadas, proliferam e se diferenciam, a fim de produzir novo tecido ósseo (Gomes e Fernandes, 2011). Neste mecanismo, os biomateriais são capazes de promover a formação óssea por carregarem consigo células ósseas (Lindhe *et al.*, 2005).

Osteocondução consiste no processo pelo qual, um tecido vizinho, disponibiliza células osteogênicas para que exerçam seu papel biológico (Gomes e Fernandes, 2011).

Na osteocondução o biomaterial funciona como uma matriz física ou arcabouço para deposição de novo osso oriundo das imediações. É caracterizada por um processo de crescimento e invasão de vasos sanguíneos, de tecidos perivasculares e de células osteoprogenitoras do sítio receptor para o enxerto. O biomaterial é gradativamente reabsorvido e simultaneamente substituído por novo tecido ósseo (Bauer e Muschler, 2000; Carvalho *et al.*, 2004).

Osseointegração é o processo que apresenta uma fixação rígida e clinicamente assintomática de materiais aloplásticos, realizada e sustentada no tecido ósseo durante as cargas funcionais. Pode ser

dividida em três etapas, a primeira sendo caracterizada pela migração celular osteogênica, suportada pelo tecido de conexão. A segunda fase consiste na deposição de tecido ósseo através da mineralização da matriz, e a terceira, consiste na remodelação óssea ao redor do material. (Pretto e Pagnoncelli, 2005).

O processo de osseointegração depende previamente de osteoindução e osteocondução, que são fenômenos inter-relacionados, mas não idênticos (Albrektsson *et al.*, 2001).

2.13. OSTEOCALCINA

A osteocalcina, também chamada *Bone Gla Protein* (BGP), é a mais abundante das proteínas não colagenosas do osso, constituída por uma única cadeia de 46-50 aminoácidos (Chenu *et al.*, 1994), produzida por osteoblastos (Chenu *et al.*, 1994; Vieira, 1999; Saraiva & Lazaretti-Castro, 2002; Nakamura *et al.*, 2009; Yuen *et al.*, 2012; Verbicaro *et al.*, 2013), condrócitos hipertrofiados e odontoblastos (Vieira, 1999). Esta proteína é depositada na matriz, onde atua como um sinal específico para migração e adesão de osteoclastos, indicando reparo ósseo (Chenu *et al.*, 1994; Vieira, 1999; Verbicaro *et al.*, 2013).

Sua função não é clara, podendo servir de local para depósito de cristais de hidroxiapatita. Na formação da matriz óssea, cerca de 10 a 40% da osteocalcina sintetizada é liberada na circulação (Vieira, 1999). Possui meia-vida de 5 minutos, sofrendo hidrólise no fígado e depuração renal (Saraiva & Lazaretti-Castro, 2002). Apresenta em sua estrutura três ácidos glutâmicos que lhe conferem a capacidade de ligar-se ao cálcio, fator importante no processo de mineralização da matriz óssea já formada (Saraiva & Lazaretti-Castro, 2002). Apesar do fato de ser depositada em quantidades significativas na matriz óssea, não é um marcador de reabsorção, pois é totalmente destruída quando inicia a reabsorção promovida pelos osteoclastos (Vieira, 1999). Evidências sugerem o envolvimento desta proteína na indução de reabsorção óssea, através de ensaios realizados *in vitro*, os quais mostraram que a osteocalcina tem atividade quimiotática para células, incluindo monócitos (células precursoras de osteoclastos) (Chenu *et al.*, 1994).

A osteocalcina é um bom marcador não invasivo para avaliar a capacidade osteogênica em estágios iniciais, pois pode ser facilmente medida sem qualquer perda de células, podendo ser detectada antes da mineralização (Nakamura *et al.*, 2009).

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1. Obtenção de hidroxiapatita (HA- β TCP) e pentóxido de nióbio (Nb_2O_5)

Para a obtenção da HA- β TCP, foram utilizados ossos de peixes jovens *Pseudoplatystoma corruscans*, conhecido popularmente como “pintado”, cedidos pelo Núcleo de Pesquisas em Limnologia Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUPELIA-UEM). O processamento dos ossos, preparação e confecção das pastilhas foi realizado no Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá.

Primeiramente, os ossos foram limpos em água quente e lavados diversas vezes com escova, para remover os tecidos moles. Em seguida, o material restante foi seco ao ar e calcinado a 900°C durante 8 horas em atmosfera livre, eliminando assim qualquer resíduo orgânico dos ossos, restando apenas a fase mineral dos ossos. Após este processo, para a produção de um pó nano estruturado, o material foi triturado em almofariz de ágata e submetido à moagem de alta energia a 300rpm durante 8 horas em moinho Retsch PM 100 (Haan, Alemanha), utilizando-se vaso de moagem e esferas de zircônia em razão de massa esfera/massa pó igual a 6/1.

O pentóxido de nióbio (Nb_2O_5) foi produzido a partir do tratamento de cavacos de nióbio metálico cedidos pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM, Araxá, Brasil). O material foi tratado termicamente em atmosfera de ar a 1000°C por uma hora e então submetido a processo de moagem para que houvesse a redução do tamanho das partículas.

3.2. Produção das pastilhas de HA- β TCP e do compósito baseado em HA- β TCP- Nb_2O_5

Para a produção das pastilhas do compósito, os pós dos precursores foram misturados na proporção de 1:1 em volume percentual e moídos em moinho de bolas por três horas em razão massa esfera/massa pó igual a 6/1. Após o processo de moagem o material resultante foi compactado uniaxialmente a 40 MPa, em forma de pastilha, e prensado isostaticamente a 117 MPa.

As pastilhas foram sinterizadas por uma hora a 1000°C em atmosfera de ar, obtendo-se no final do processo, amostras cilíndricas com diâmetro de 8mm e espessura de 1mm. Em seguida, as amostras sinterizadas foram lixadas com lixas de granulometria 400, até atingirem uma espessura de 0.65mm de espessura, e posteriormente, lavadas em ultrassom (UNIQUE – Ultracleaner 1400^a), por 10 minutos, em três etapas: acetona, água destilada e álcool etílico. Por fim, as amostras foram armazenadas em estufa a 40°C (Nova Técnica - NT522) e auto clavadas.

Para a produção das pastilhas de HA- β TCP, usadas como controle, o procedimento realizado foi semelhante, exceto pelas etapas de mistura e moagem.

Após a sinterização, a pastilha de HA- β TCP apresentou 87,61% de HA e 12,39% de β -TCP. Na pastilha do compósito ocorreu a formação de três fases cristalinas: CaNb_2O_6 (35,36%) $\text{PNb}_9\text{O}_{25}$ (17,21%) e β -TCP (47,43%) (Kyiochi Junior, 2013).

Foram utilizadas como molde para a confecção das pastilhas calotas cranianas de ratos, com 8 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade. O modo de obtenção das calotas será descrito no item procedimento cirúrgico.

3.3. Procedimento experimental em animais

O trabalho foi desenvolvido como resultado da parceria entre os laboratórios de Histotécnica Animal, do Departamento de Ciências Morfológicas e Laboratório de Estudos Fototérmicos, do Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá – UEM.

Foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*), adultos, com 90 dias de idade, peso corporal entre 250 e 300 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (Parecer no 079/2010).

Os animais foram divididos em 2 grupos: (1) Grupo controle (positivo) no qual os defeitos foram preenchidos com a pastilha de HA- β TCP; (2) Grupo compósito, no qual os defeitos foram preenchidos com a pastilha do compósito baseado em HA- β TCP- Nb_2O_5 .

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com uma associação 1:1 de 0,1ml/100g de cloridrato de cetamina 10% (Ketamina®, Agener União, Brasília, Brasil) e 0,1ml/100g de cloridrato de xilazina 2% (Rompum®, Bayer AG, Leverkusen, Alemanha). Após tricotomia da região da cabeça e anti-sepsia com iodo tópico, realizou-se incisão transversal com bisturi e lâmina, da pele até o periósteo, na região da calvária. Os tecidos moles foram afastados até que a área a ser removida fosse visualizada.

Na calvária de cada animal, foi produzido um defeito ósseo com 8 mm de diâmetro (tamanho crítico), e 1mm de profundidade utilizando-se broca do tipo trefina (Neodent®, Curitiba, Brasil), montada em peça-reta (Kavo®, Joinville, Brasil) acoplada a um motor elétrico cirúrgico (Branemarck System®, Nobel Biocare, Zurique, Suíça) sob rotação de 1500 r.p.m. com abundante irrigação com soro fisiológico estéril.

Após o preenchimento dos defeitos, com as pastilhas o retalho foi reaproximado e suturado com pontos descontínuos de Mononylon 4-0 (Ethicon® Johnson, USA) e a região recebeu aplicação tópica da solução alcoólica de polivinilpirrolidona iodada, como medida anti-séptica local.



Figura 1. Calvária de rato Wistar após a confecção de defeito de tamanho crítico (8mm). Em (A) defeito sem a pastilha e em (B) a pastilha do biomaterial posicionada sobre o defeito.

Os animais foram observados no período inicial da recuperação anestésica e em seguida mantidos em gaiolas individuais em condições ambientais apropriadas, ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura de 20°C, com ração específica para roedores e água *ad libitum*. No decorrer do período experimental foi realizada avaliação clínica, observando-se qualquer alteração no local em que foi realizada a cirurgia, assim como antes de sua morte, observando-se a ocorrência ou não de edema e eritema.

Após 7, 15, 30 e 45 dias (n=5 animais/período/grupo), os animais foram mortos por meio da injeção do triplo da dose anestésica da mistura 1:1 de cloridrato de cetamina (Ketamina®, Agener União, Brasília, Brasil) e cloridrato de xilazina (Rompum®, Bayer AG, Leverkusen, Alemanha) em partes iguais.

As amostras da calvária foram coletadas e processadas para estudo em microscopia de luz.

3.4. Estudo microscópico

Amostras da calvária (n=5 animais/período/grupo) contendo os defeitos com as pastilhas foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% por 24 horas e descalcificadas em solução de Morse (ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20%), durante oito dias. As amostras foram divididas ao meio, e processadas para inclusão em parafina.

A partir do centro da amostra, foram feitos cortes transversais, seriados, com 7µm de espessura. A sequência seriada dos cortes foi montada em lâminas diferentes, de modo que em cada lâmina obteve-se uma sequência semi-seriada. Desta forma uma mesma estrutura poderia ser co-localizada por métodos de coloração diferentes. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação geral da morfologia, com Azan para avaliar o colágeno ou imunocoradas para detectar a osteocalcina nos tecidos.

Para imunocoloração, foi utilizado anticorpo primário policlonal *Osteocalcin* produzido em camundongo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA), na concentração de 1:200, para detectar

osteocalcina nos tecidos. Foi utilizado o *kit Histostain-Plus Broad Spectrum* (DAB) (Invitrogen Corporation, Camarillo, EUA), para revelar a reação, conforme as instruções do fabricante.

A análise das lâminas em relação à positividade da reação foi realizada em microscópio óptico Nikon® (Eclipse 80i, Shimjuku, Japão) acoplado com câmera de alta resolução Nikon® (DS-Fi1c, Shimjuku, Japão).

4. RESULTADOS

Os resultados incluem a descrição da morfologia e da imunocoloração com osteocalcina nos tecidos que participam da regeneração dos defeitos ósseos de tamanho crítico: o periósteo, a dura-máter e o tecido marginal ao defeito.

A análise dos defeitos mostrou que nenhum dos materiais estimulou o desenvolvimento de resposta inflamatória ou fibrose em nenhum dos períodos de observação. As margens ósseas adjacentes ao defeito sofreram remodelação durante todo o período de observação. As margens ósseas cresceram continuamente, ao longo do tempo, embora este crescimento não tenha sido regular ao longo de toda a circunferência.

Não houve diferença aparente na intensidade de coloração imunohistoquímica nos tecidos analisados, quando comparados cortes histológicos de animais controle e aqueles do grupo compósito. Entretanto, em ambos os grupos, nos períodos de observação de 7 e 30 dias as estruturas apresentaram imunocoloração mais intensa em relação aos demais períodos de observação.

4.1. *Observação aos 7 dias*

No sétimo dia de regeneração, os tecidos de reparo apresentaram aspecto geral semelhante, nos dois grupos estudados.

Houve algum crescimento ósseo a partir das bordas do defeito e algum crescimento aposicional sobre o osso antigo, em ambos os grupos (Figura 2)

O tecido ósseo localizado na área circunscrita ao defeito apresentou importante expressão de osteocalcina na matriz, em osteócitos e osteoblastos. Na medula óssea, algumas células contendo grânulos e o endotélio dos capilares sanguíneos apresentou imunocoloração, em ambos os grupos. Nas áreas de crescimento aposicional esses mesmos elementos apresentaram maior intensidade de coloração para a osteocalcina (Figura 2).

Na matriz, no osso novo ou no antigo, áreas pouco coradas ou com ausência de coloração, formadas por osso lamelar se intercalavam com áreas bem marcadas, de osso não lamelar (osteóide). (Figura 2).

Co-localizando cortes imunocorados com osteocalcina com cortes seqüenciais corados com Azan observou-se que as áreas com maior expressão de osteocalcina corresponderam àquelas coradas em azul, por Azan, indicando aí a ocorrência de osso primário. Estas regiões apresentaram a matriz com arranjo irregular. As áreas de osso lamelar, que se coraram em vermelho, com Azan, corresponderam àquelas com pouca ou nenhuma expressão para osteocalcina (Figura 3).

No tecido conjuntivo cicatricial que se desenvolveu logo abaixo do periósteo, foram observados centros de ossificação primária de formato irregular, circundados por um número de osteoclastos (Figura 3).

Uma característica atípica observada neste período foi o desenvolvimento de cartilagem hialina num ponto de inserção osso-músculo. A cartilagem apresentou condrócitos hipertrofiados e o conjuntivo envolvente muito celularizado e com forte expressão de osteocalcina (Figura 4).

4.2. Observação aos 15 dias

Neste período a expressão de osteocalcina foi menor comparado aos 7 dias.

A dura-máter dos animais de ambos os grupos apresentou formações ósseas intramembranas, com forma elíptica, localizadas em áreas centrais do defeito, sem nenhuma conexão com as margens (Figura 5). Essas estruturas apresentaram coloração positiva para osteocalcina na região mais periférica.

Neste período o periósteo e a dura-máter apresentaram maior número de centros de ossificação primária. O tecido ao redor dessas áreas possuía muitas células (clastos entre outras) e vasos sanguíneos. A expressão de osteocalcina ocorreu apenas na periferia desses centros. Esta característica foi observada em defeitos de animais de ambos os grupos estudados (Figura 6).

Dos cinco animais analisados, no grupo compósito, um deles apresentou próximo aos centros de ossificação primária, no periósteo, blastemas ósseos imunorreativos para osteocalcina (Figura 7). Coradas com H&E, estas áreas mostravam grande número de capilares, algumas células com núcleos picnóticos e encolhimento citoplasmático e outras de aspecto normal. As células eram separadas umas das outras por finos tabiques de matriz acidófila (Figura 6).

De forma semelhante aos sete dias de observação, a matriz de osso lamelar apresentou imunocoloração fraca ou ausente e as áreas de osso novo ou as margens ósseas distais ao defeito apresentaram-se mais coradas com osteocalcina. O periósteo apresentou células isoladas, imunocoradas (Figura 8).

4.3. Observação aos 30 e 45 dias

Aos 30 e 45 dias a morfologia dos tecidos de reparo foi semelhante.

Nestes períodos o periósteo apresentou-se hemático, ou seja, com uma grande quantidade de hemácias entre suas fibras (Figuras 9B e 10A)

Aos trinta dias as formações de tecido ósseo primário foram mais frequentes nos animais do grupo compósito (Figura 9C). Aos 45 dias de observação apenas um animal deste grupo apresentou tal estrutura.

Do ponto de vista morfológico, o reparo nos defeitos preenchidos com o compósito apresentou características de maior atividade, caracterizada por maiores áreas de remodelação da matriz e hipertrofia das células ósseas (Figuras 9D, E, F e 11C).

Aos 30 dias, no grupo compósito, o tecido ósseo que cresceu por baixo da pastilha apresentou áreas de matriz basófila e células hipertróficas, características de cartilagem hialina (Figura 9D).

Os cortes corados com H&E mostraram que as margens ósseas continuaram crescendo ao longo do tempo. Aos 45 dias, em alguns casos, as margens em crescimento alcançaram as formações ósseas intramembranasas fechando quase completamente os defeitos (Figuras 11A, B).

Nestes períodos, as regiões onde há maior expressão de osteocalcina, são aquelas mais distantes ao defeito que apresentam matriz não lamelar. Células isoladas imunocoradas com osteocalcina foram identificadas na medula óssea, no periósteo e no tecido conjuntivo frouxo (Figuras 10D e 11D).

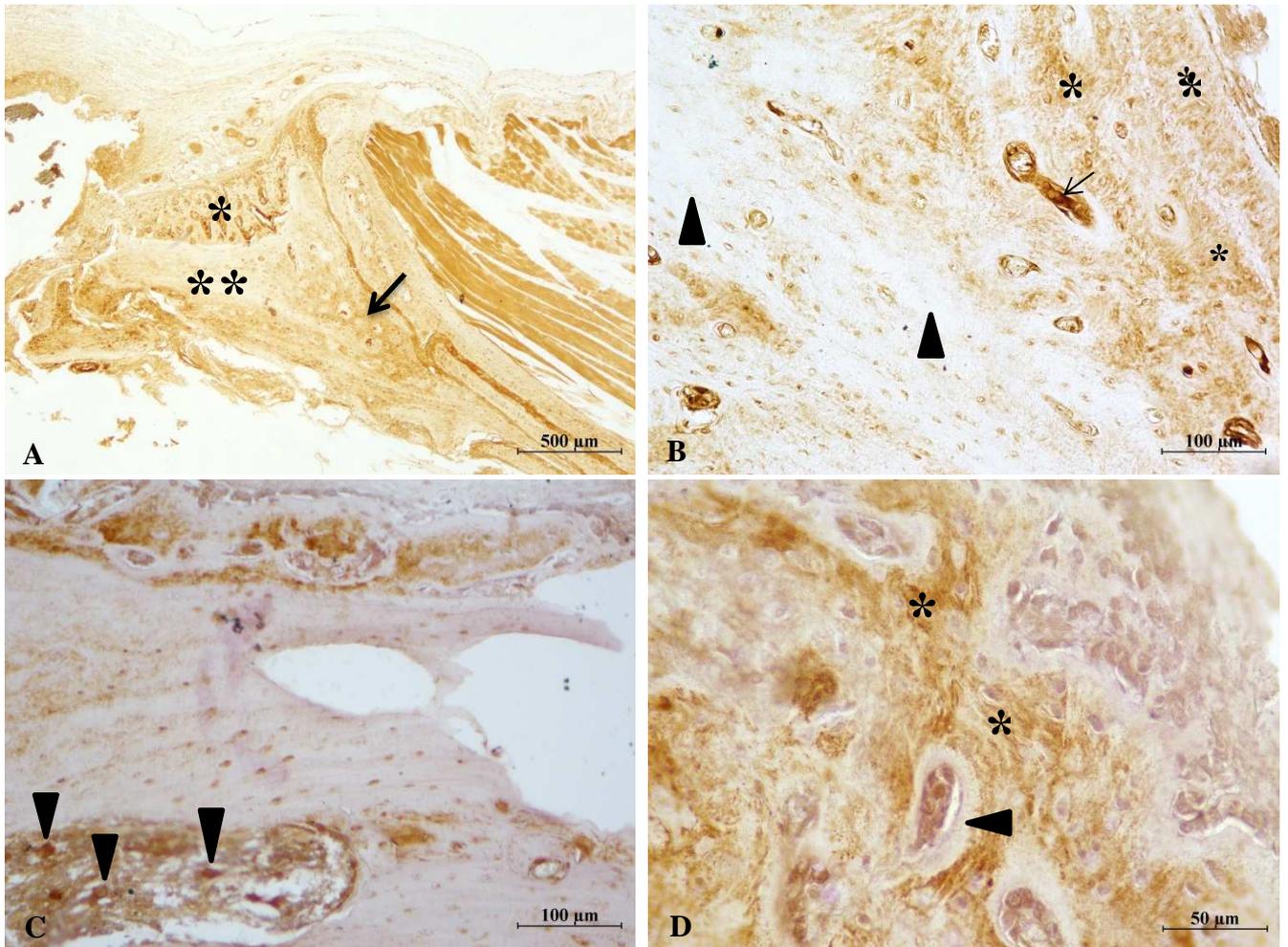


Figura 2. Fotomicrografia de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos sete dias após o preenchimento com HA- β TCP (hidroxiapatita beta-fosfato tricálcio) (A) e compósito baseado em HA- β TCP-Nb₂O₅ (hidroxiapatita beta- fosfato tricálcio – pentóxido de nióbio) (B, C e D). Nota-se em (A), área de crescimento ósseo aposicional (*) sobre o osso antigo (**) e região de remodelação óssea (seta) distal ao defeito, com forte expressão de osteocalcina. Em (B e D), observa-se áreas de osso não lamelar (*), com maior expressão de osteocalcina, áreas de osso lamelar (cabeça de seta) com pouca ou nenhuma expressão, além de forte marcação no endotélio capilar (seta), no interior de um canal de Volkmann. Em (C), observa-se células osteoprogenitoras (cabeça de seta) imunocoradas. Aumento original: 4X (A), 20X (B, C), 40X (D). Imunohistoquímica para osteocalcina.

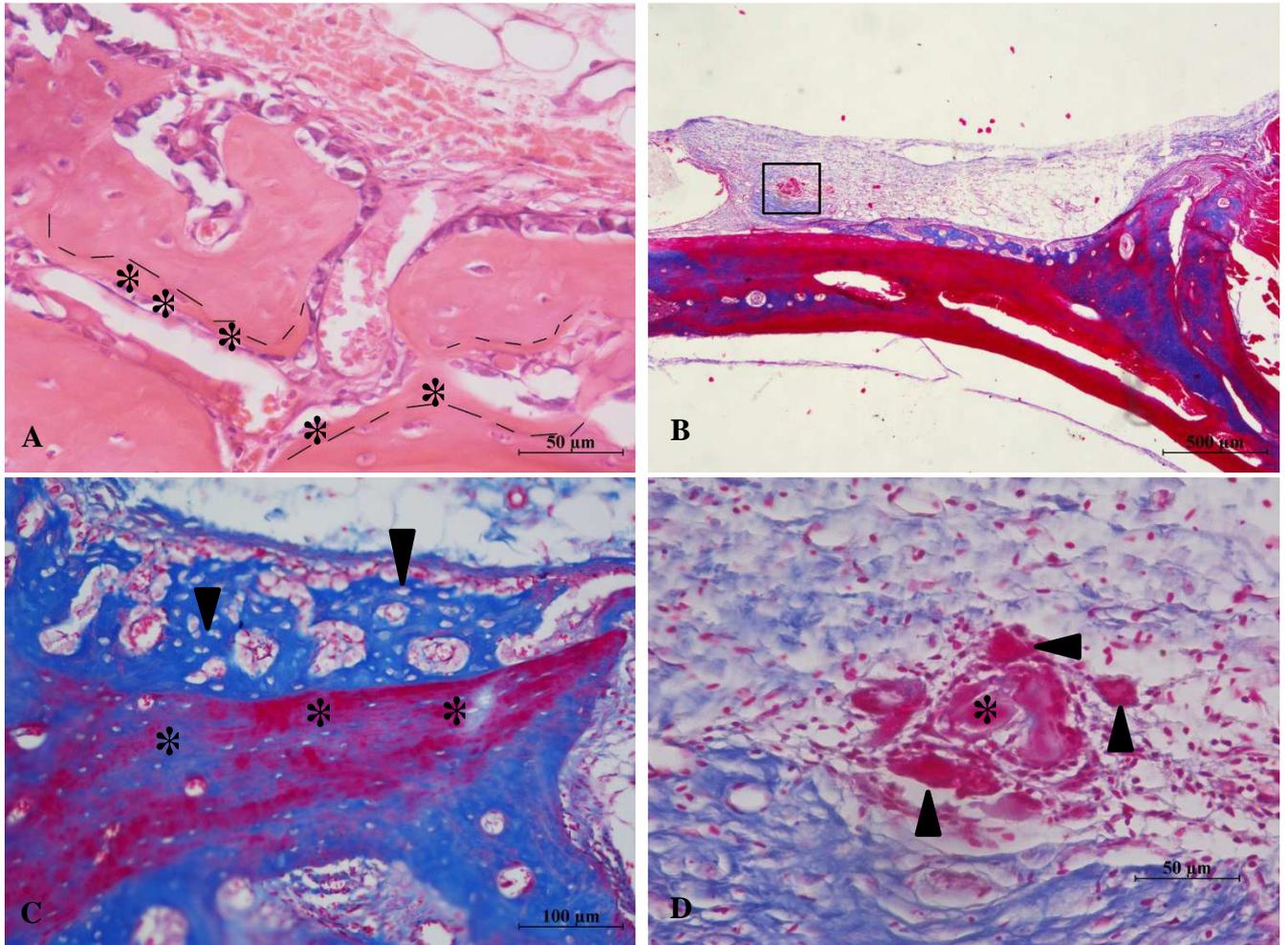


Figura 3. Fotomicrografia de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos sete dias após o preenchimento com HA- β TCP (hidroxiapatita beta-fosfato tricálcio) (B, C, D) e compósito baseado em HA- β TCP-Nb₂O₅ (hidroxiapatita beta- fosfato tricálcio – pentóxido de nióbio) (A). Em (A), observa-se a presença de linha de crescimento (*) indicando formação óssea aposicional (tracejado). Em (B), uma vista panorâmica da margem óssea localizada ao lado do defeito. Observar o tecido conjuntivo frouxo contínuo com o periósteo e a matriz óssea antiga (vermelho) e o osteóide (azul); área em evidência com centro de ossificação primária (ver maior aumento em D). Em (C), nota-se formação óssea aposicional com osteócitos hipertróficos (cabeça de seta) mergulhados em osteóide (azul) e áreas de remodelação óssea (*) com osso antigo (vermelho). Em (D), centro de ossificação primário (*), circundado por osteoclastos (cabeça de seta). Aumento original: 4X (B), 20X (C), 40X (A, D). H&E (A), Azan (B, C, D).

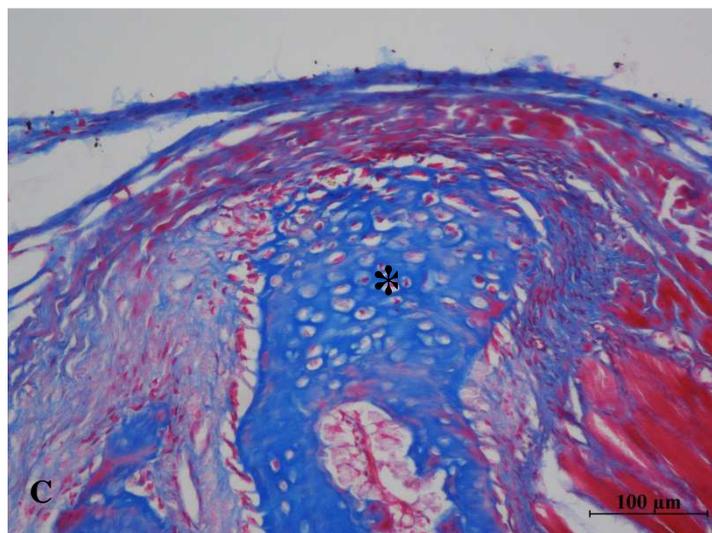
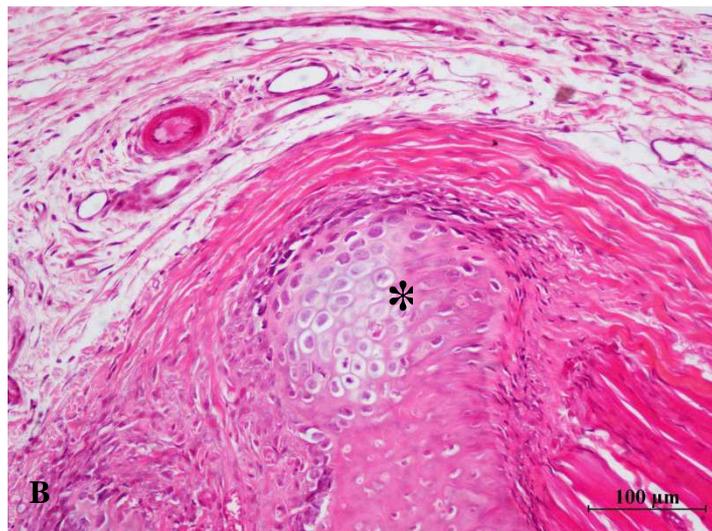
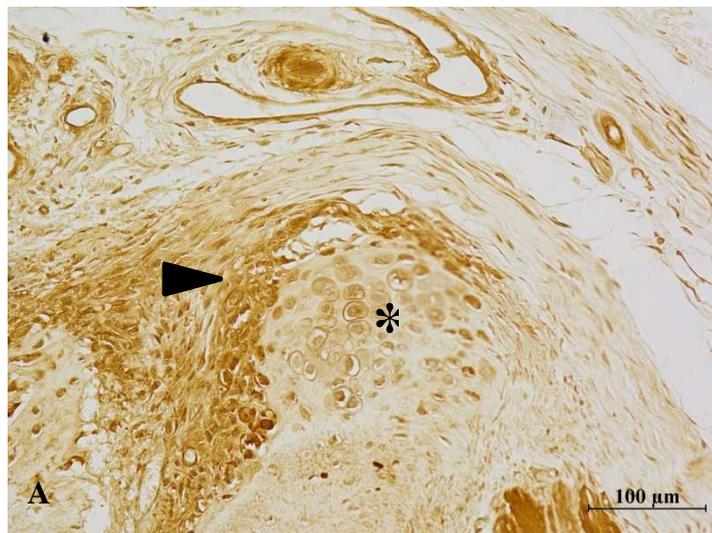


Figura 4. Fotomicrografia de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos sete dias após o preenchimento com HA- β TCP (hidroxiapatita beta-fosfato tricálcio). Nota-se em (A, B e C), área de cartilagem hialina com condrócitos hipertrofiados (*). Em (A) conjuntivo envolvente muito celularizado e com forte expressão de osteocalcina (cabeça de seta). Aumento Original: 20X. Osteocalcina (A), H&E (B), Azan (C).

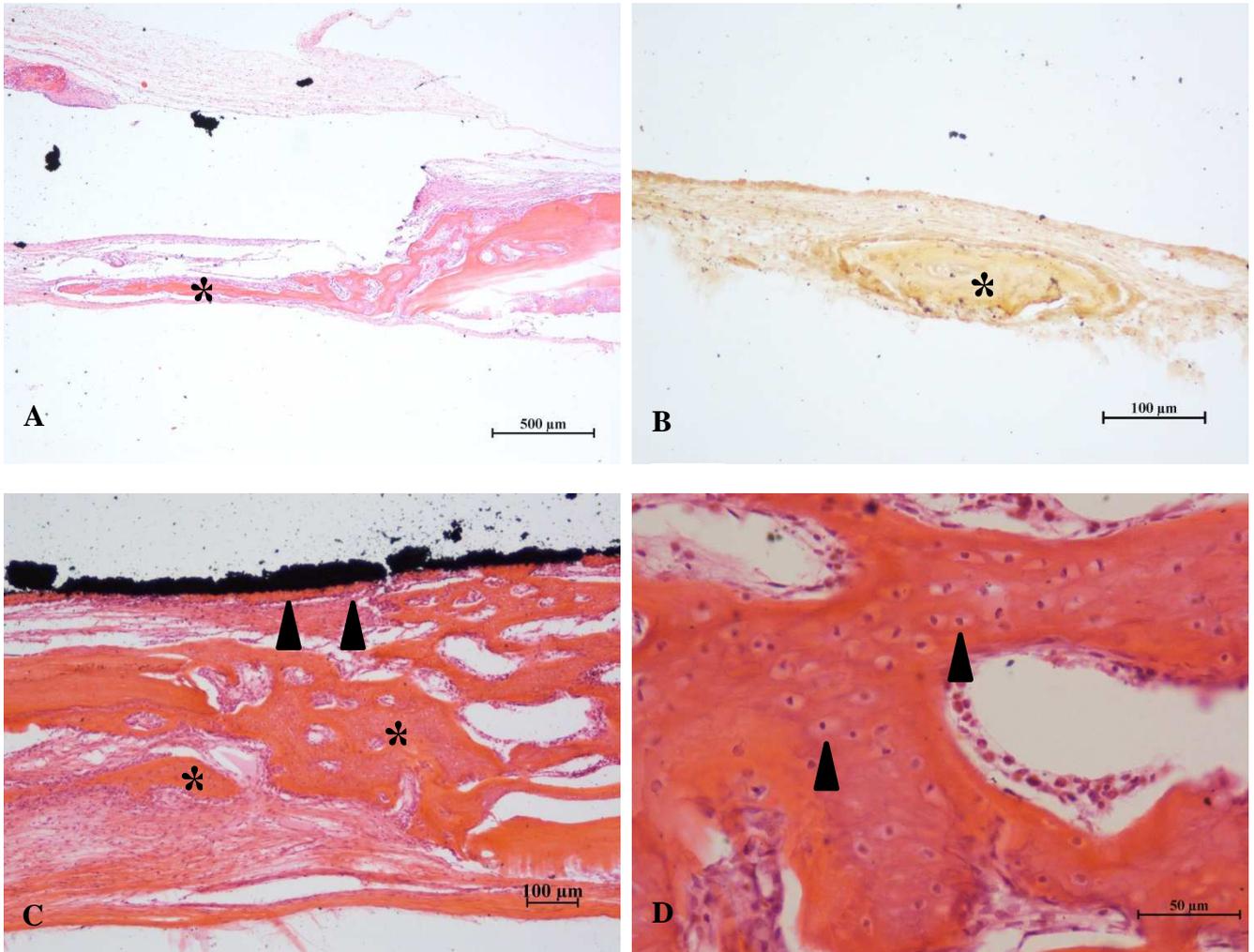


Figura 5. Fotomicrografia de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos quinze dias após o preenchimento com o composto baseado em HA- β TCP-Nb₂O₅ (hidroxiapatita beta- fosfato tricálcio – pentóxido de nióbio). Em (A) vista panorâmica da margem óssea em crescimento (*). Em (B) formação óssea intramembranosa (*) na dura-máter, com coloração positiva para osteocalcina. Em (C), área de formação óssea intramembranosa (*). Notar o contato direto do tecido ósseo com o composto (cabeça de seta). Em (D), detalhe de uma área de remodelação óssea com osteócitos hipertróficos (cabeça de seta). Aumento original: 4X (A) 10X (B), 20X (C), 40X (D). H&E (A,C, D) e Osteocalcina (B).

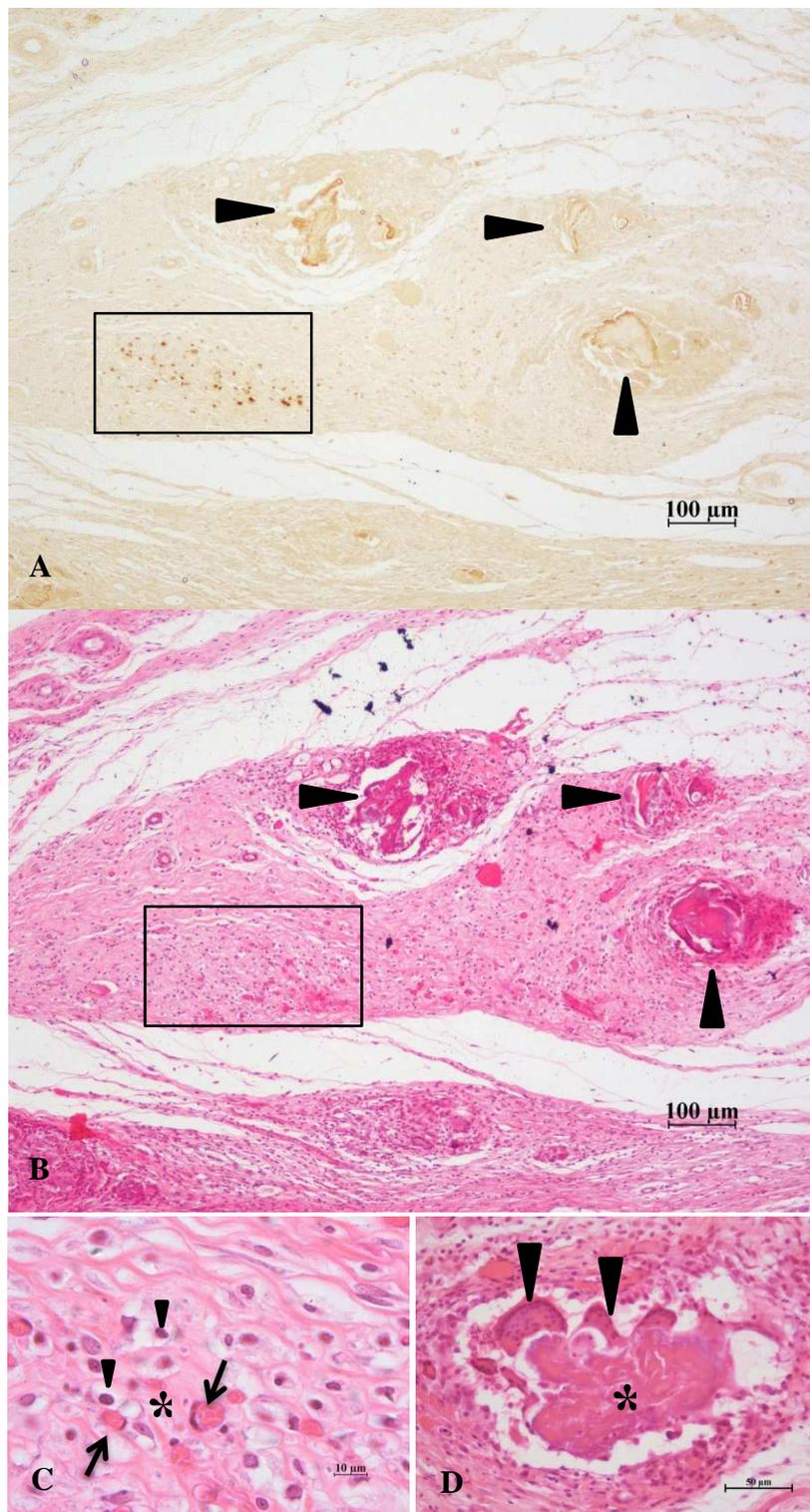


Figura 6. Fotomicrografia de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos quinze dias após o preenchimento com o compósito baseado em HA- β TCP-Nb₂O₅ (hidroxiapatita beta- fosfato tricálcio – pentóxido de nióbio). Observar formações de tecido ósseo primário (cabeça de seta) e no detalhe um blastema ósseo, corados com osteocalcina (A) e H&E (B). Em (C) no maior aumento do detalhe observar a presença de capilares (seta), células com núcleos picnóticos (cabeça de seta) entremeados por finos tabiques de matriz acidófila (*). Em (D), um detalhe do centro de ossificação primário (*), circundado por osteoclastos (cabeça de seta). Aumento original: 20X (A, B), 100X (C), 40X (D). Osteocalcina (A) e H&E (B, C, D).

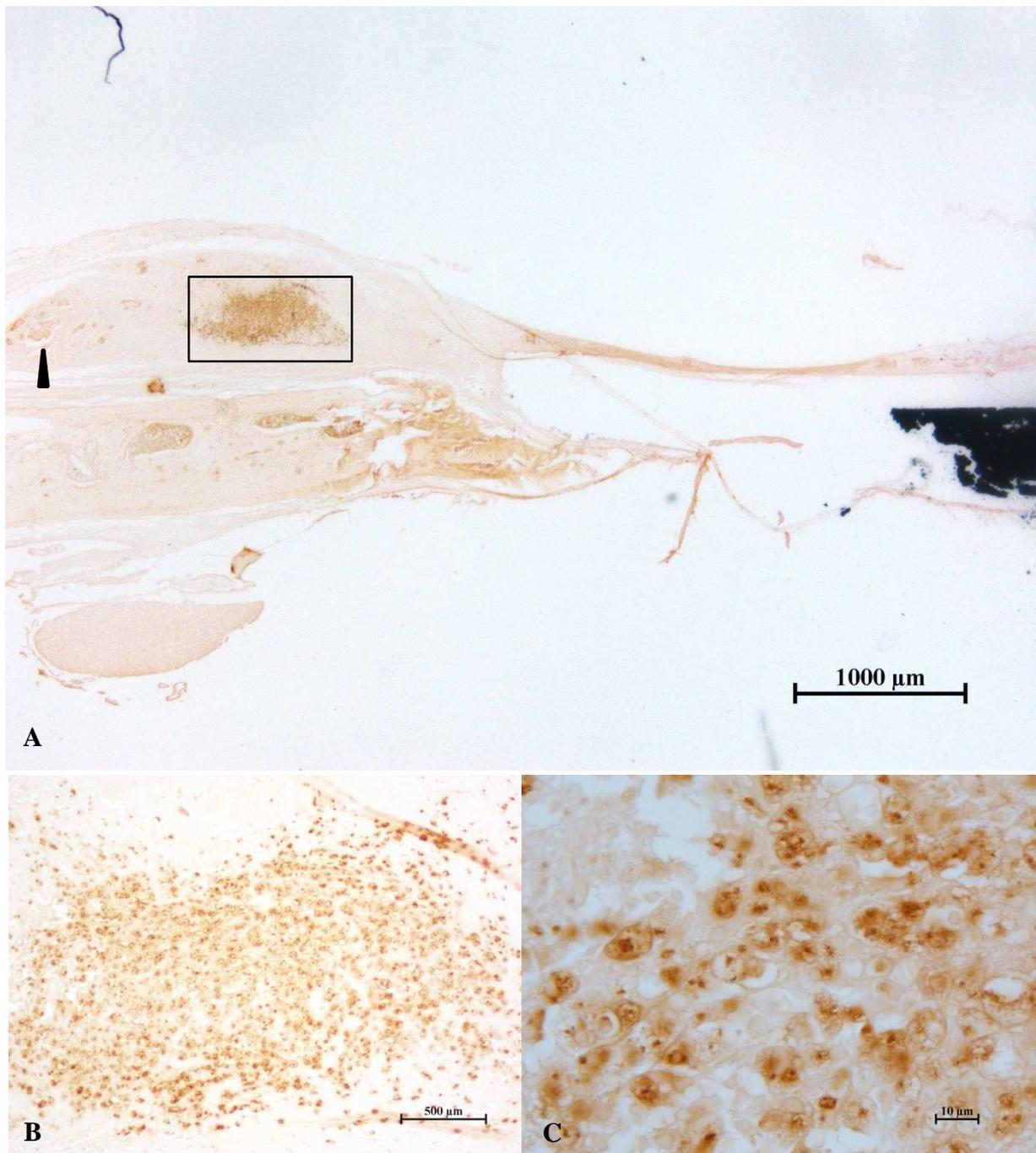


Figura 7. Fotomicrografia de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos quinze dias após o preenchimento com o compósito baseado em HA- β TCP-Nb₂O₅. (hidroxiapatita beta- fosfato tricálcio – pentóxido de nióbio). Em (A) uma vista panorâmica do defeito mostrando a localização distal à margem do defeito do blastema ósseo (em destaque) imunorreativo para osteocalcina. Em (B) e (C), detalhe do blastema ósseo. Aumento original: 2X (A), 4X (A), 100X (C). Imunohistoquímica para osteocalcina.

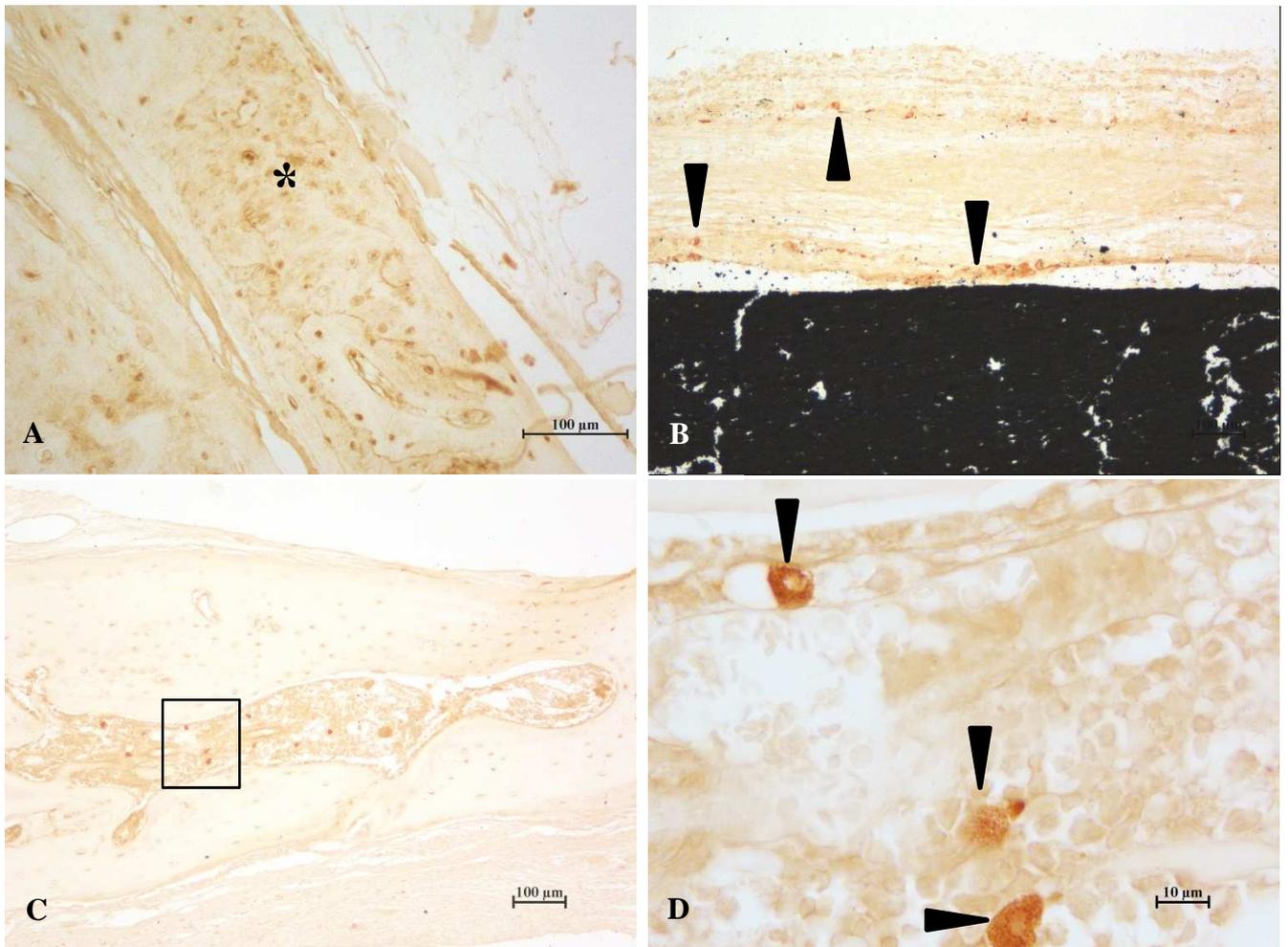


Figura 8. Fotomicrografia de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos quinze dias após o preenchimento com o compósito baseado em HA- β TCP-Nb₂O₅ (hidroxiapatita beta- fosfato tricálcio – pentóxido de nióbio). Em (A) área de remodelação óssea, notar matriz não lamelar com maior expressão de osteocalcina (*) do que a matriz lamelar. Em (B) células imunocoradas no periósteo (cabeça de seta). Em (C) no destaque e (D) (cabeça de seta), células osteoprogenitoras marcadas na medula óssea. Aumento original: 10X (A, B e C), 100X (D). Imunocoloração para osteocalcina.

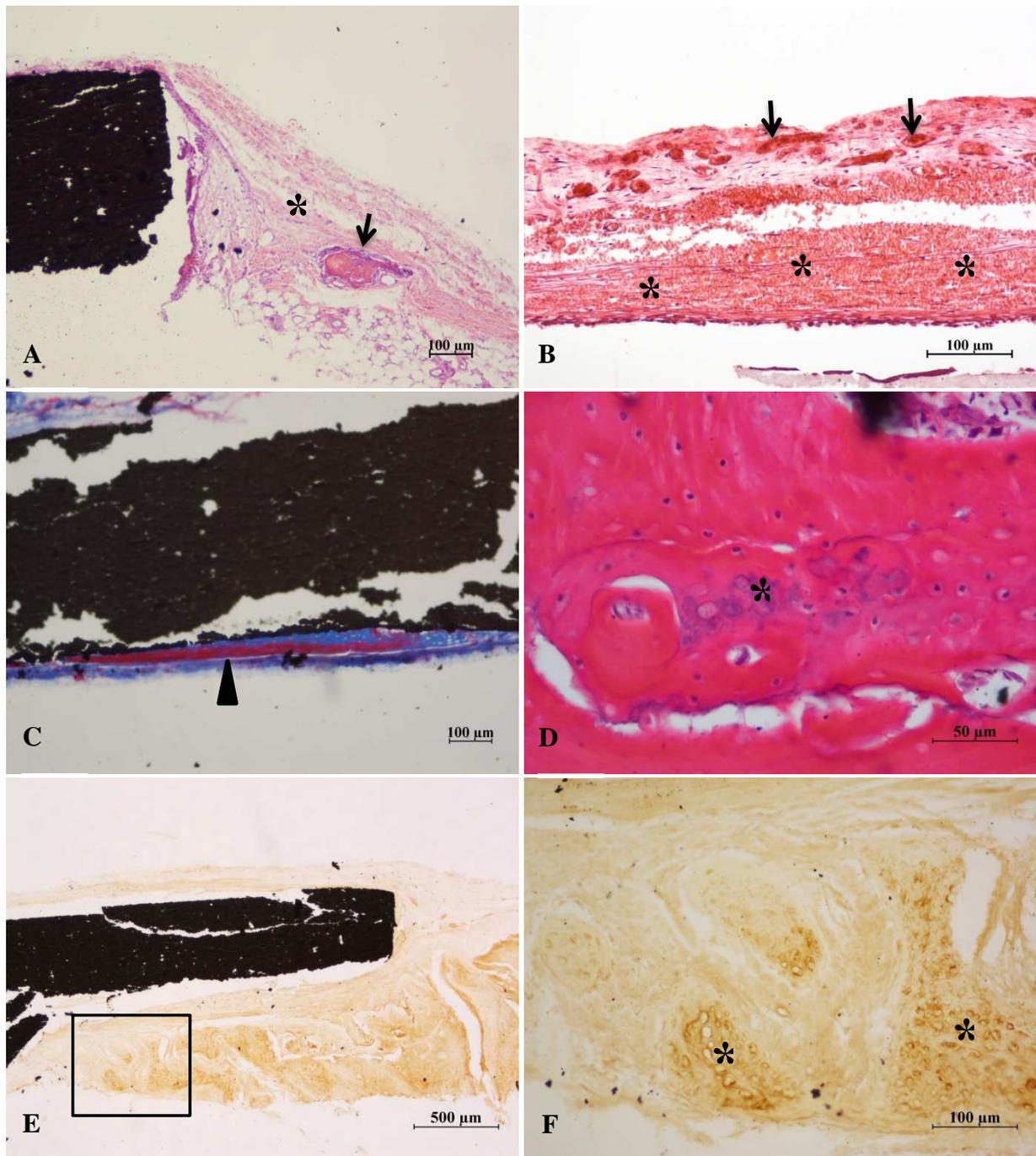


Figura 9 Fotomicrografia de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos trinta dias após o preenchimento com HA- β TCP (hidroxiapatita beta-fosfato tricálcio) (B) e compósito baseado em HA- β TCP-Nb₂O₅ (hidroxiapatita beta- fosfato tricálcio – pentóxido de nióbio) (A, C, D, E, F). Em (A) observar a redução do tecido conjuntivo sub-periosteal (*) e a presença de centros de ossificação primária (seta). Em (B), observa-se no periosteio, grande quantidade de vasos hiperêmicos (setas) e de hemácias localizadas entre as fibras de colágeno (periosteio hemático) (*). Em (C), observar uma formação óssea intramembranosa com osso maduro (vermelho) e imaturo (azul) (cabeça de seta). Em (D), áreas de matriz basófila e células hipertróficas (*) em meio ao tecido ósseo neoformado. Em (E), região de remodelação óssea com marcação mais intensa para osteocalcina com detalhe em evidência em (F) onde é possível observar a hipertrofia dos osteócitos (*). Aumento original: 4X (E), 10X (A, C), 20X (B, D, F). H&E (A, B, D), Azan (C), Osteocalcina (E, F).

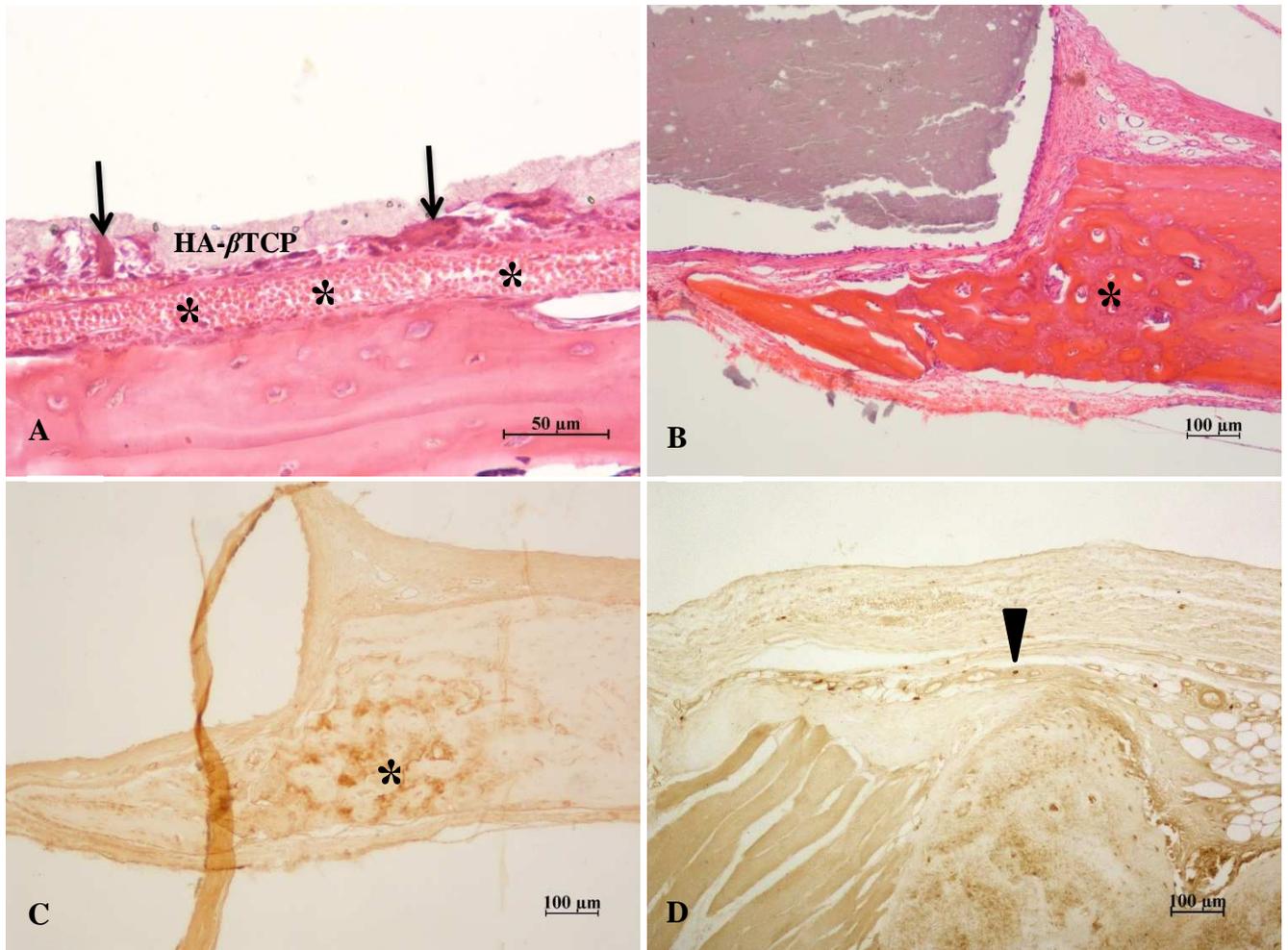


Figura 10. Fotomicrografia do defeito ósseo de tamanho crítico produzido na calvária de ratos trinta dias após o preenchimento com HA- β TCP (hidroxiapatita beta-fosfato tricálcio). Em (A), observar a grande quantidade de hemácias (*) na dura mãe, e a presença de osteoclastos (seta). Em (B), área de remodelação óssea (*), observar a mesma região em (C), com marcação para osteocalcina. Em (D), nota-se a presença de células no periósteo (cabeça de seta) marcadas com osteocalcina. Aumento original: 10X (B, C, D), 40X (A). H&E (A, B), Osteocalcina (C, D).

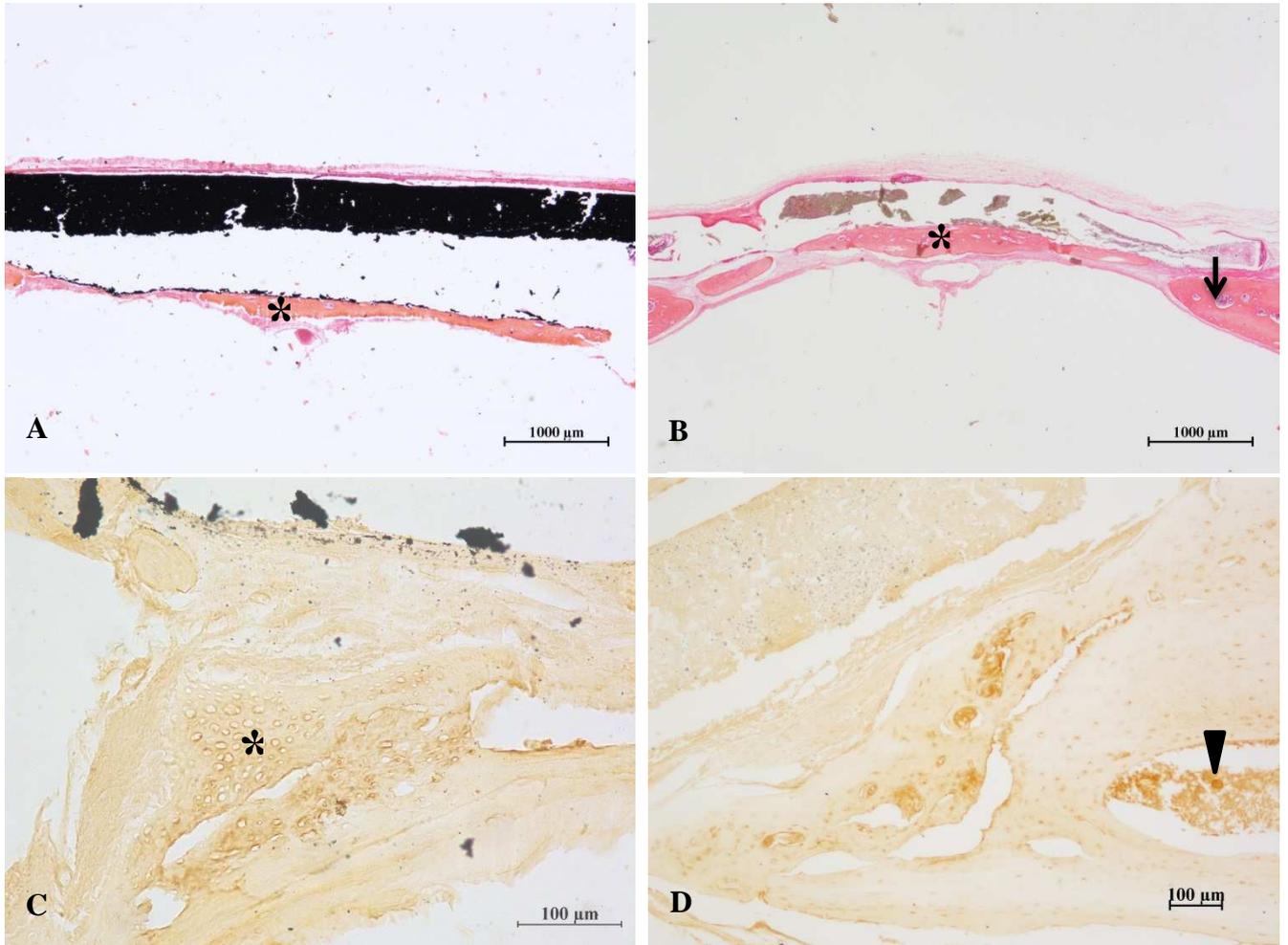


Figura 11. Fotomicrografia do defeito de tamanho crítico produzido na calvária de ratos quarenta e cinco dias após o preenchimento do defeito com HA- β TCP (hidroxiapatita beta-fosfato tricálcio) (A, B), e compósito baseado em HA- β TCP-Nb₂O₅ (hidroxiapatita beta- fosfato tricálcio – pentóxido de nióbio) (C, D). Em (A e B) observar ossificação intramembranosa (*) fechando os defeitos. Em (C) maior expressão de osteocalcina em área de hipertrofia dos osteócitos (*) e em (D), observar área de crescimento aposicional e células (cabeça de seta) na medula. Aumento original: 2X (D), 4X (A,D), 10X (B). Osteocalcina (C, D), H&E (A, B).

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, o modelo ortotópico de defeito de tamanho crítico em calvária de ratos foi usado com a finalidade de avaliar os tecidos de regeneração após o implante do compósito baseado em hidroxiapatita β -fosfato tricálcio (HA- β TCP) - pentóxido de nióbio (Nb_2O_5), na forma de pastilha. A morfologia e a expressão de osteocalcina no periósteo, na dura-máter e no tecido ósseo remanescente foram avaliados nos períodos de 7, 15, 30 e 45 dias após a confecção do defeito.

No controle positivo do experimento os defeitos foram preenchidos com pastilhas de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) pura, natural, obtidas de peixes jovens, contendo β - fosfato tricálcio (β -TCP) ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e elementos como Mg^{++} , K^+ , Na^+ , SO^- (Lacerda, 2005), ausentes na maioria das hidroxiapatitas sintéticas. A pastilha controle apresentou 12,39% de β -TCP e 87,61% de HA (Bonadio, 2011). As propriedades de biocompatibilidade, bioatividade e atividade osteocondutora descritas para a HA sintética (Galois e Mainard, 2004; Liu e Lun, 2012) foram constatadas nesta HA natural, visto que nos defeitos controle não houve resposta inflamatória e os tecidos apresentaram-se muito celularizados e vascularizados (Kyiochi Junior, 2013). Neste estudo demonstramos que a HA natural apresentou atividade osteoindutora, como já demonstrado para a HA sintética (Szpalski *et al.*, 2010). Nenhuma das pastilhas havia sido completamente reabsorvida ao final do experimento.

A hidroxiapatita (HA) pura é reabsorvida muito lentamente *in vivo* - 1 a 2% ao ano; apresenta alta fragilidade e propriedades mecânicas pobres. O fosfato tricálcio (TCP) isoladamente sofre reabsorção mais rápida (Liu e Lun, 2012), via dissolução e fragmentação (Constantino e Friedman, 1994). As cerâmicas de fosfato de cálcio bifásico constituídas de HA e TCP tem mostrado melhor bioperformance no corpo vivo do que a hidroxiapatita pura ou o TCP puro (Yubao *et al.*, 1994; Liu e Lun, 2012). Individualmente estas duas substâncias apresentam boas propriedades: HA proporciona um ambiente favorável para a proliferação e diferenciação dos osteoblastos; TCP fornece íons cálcio e fosforo, úteis para diferenciação e a maturação dos osteoblastos; ambos são capazes de estimular a formação de osso novo. Entretanto, quando estas duas substâncias são associadas formando HA-TCP, também denominado fosfato de cálcio bifásico (BCP), podem produzir osso novo em menos tempo (Liu e Lun, 2012).

A cerâmica bifásica é biologicamente mais ativa que a HA pura. A HA presente nos ossos é pouco cristalina, não estequiométrica e contém água incorporada na rede cristalina. Quando a HA contém a fase β TCP se torna mais parecida com a HA mineral encontrada em ossos, podendo ser esta a razão pela qual apresenta desempenho superior na formação de novo tecido ósseo (Yubao *et al.*, 1997). A principal desvantagem da HA- β TCP é que quando são empregadas como arcações são muito frágeis e reabsorvidas muito lentamente (Szpalski *et al.*, 2010).

Com a finalidade de produzir um compósito mais resistente e com as propriedades benéficas do HA- β TCP foi desenvolvido um compósito trifásico elaborado pela mistura de HA- β TCP extraída de ossos do peixe pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) com o pentóxido de nióbio (Nb_2O_5) na proporção 1:1. O compósito, constituído por óxido de fósforo nióbio ($\text{PNb}_9\text{O}_{25}$), óxido de cálcio nióbio (CaNb_2O_6) e β TCP [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], resultou em um produto biocompatível, bioativo e 66% mais resistente do que a HA- β TCP pura (Kyiochi Junior, 2013). A proporção de β TCP no compósito foi cerca de 47,43%. Esta elevada proporção pode ter sido devido à decomposição da hidroxiapatita que não reagiu com o pentóxido de nióbio, já que este foi totalmente consumido na formação das fases CaNb_2O_6 e $\text{PNb}_9\text{O}_{25}$.

Já foi demonstrado que compósitos a base de nióbio, β TCP e HA aumentam significativamente a atividade da fosfatase alcalina e a calcificação por osteoblastos humanos *in vitro*, sendo a quantidade de tecido calcificado diretamente proporcional à concentração de íons nióbio dissolvidos no meio e derivados do material testado, podendo este ser considerado efetivo para o reparo ósseo (Lima *et al.*, 2011).

Um defeito ósseo de tamanho crítico, por definição, consiste no menor defeito ósseo que não cicatriza espontaneamente durante o tempo de vida do animal, ou seja, este defeito deve ser grande o suficiente para que não haja cura espontânea (Schmitz e Hollinger, 1986; Cacchioli *et al.*, 2006; Cooper *et al.*, 2010; Lansdowne, 2010; Gomes e Fernandes, 2011). Este modelo é um dos mais empregados para o estudo dos biomateriais porque permite o estabelecimento de um defeito uniforme, reproduzível e facilmente avaliado por meio de análise radiográfica e histológica. Sua localização anatômica facilita o acesso cirúrgico e o manuseio intra-operatório; a dura-máter e a pele que se localizam respectivamente abaixo e acima do defeito, criam um suporte adequado para os materiais implantados, não havendo necessidade de fixação interna ou externa (Gomes e Fernandes, 2011).

A cura do defeito deve ser avaliada correlacionando-se o tamanho da ferida com o tempo de reparação, mas acima de tudo com a qualidade do tecido regenerado (Cacchioli *et al.*, 2006).

Neste estudo os tecidos de regeneração dos defeitos preenchidos com as pastilhas controle e com o compósito mostraram-se muito ativos em todos os períodos analisados. Do ponto da resposta regenerativa os resultados observados anteriormente, (Kiyochi Junior, 2013) e neste estudo foram muito promissores. Nenhum dos defeitos, com qualquer dos biomateriais, apresentou resposta inflamatória ou desenvolvimento de fibrose. A microporosidade impediu a penetração de vasos e células para o interior do compósito de forma que interface biomaterial-osso apresentou um tecido muito vascularizado e celularizado. Depósitos de matriz óssea diretamente na superfície dos biomateriais foram identificados por meio de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Kyiochi Junior, 2013).

O crescimento ósseo esperado, a partir das margens do defeito, ocorreu ao longo do período de estudo. As pastilhas não foram fixadas ao defeito, foram encaixadas na cavidade e estabilizadas pelo periosteio e pela pele que após serem rebatidos para o procedimento cirúrgico, foram reposicionados. Aos 45 dias de observação alguns animais apresentaram defeitos quase completamente regenerados e outros

com menor grau de regeneração. É possível que as tensões musculares, a carga exercida e o grau de mobilidade tenham influenciado o resultado da regeneração (Cacchioli *et al.*, 2006). Neste aspecto, a observação de formação de cartilagem hialina onde antes havia osso, num ponto de inserção muscular, mereceu destaque neste trabalho. Tem sido sugerida a existência de uma célula osteocondroprogenitora que pode se diferenciar em osteoblasto ou condroblasto, como resposta a pequenas variações das condições locais. De fato, as células mesenquimatosas indiferenciadas têm a capacidade de se diferenciarem numa grande variedade de tipos celulares, dependendo do seu *habitat* e dos fatores reguladores presentes no meio (Judas *et al.*, 2012).

Para avaliar o potencial osteoindutor do compósito, os tecidos de reparo localizados mais distalmente ao defeito foram analisados, levando-se em conta a elevada bioatividade já estudada na interface osso-biomaterial (Kyiochi, 2013) e a interferência dos fatores mecânicos. Para tanto, sempre que possível, a morfologia foi estudada em cortes seriados identificando e co-localizando as áreas por meio de técnicas de coloração diferentes: hematoxilina e eosina (H&E), Azan e imunocoloração com osteocalcina.

A coloração imunohistoquímica é específica e, portanto, limitante do ponto de vista do estudo morfológico. Por meio desta técnica, a expressão de osteocalcina foi detectada em células e na matriz extracelular. A coloração com Azan permitiu diferenciar a matriz óssea antiga (corada em vermelho) daquela neo-formada (corada em azul) e consequentemente identificar as áreas de formação e remodelação óssea. A coloração com H&E complementou as análises, orientando quanto à identificação de células e componentes da matriz extracelular.

Neste estudo, obtivemos dois indícios importantes, de que as pastilhas do compósito exerceram um efeito osteoindutor durante o reparo ósseo. No 15º dia de observação notou-se o desenvolvimento de formações ósseas intramembranas no tecido conjuntivo da dura-máter, abaixo da pastilha, em áreas independentes das margens do defeito. A dura-máter desempenha um papel significativo na cura dos defeitos realizados em calvária visto que parece ser uma fonte primária de células osteogênicas e fatores osteoindutores durante a cura das feridas (Cowan *et al.*, 2004; Cooper *et al.*, 2010). Por sua vez, osteoindução implica no recrutamento de células imaturas que são estimuladas a se diferenciarem em pré-osteoblastos (Albrektsson *et al.*, 2001; Lindhe *et al.*, 2005; Miron e Zhang, 2012). Em uma situação de cicatrização óssea, tal como uma fratura, a maior parte da cicatrização óssea é dependente da osteoindução (Albrektsson e Johansson, 2001). Portanto este resultado sugere que a ossificação intramembranosa ocorreu por osteoindução. Essa mesma característica foi observada nos defeitos controle.

A segunda evidência, também aos 15 dias, foi observada apenas no perióstio dos defeitos preenchidos com o compósito: grupos de células imunocoradas para osteocalcina com organização tal que se assemelhavam a blastemas ósseos. A análise dos cortes seriados corados com H&E apontam para a formação de centros de ossificação primária a partir dos blastemas. Portanto, estes resultados sugerem

que além de apresentar potencial osteoindutor, o compósito apresentou potencial para induzir a formação óssea no tecido conjuntivo, em locais mais distantes daquele da regeneração. A ocorrência de células isoladas imunorreativas para osteocalcina na medula óssea e no periósteo e também a forte marcação nas células endoteliais da medula reforçam sua capacidade deste biomaterial estimular a diferenciação de células mesenquimais e portanto o seu potencial osteoindutor.

Desta forma, este conjunto de características morfológicas descritas no 15º dia sugerem a hipótese de que células osteoprogenitoras provenientes da medula óssea, induzidas pelos biomateriais teriam se diferenciado em osteoblastos no tecido conjuntivo onde iniciaram o processo de formação óssea, visto que não foram capazes de migrar para o interior do biomaterial em função da sua microporosidade.

As células osteogênicas secretam osteocalcina como um marcador para a diferenciação e maturação dos osteoblastos (Nakamura *et al.*, 2009). A imunocoloração negativa para osteocalcina no interior dos centros de ossificação primária sugere que o processo de mineralização está em curso, visto que a osteocalcina age como um regulador negativo da formação óssea, ou seja, as células osteogênicas devem produzir e secretar a proteína antes da mineralização (Nakamura *et al.*, 2009). A ausência de um arcabouço para dar suporte ao osso justificaria a presença do grande número de osteoclastos reabsorvendo a matriz neo formada.

A imunocoloração por osteocalcina foi mais intensa ao 7º e 30º dias de reparo. O padrão de imunocoloração foi semelhante para os tecidos dos grupos controle e compósito. Não foi possível fazer uma relação entre a frequência de imunocoloração com a composição química das pastilhas. As áreas de tecido ósseo mais coradas foram aquelas que apresentaram a matriz mais irregular e que apareciam coradas em azul com Azan, indicando serem áreas de remodelação.

Aos 45 dias no osso velho, em pontos mais distantes do defeito, havia muitas áreas de remodelação, com intensa marcação para osteocalcina. Estas áreas provavelmente estavam sob a influência da desestabilização da calvária, após remoção de parte da calota craniana. Além disso, outros fatores como a colocação do implante na forma de peça única somado à lenta reabsorção das pastilhas e ao acréscimo continuado de osso novo devem ter provocado constantes mudanças nas tensões musculares e no grau de mobilidade dos ossos remanescentes, resultando em remodelação constante.

Os resultados deste estudo mostram que o compósito resultante da associação da HA- β TCP com o Nb₂O₅ além de biocompatível, bioativo e osteocondutor, como já avaliado em estudo anterior, possui também a propriedade osteoindutora, demonstrando, portanto, ser um biomaterial promissor para atuar como substituto ósseo.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que o compósito baseado em HA- β TCP-Nb₂O₅ apresentou propriedade osteoindutora porque foi capaz de estimular ossificação intramembranosa na dura-máter e induzir a formação de blastemas ósseos e centros de ossificação primária no periosteio.

7. REFERÊNCIAS

- ALBREKTSSON, T., JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal**, v. 10, n. 2, S96-S101, 2001.
- AOKI, H. Science and medical applications of hydroxyapatite. **Japanese Association of Apatite Science**. 1991.
- BAB, I. A., SELA, J. J. Cellular and Molecular Aspects of Bone Repair. In: **Principles of Bone Regeneration**, capítulo 2, p. 11-41, 2012.
- BAUER, T., MUSCHLER, G. F. Bone Graft Materials. In: **Clinical Orthopedics and Related Research**, 371: 10-27, 2000.
- BELLOWS, C.G., CIACCIA, A., HEERSCHKE, J.N.M. Osteoprogenitor cells in cell populations derived from mouse and rat calvaria differ in their response to corticosterone, cortisol, and cortisone. **Bone**, v.23, n.2, p.119-125. 1998.
- BENKE, D., OLHA, A. E., MOLHER, H. Protein-chemical analysis of bio-oss bone substitute and evidence on its carbonated content. **Biomaterials**. 22:1005-12, 2001.
- BENTO, D. A. Análise de resistência mecânica em implantes de osso: um enfoque numérico e experimental. [Dissertação de Mestrado]. UFSC - 2003.
- BHUMIRATANA, S., GRAYSON, W. L., CASTANEDA, A., ROCKWOOD, D. N., GIL, E. S., KAPLAN, D. L., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Nucleation and Growth of Mineralized Bone Matrix on Silk-Hydroxyapatite Composite Scaffolds. **Biomaterials**, v. 32, p. 2812 -2820, 2011.
- BOULER, J. M.; DACULSI, G. In-vitro carbonated apatite precipitation on biphasic calcium phosphate pellets presenting various HA/-TCP ratios. **Key Engineering Materials**, p. 192–195, 119–122, 2001.
- BRUDER, S.P., JAISWAL, N., RICALTON, N.S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.355S, p.S247-S256,1998.
- CACCHIOLI, A., SPAGGIARI, B., RAVANETTI, F., MARTINI, F. M., BORGHETTI, P., GABBI, C. The Critical Sized Bone Defect: Morphological Study of Bone Healing. **Ann. Faculdade Medicina Veterinária. Di Parma**, v. 26, p. 97-110, 2006.
- CANALIS, E., MCCARTHY, T. L., CENTRELLA, M. Growth factors and the skeletal system. **Journal of Endocrinology Investigation**, 12, p. 577–584, 1989.
- CARVALHO, P. S. P., BASSI, A. P. F., VIOLIN, L. A. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. **Implant News**, v.1, n.3, p.255-259, 2004.

CHENU, C., COLUCCI, S., GRANO, M., ZIGRINO, P., BARATTOLO, R., ZAMBONIN, G., BALDINI, N., VERGNAUD, P., DELMAS, P. D., ZALLONE, A. Z. Osteocalcin Induces Chemotaxis, Secretion of Matrix Proteins, and Calcium-mediated Intracellular Signaling in Human Osteoclast-like Cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 127, n. 4, p. 1149-1158, 1994.

CHIAPASCO, M., ROMEO, E. Cirurgia pré-implante nas atrofas dos maxilares.in: **Reabilitação oral com prótese implanto suportada para casos complexos**. São Paulo: Ed Santos, 3:131-62, 2007.

CHIM, S. K., TICKNER, J., CHOW, S. T., KUEK, V., GUO, B., ZHANG, G., ROSEN, V., ERBER, W., XU., J. Angiogenic Factors In Bone Local Environment. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 24, n. 3, p. 297-310, 2013.

COSTANTINO, P. D.; FRIEDMAN, C. D. Soft tissue augmentation replacement in the head and neck: general considerations. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v.27, n.1, p.1–12, 1994.

CONZ, M. B., GRANJEIRO, J. M., SOARES, G. A. Hydroxyapatite crystallinity does not affect the repair of critical size bone defects. **Journal of Applied Oral Science: revista FOB**, v. 19, n.4, p. 337-342, 2011.

COOPER, G. M., MOONEY, M. P., GOSAIN, A. K., CAMPBELL, P. G., LOSEE, J. E., HUARD, J. Testing the “Critical-size” in Calvarial Bone Defects: Revisiting the Concept of Critical-sized Defect (CSD). **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 125, n. 6, p.1685-1692, 2010.

COWAN C. M., SHI, YY., AALAMI, O. O., CHOU, YF., MARI, C., THOMAS, R., QUARTO, N., CONTAG, C. H., WU, B., LONGAKER M. T. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. **Nature Biotechnology**, v.22, n.5, p.560-567, 2004.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials. **Journal of Materials Science**, v. 44, n.9, p. 2343-2387, 2009.

ELLIOT, J. C. Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. **Studies in Inorganic Chemistry**, 18, 389, 1994.

EPPELL, S. J., TONG, W., KATZ, J. L., KUHN, L., GLIMCHER, M. J. Shape and size of isolated bone mineralites measured using atomic force microscopy. **Journal of Orthopaedic**

FLECKENSTEIN, K. B. ; CUENUN, M. F.; PEACOCK, M. E.; BILLMAN, M. A.; SWIEC, G. D.; BUXTON, T.B. Effect of Hidroxyapatite Tricalcium Phosphate Alloplast on Osseous Repair in the Rat Calvarium. **Journal of Periodontology**, v. 7, n.1, p.39-45, 2006.

FROST, H. M. J. Why should many skeletal scientists and clinicians learn the Utah paradigm of skeletal physiology. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, v. 2, n. 2, p. 121 130, 2001.

GALOIS, L., MAINARD, D. Bone Ingrowth Into Two Porous Ceramics With Different Pore Sizes: Na Experimental Study. **Acta Orthopaedica Belgica**, v. 70, n. 6, p. 598-603, 2004.

- GOMES, P. S., FERNANDES, M. H. Rodent Models in Bone-Related Research: The Relevance of Calvarial Defects in the Assessment of Bone Regeneration Strategies. **Laboratory Animals**, v. 45, p.14-24, 2011.
- HAUSCHKA, P. V., CHEN, T. L., MAVRAKOS, A. E. Polypeptide growth factors in bone matrix. **Ciba Foundation Symposium**, 136, p. 207–225, 1988.
- HENCH, L. L.; WILSON J. An Introduction to Bioceramics. **Singapore: World Scientific**, p.25-40, 1993.
- HENG, B.C., CAO, T., LEE, E.H. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. **Stem Cells**, v.22, p.1152-1167, 2004.
- HERNÁNDEZ-GIL, I. F., et al. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Medicina Oral Patologia Oral Cirurgia Bucal**, 11E:47-51, 2006.
- ISAMA K., TSUCHIYA T. Enhancing effect of poly (L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. **Biomaterials**, v. 24, n.19, p. 3303 -3309, 2003.
- JILKA, R. L. Biology of the Basic Multicellular Unit and the Pathophysiology of Osteoporosis. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 41, n. 3, p.182-185, 2013.
- JUDAS, F., PALMA, P., FALACHO, R. I., FIGUEIREDO, H. Estrutura de Dinâmica do Tecido Ósseo. Texto de apoio para os alunos do Mestrado Integrado em Medicina Disciplina de Ortopedia, 2012.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Guanabara Koogan, 12^a Edição, 2013.
- KANCZLER, J. M., OREFFO, R. O. C. Osteogenesis and Angiogenesis: The Potential for Engineering Bone. **European Cells and Materials**, v. 15, p. 100-114, 2008.
- KATCHBURIAN, E., ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**, 2.ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2004.
- KAWACHI, E.Y.; BERTRAN C.A.; REIS R.R.; ALVES O.L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, 23:4: 518-522, 2000.
- KIYOCHI JÚNIOR, H. J. Estudo Ex Vivo da Cerâmica Bifásica Composta de Hidroxiapatita- Beta Fosfato Tricálcio (HA - β -TCP) e Pentóxido de Níbio (Nb₂O₅) como Biomaterial Empregado para o Reparo Ósseo em Defeitos de Calvária. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, PR, 2013.
- KNIGHT, M. N., HANKENSON, K. D. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. **Wound Healing Society**, v.2, n.6, p.306-316, 2012.

LACERDA, K.A. **Obtenção de matrizes bioabsorvíveis à base de hidroxiapatita para aplicação em braquiterapia.** Belo Horizonte: Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Comissão Nacional de Energia Nuclear. 2005, p. 95. (Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações. Minerais e Materiais).

LANSDOWNE, J. L. Preclinical Models for Bone Defects. **OTA 2010 Basic Science Focus Forum.**

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. **Advances in Dental Research**, v. 2, p. 164-180, 1988.

LEGEROS, R. Z. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, 395:81–98, 2002.

LEITE, G. S., SANDIM, H. R. Z., CINTHO, O. M. Sinterização do Nióbio: Efeito da Granulometria dos Pós. **Tecnologia Metal Materiais Mineração. São Paulo**, v. 8, n. 2, p. 132-137, 2011.

LIMA, C. J., CASTRO DA SILVA, I. I., BARROS, L. F. H., GRANJEIRO, J. M., SILVA, M. H. P. Resposta do Tecido Subcutâneo de Camundongos à Implantação de um Novo Biovidro à Base de Óxido de Nióbio. **Revista Matéria**, v. 16, n. 1, p. 574-582, 2011.

LINDHE, J., KARRING, T., LANG, N. P. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral.** 4. edição, São Paulo, Guanabara Koogan, 2005.

LIU, B., LUN, DX. Current Application of β -tricalcium Phosphate Composites In Orthopaedics. **Orthopaedic Surgery**, v. 4, p. 139-144, 2012.

LONG, M.; RACK, H. J. Titanium alloys in total joint replacement - a materials science perspective. **Biomaterials**, v.19, n. 18, p. 1621-39, 1998.

LYNCH, S. E., GENKO, R., MARX, R. Grafting materials in repair and restorations. Tissue engineering application in maxillofacial surgery and periodontics. **Quintessence**, 5:93-112. 1999.

MINGUELL, J.J., ERICES, A., GONGET, P. Mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, v.226, n.6, p.507-520, 2001.

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.

MISCH, C. E. Biomateriais utilizados em implantes dentários. In : Misch CE, editor. **Implantes dentários contemporâneos.** 2ª Ed. São Paulo: Ed. Santos;271-302, 2000.

MISCH, C. E., DIETSH, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dentistry**, 2:158-167, 1993.

MURUGAN, R., RAMAKRISHNA S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**, 65:2385-2406, 2005.

- NAKAMURA, A., DOHI, Y., AKAHANE, M., OHGUSHI, H., NAKAJIMA, H., FUNAOKA, H., TAKAKURA, Y. Osteocalcina Secretion as an Early Marker of *In Vitro* Osteogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells. **Tissue Engineering**, v. 15, n. 22, p. 169-180, 2009.
- NASCIMENTO, W.J.; BONADIO, T. G. M.; FREITAS, V. F.; WEINAND, W. R.; BAESSO, M. L.; LIMA, W. M. Nanostructured Nb₂O₅-natural hydroxyapatite formed by the mechanical alloying method: A bulk composite. **Materials Chemistry and Physics**, v. 130, p. 84-89, 2011.
- NEFUSSI, J.R., BRAMI, G., MODROWSKI, D. et al. Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. **J. Histochem. Cytochem**, v. 45, n. 4, p. 493-503, 1997.
- NOVAES JUNIOR, *et al.* Recursos e soluções em implantes. In **Periodontia/ Cirurgia/Cirurgia para implantes**. Artes médicas, 447-66, 2000.
- OCARINO, N.M., SERAKIDES, R. Efeito da atividade física no osso normal e na prevenção e tratamento da osteoporose. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.12, n.3, p.164-168, 2006.
- ONO, I.; TATESHITA, T.; NAKAJIMA, T. Evaluation of a high density polyethylene fixing system for hydroxyapatite ceramic implants. **Biomaterials**, v.21, p.143-151, 2000.
- ORÉFICE, R. L. Materiais poliméricos - ciência e aplicações como biomateriais. In: ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. (Eds). **Biomateriais fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
- PARK, J., LAKES, R. S. **Biomaterials: An Introduction**. 3 th Edition. 2007.
- PAYUSHINA, O.V., DOMARATSKAYA, E.I., STAROSTIN, V.I. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. **Cell Biology**, v.33, n.1, p.2-18, 2006.
- PITTENGER, M.F., MACKAY, A.M., BECK, S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, p.143-144, 1999.
- PRETEL, H. Ação de Biomateriais e Laser de Baixa Intensidade na Reparação Tecidual Óssea. Estudo Histológico em Ratos. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia. 2005.
- PRETTO, J. L. B., PAGNONCELLI, R. M. Avaliação por meio de MEV da Região Periimplantar após Irradiação com Laser Diodo, Infravermelho ($\lambda = 830\text{nm}$), em implantes de Titânio Situados em Tíbia de Rato. **Revista de Odontologia da ATO**, v. 5, n. 1, p. 130-180, 2005.
- RAMÍREZ, G.; RODIL, S. E.; ARZATE, H.; MUHL, S.; OLAYA, L. L. Niobium based coatings for dental implants Applied Surface. **Science**, v. 257, p. 2555-559, 2011.

ROBEY, P. G., YOUNG, M. F., FISHER, L. W., MCCLAIN, T. D. Thrombospondin is an osteoblast derived component of mineralized extracellular matrix. **The Journal of Cell Biology**, v. 108, n. 2, p.719-727, 1989.

ROBEY, P.G. The biochemistry of bone. **Biological Metabolism Clinical North American**,

ROBLING, A. G., CASTILLO, A. B., TURNER, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. **Annual Review of Biomedical Engineering**, 13, S3-S6, 2006.

ROBLING, A. G., CASTILLO, A. B., TURNER, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. **Annual Review of Biomedical Engineering**, 13, S3-S6, 2006.

ROSE, F. R., CYSTER, L. A., GRANT, D. M., SCOTCHFORD, C. A., HOWDLE, S. M., SHAKESHEFF, K. M. **Biomaterials**, 25:5507-5514, 2004.

SARAIVA, G. L., LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação óssea na Prática Clínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n.1, p. 72-78, 2002.

SCHMITZ J., HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical orthopaedics and related research**, 205:299- 08, 1986.

SILVA, C. S. Nióbio. **Balanco Mineral Brasileiro**, 2001.

SILVA, L. G. O. Nióbio: Mercado Nacional e Internacional. [Dissertação de Mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 1994.

SOMERMAN, M. J., ARCHER, S. Y., IMM, G. R., FOSTER, R. A. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. **Journal of Dental Research**. 1988, v. 67, n. 1, p. 66-70.

SOMMERFELDT, D. W., RUBIN, C. T. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. **Europe spine journal: official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society**, v.10, p. 86–95, 2001.

sources, phenotype, and differentiation potential. **Cell Biology and Toxicology**, v.33,n.1, p.2-18, 2006.

SZPALSKI, C., BARR, J., WETTERAU, M., SAADEH. P. B., WARREN, S. M. Cranial Bone Defects: Current and Future Strategies. **Neurosurgical Focus**, v. 29, n. 6, p. 1- 11, 2010.

TAMAI, M.; NAKAOKA, R.; ISAMA, K.; TSUCHIYA, T. Novel calcium phosphate ceramics: the remarkable promoting action on the differentiation of normal human osteoblasts. **Key Engineering Materials**, n. 309, p. 97-100, 2006.

TEIXEIRA, L. J. C. Potencial Osteocondutor de Grânulos de Hidroxiapatita em Defeitos Críticos na Calvária de Ratos. [Tese de Doutorado]. Duque de Caxias: Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. 2009.

THOMPSON, Z., MICLAU, T., HU, D., HELMS, J. A. A Model for Intramembranous Ossification During Fracture Healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 20, p.1091-1098, 2002.

TITORENCU, I., PRUNA, V., JINGA, V. V., SIMIONESCU, M. Osteoblast Ontogeny and Implications for Bone Pathology: na Overview. **Cell Tissue Research**, v. 355, n. 1, p. 23-33, 2014.

URIST MR. Bone: Formation by Autoinduction. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, 395: 4-10, 2002.

URIST, M. R. New advances in bone research. **The Western Journal of Medicine**, 14:71, 1984.

VERBICARO, T., GIOVANINI, A. F., ZIELAK, J. C., BARATTO FILHO, F., ARAÚJO, M. R., DELIBERADOR T. M. Osteocalcin Immunohistochemical Expression During Repair of Critical-Sized Bone Defects Treated with Subcutaneous Adipose Tissue in Rat and Rabbit Animal Model. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 6, p.559-564, 2013.

VIEIRA, J. G. H. Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos de Metabolismo ósseo e sua Utilidade Prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.43, n.6, p.415-422, 1999.

WILLIAMS, D. F. Definition in biomaterials. Amsterdam Elsevier. **Progress in biomedical engineering**, Capítulo 4. 1987.

YAMAMOTO, A; HONMA, R.; SUMITA, M.; HANAWA, T. Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes. **Journal Biomedical Materials Research**, v. 1, p. 68, n.2, p. 244-56, 2004.

YU, Y., BAHNEY, C., HU, D., MARCUCLO, R. S., MICLAU, T. Creating Rigidly Stabilized Fractures for Assessing Intramembranous Ossification, Distraction Osteogenesis, or Healing of Critical Sized Defects. **Journal of Visualized Experiments**, v. 62, p. 1-6, 2012.

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

YUEN, C. Y., WONG, S. L., LAU, C. W., TSANG, S. Y., XU, A., ZHU, Z., NG, C. F., YAO, X., KONG, S. K., LEE, H. K., HUANG, Y. From Skeleton to Cytoskeleton: Osteocalcin Transforms Vascular Fibroblasts to Myofibroblasts Via Angiotensin II and Toll-Like Receptor 4. **Circulation Research**, v. 111, n. 3, p. 55-66, 2012.

ZAMBUZZI, W. F., PAIVA, K. B. S., MENEZES, R., OLIVEIRA, R. C., TAGA, R., GRANJEIRO, J. M. MMP-9 and CD68⁺ Cells Are Required for Tissue Remodeling In Response To Natural Hydroxyapatite. **Journal of Molecular Histology**, v. 40, n. 4, p. 301-309, 2009