

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**LUCAS PEREIRA LOPES DE SOUZA**

**"Bioatividade de vidros contendo nióbio: estudo  
experimental *in vivo*"**

**Campinas, 2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUCAS PEREIRA LOPES DE SOUZA

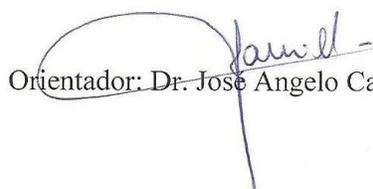
"BIOATIVIDADE DE VIDROS CONTENDO NIÓBIO:  
ESTUDO EXPERIMENTAL *IN VIVO*"

Este exemplar corresponde à redação final  
da Dissertação defendida pelo candidato

Lucas Pereira Lopes de Souza

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Estrutural do Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do Título de  
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,  
na área de Anatomia.

  
Orientador: Dr. José Angelo Camilli

Campinas, 2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

So89b Souza, Lucas Pereira Lopes de, 1989-  
Bioatividade de vidros contendo nióbio : estudo experimental *in vivo* / Lucas  
Pereira Lopes de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: José Angelo Camilli.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de  
Biologia.

1. Bioatividade. 2. Biovidro. 3. Óxido de nióbio. 4. Estudos *in vivo*. I. Camilli,  
José Angelo, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Bioactivity of glasses composed by niobium : an experimental *in vivo*  
study

**Palavras-chave em inglês:**

Bioactivity

Bioglass

Niobium oxide

*In vivo* studies

**Área de concentração:** Anatomia

**Títuloção:** Mestre em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

José Angelo Camilli [Orientador]

Rodrigo Cappato de Araújo

Evelise Aline Soares

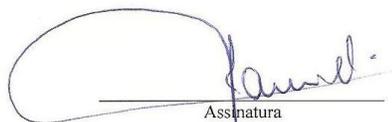
**Data de defesa:** 31-07-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 31 de julho de 2014

BANCA EXAMINADORA

Dr. José Angelo Camilli (Orientador)



Assinatura

Dr. Rodrigo Cappato de Araújo



Assinatura

Dra. Evelise Aline Soares



Assinatura

Dr. Patrick Vianna Castro

Assinatura

Dr. Celso Aparecido Bertran

Assinatura



## RESUMO

### *“Bioatividade de vidros compostos por nióbio: estudo experimental in vivo”*

Alguns estudos mostram que a introdução do óxido de nióbio ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ) na composição do Bioglass® poderia ser uma solução para melhorar sua resistência mecânica, mantendo sua biocompatibilidade e bioatividade, porém, apesar da melhora na resistência mecânica causada pela adição deste óxido ser bem documentada na literatura, suas propriedades bioativas ainda são pouco conhecidas. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar experimentalmente as propriedades bioativas do óxido de nióbio em ratos albinos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar. Para isso, bastões vítreos compostos por diferentes concentrações do  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  foram implantados na tíbia de ratos. Além disso, cada vidro teste, na forma de pó, foi implantado no músculo de ratos para análise de suas propriedades pró-angiogênicas, usando o Bioglass 45S5 (Bioglass®) como controle. As eutanásias foram realizadas 14 e 28 dias pós-cirurgias. Lâminas histológicas de cortes transversais das tíbias foram coradas a H&E para mensuração da área de osso subperiosteal existente na cortical adjacente ao implante e a quantidade de osso esponjoso formado ao redor do bastão vítreo nos grupos de 14 dias, bem como da espessura da lâmina óssea formada ao redor do bastão nos grupos de 28 dias. Foi ainda realizada marcação imuno-histoquímica e a razão entre a área total do implante em  $\text{mm}^2$  e o número total de vasos sanguíneos contados manualmente num aumento de 400x para verificação a capacidade do material de estimular a angiogênese. A avaliação histológica revelou a ausência total de inflamação tanto após 14 quanto após 28 dias de implante. Os resultados das comparações entre as áreas de osso subperiosteal dos grupos após 14 e 28 dias (feitas através de um teste ANOVA com *post hoc* tukey) e da quantidade de osso esponjoso formado ao redor do implante nos grupos 14 dias (feitas através do teste Kruskal-Wallis com Mann-Whitney como *post hoc*) mostraram que o BGNP1.3 apresentou maior capacidade de induzir a formação óssea do que o grupo controle, já com relação ao número de vasos sanguíneos e espessura da lâmina óssea formada ao redor do implante todos os grupos apresentaram resultado semelhantes. Assim, se concluiu que o BGNP1.3 trata-se de um material inovador por ser biocompatível, apresentar propriedade osteoindutiva superior e capacidade pró-angiogênica semelhante ao Bioglass®.

**Palavras-chave** - Bioatividade; Biovidro; Óxido de Nióbio, in vivo.



## ABSTRACT

### *“Bioactivity of glasses composed by niobium: an experimental in vivo study”*

Some studies show that the introduction of niobium oxide (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) into Bioglass® composition could be a solution to improve its mechanical strength while maintaining its biocompatibility and bioactivity, but in spite of improvement in resistance caused by addition of the oxide is well documented in the literature, their bioactive properties are still poorly known. In this context, the aim of this study was to experimentally evaluate the bioactive properties of niobium oxide in albino rats (*Rattus norvegicus*). For this, glassy rods composed of different concentrations of Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> were implanted in the rats' tibia. In addition, each test glass in powder form was implanted into the muscle of mouse for analysis of their pro-angiogenic properties using 45S5 Bioglass (Bioglass®) as control. Euthanasia were performed 14 and 28 days post-surgery. Histological slides of cross sections of tibiae were HE stained for measuring the area of existing subperiosteal bone in adjacent to the implant and the amount of cancellous bone formed around the vitreous rod after 14 days pos-surgery as well as the thickness of the formed bone sheet around the rod in groups of 28 days. It was also performed immunohistochemical staining to calculate the ratio between the total area in mm<sup>2</sup> of the implant and the total number of blood vessels, counted manually using a magnification of 400x, to check the capacity of the material to stimulate angiogenesis. Histological evaluation revealed the complete absence of inflammation after both 14 and after 28 days of implantation. The results of the comparisons between the areas of subperiosteal bone of groups after 14 and 28 days (made by an ANOVA with Tukey post hoc test) and the amount of cancellous bone formation around the implant in the groups 14 days (done by Kruskal -Wallis with Mann-Whitney post hoc) revealed that BGNP1.3 showed greater ability to induce bone formation than the control group, when compared the number of blood vessels and the thickness of the blade bone formed around the implant all groups showed similar results. Thus, we concluded that BGNP1.3 is an innovative material to be biocompatible and display better osteoinductive property than Bioglass® showing similar pro-angiogenic capacity.

*Key-Words – Biactivity; Bioglass; Niobium Oxide, in vivo.*



# Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.0 INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2.0 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>  | <b>4</b>  |
| 2.1 HISTOLOGIA ÓSSEA .....  | 4         |
| 2.2 OSTEOGÊNESE .....   | 6         |
| 2.3 FATORES DE CRESCIMENTO RELACIONADOS AS CÉLULAS ÓSSEAS ...   | 7         |
| 2.3.1 Fator de crescimento tipo insulínico (IGF): .....   | 8         |
| 2.3.2 Fator de crescimento transformante-beta (TGF- $\beta$ ) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs): ..... | 8         |
| 2.3.3 Fator de crescimento fibroblástico (FGF): .....   | 10        |
| 2.3.4 Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF): .....  | 10        |
| 2.5 BIOMATERIAIS E VIDROS BIOATIVOS: .....  | 11        |
| <b>3.0 OBJETIVOS .....</b>  | <b>19</b> |
| 3.1 OBJETIVO GERAL .....  | 19        |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 19        |
| <b>4.0 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>  | <b>20</b> |
| 4.1 PREPARO DOS VIDROS BIOATIVOS .....  | 20        |
| 4.2 ANIMAIS .....   | 22        |
| 4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....  | 23        |
| 4.3.1 Implante intramuscular .....  | 23        |
| 4.3.2 Defeito ósseo e preenchimento com haste de vidro .....  | 24        |
| 4.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS .....   | 25        |
| 4.5 RETIRADA E PREPARO DAS AMOSTRAS .....   | 25        |
| 4.5.1 Retirada e fixação do fragmento muscular .....  | 25        |
| 4.5.2 Retirada e fixação da tíbia contendo haste de vidro .....   | 25        |
| 4.6 MICROSCOPIA DE LUZ .....  | 26        |
| 4.7 IMUNOHISTOQUÍMICA .....   | 26        |
| 4.8 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS .....  | 27        |
| 4.8.1 Área de osso subperiosteal no defeito ósseo .....   | 27        |
| 4.8.2 Osso esponjoso neoformado nas tíbias 14 dias .....  | 28        |
| 4.8.3 Espessura da lâmina óssea ao redor do implante nos animais 28 dias .....                                | 28        |
| 4.8.4 Número de vasos sanguíneos .....  | 29        |
| 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 30        |
| <b>5.0 RESULTADOS .....</b>   | <b>30</b> |

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| 5.1 ANÁLISE DAS TÍBIAS .....         | 30        |
| 5.1.1 Análise histológica .....      | 30        |
| 5.1.2 Morfometria .....              | 33        |
| 5.2 NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS ..... | 35        |
| <b>6.0 DISCUSSÃO .....</b>           | <b>37</b> |
| 6.1 BIOCOMPATIBILIDADE .....         | 37        |
| 6.2 BIOATIVIDADE .....               | 38        |
| 6.3 ANGIOGÊNESE.....                 | 41        |
| <b>7.0 CONCLUSÃO .....</b>           | <b>43</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>              | <b>44</b> |
| <b>ANEXO .....</b>                   | <b>48</b> |

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a toda minha família, principalmente aos meus pais, por todo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis.



**“Na natureza não existem recompensas nem castigos – apenas consequências”**

**Robert Green Ingersoll**



## **AGRADECIMENTOS**

A Juliana Maranhão por ter me indicado ao professor Angelo e ter apoiado minha vinda para Campinas.

Ao professor José Angelo Camilli pela oportunidade de realizar esse projeto e por todo apoio que me deu.

Ao professor Bertran e ao doutorando João Henrique por disponibilizarem os biomateriais utilizados nessa pesquisa.

A minha colega de laboratório Ana Claudia de Souza por me auxiliar e me aturar em todas as etapas do mestrado.

Ao Prof. Dr. Wagner Fávaro por permitir a utilização de seu laboratório para realização de algumas técnicas utilizadas nessa pesquisa e também por me auxiliar com as análises morfológicas.

A Profa. Dra. Valéria Quitete por disponibilizar seu laboratório para a realização de parte das técnicas utilizadas nesse trabalho.

A minha família por me dar apoio tanto financeiro quanto moral para que eu não desistisse ou baixasse a cabeça nos momentos difíceis que passei durante a pesquisa e também por serem compreensivos com minha ausência em momentos importantes.

Aos meus amigos que apesar da distância estão sempre comigo, de um jeito ou de outro, especialmente Fernanda Samira que atura minhas longas ligações as vezes.

A Ana Maria Loureiro pelo companheirismo, compreensão e apoio que me deu durante esse ano.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

À CAPES/DS pela bolsa de mestrado e ao auxílio financeiro FAPESP.

À Líliam pela competência e cuidados com as documentações exigidas.



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Divisão dos animais nos diferentes grupos.....  | 23 |
| <b>Figura 2:</b> Cirurgia de implante intramuscular .....  | 24 |
| <b>Figura 3:</b> Defeito no terço proximal da face anteromedial da tíbia esquerda.....   | 25 |
| <b>Figura 4:</b> Fotomicrografias demonstrando o método de mensuração da área de osso subperiostal (Coloração: hematoxilina e eosina). A: Aumento 20X; B: Aumento de 40X; C: Aumento de 200X; D: Aumento de 400X.....                                | 27 |
| <b>Figura 5:</b> Fotomicrografias demonstrando o método de mensuração do osso esponjoso (Coloração: hematoxilina e eosina). A: Aumento de 100x; B: Aumento de 400x.....  | 28 |
| <b>Figura 6:</b> Fotomicrografias demonstrando o método de análise da espessura da lâmina formada ao redor do implante (Coloração: hematoxilina e eosina). A: Aumento de 20X. B: Aumento de 400X.....  | 29 |
| <b>Figura 7:</b> Fotomicrografia da técnica utilizada para contagem dos vasos (Marcação Imunohistóquímica anti-VEGF). A: Área total do implante (aumento de 40X); B: Contagem dos vasos (aumento de 400x). .....                                     | 29 |
| <b>Figura 8:</b> Fotomicrografias de cortes transversais da tíbia. Presença do calo ósseo na cortical adjacente ao implante de BG45S5 (A), BGSN1 (B), BGPN2.6 (C), BGPN1.3 (D) após 14 dias (Coloração: hematoxilina e eosina) . Aumento de 40X..... | 31 |
| <b>Figura 9:</b> Fotomicrografias de cortes transversais das tíbias 28 dias após implante do BG45S5 (A), BGPN1.3 (B), BGPN2.6 (C), BGSN1 (D) (Coloração: hematoxilina e eosina). Aumento de 40X (A,B,C) e 100X (D).....                              | 32 |
| <b>Figura 10:</b> Fotomicrografia de um corte transversal da tíbia demonstrando a lâmina óssea formada em todos os grupos após 28 dias de implante (Seta (Coloração: hematoxilina e eosina). Aumento de 40X.....                                     | 32 |
| <b>Figura 11:</b> Área média de osso subperiostal mensurada em cada grupo.....   | 33 |
| <b>Figura 12:</b> Espessuras médias das lâminas ósseas formadas ao redor do implante após 28 dias. ....  | 34 |

**Figura 13:** Quantidade de osso esponjoso formado ao redor do implante após 14 dias..... 35

**Figura 14:** Fotomicrografias de cortes transversos dos fragmentos musculares contendo o biomaterial na forma de pó (marcação imunohistoquímica anti- VEGF). Vasos sanguíneos podem ser observados na cápsula fibrosa que separava o implante (BGPN1.3) do tecido muscular (Círculos vermelhos). Áreas acastanhadas são as que contém VEGF imunomarcado (Aumento de 100X). ..... 36

**Figura 15:** Densidade de vasos sanguíneos nas áreas do implante intramuscular após 14 e 28 dias. .... 36

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> - Nomenclatura e composição química dos diferentes materiais vítreos preparados neste estudo .....             | 20 |
| <b>Tabela 2</b> - Características de todos os reagentes precursores dos materiais vítreos preparados .....                     | 21 |
| <b>Tabela 3</b> - Programa térmico utilizado na descarbonatação dos reagentes $\text{CaCO}_3$ e $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ..... | 21 |



## LISTA DE ABREVIATURAS

- Cbfa1**- Família do fator de ligação centro
- RER**- Retículo endoplasmático rugoso
- RANK**- Receptor para ativação do fator nuclear Kappa  $\beta$
- RANKL**- Ligante para RANK
- PTH**- Hormônio da paratireóide (Paratormônio)
- M-CSF**- Fator estimulante de formação de colônia de macrófagos
- FGF**- Fator de crescimento de fibroblastos
- FGFR**- Receptor de FGF
- TGF- $\beta$** - Fator de crescimento transformante beta
- VEGF**- Fator de crescimento de endotélio vascular
- VEGFR**- Receptor para VEGF
- Ihh**- Indian Hedghog
- IGF**- Fator crescimento tipo insulínico
- IGFR**- Receptor de IFG
- IGFBP**- Proteína ligante de IFG
- PDGF**- Fator de crescimento derivado de plaquetas
- EGF**- Fator de crescimento epidérmico
- GH**- Hormônio do crescimento
- BMP**- Proteína morfogenética óssea
- BMPR**- Receptor de BMP
- LAP**- Peptídeo associado a latência
- DMO**- Densidade mineral óssea
- HAC**- Hidroxiapatita carbonatada
- FCA**- fosfato de cálcio amorfa
- FCS**- Fluido corpóreo simulado
- HMWK**- Fator Hageman

**MAPK**- Proteína cinase ativada por mitógeno

**ERK**- Cinase regulada por sinal extracelular

## 1.0 INTRODUÇÃO

Durante o último século a expectativa de vida da população cresceu substancialmente, devido às campanhas de imunização, a purificação da água, dentre outros fatores, fazendo com que, por exemplo, no ano 2000 mais de 50% da população alcançasse 50 anos de idade enquanto que em 1900 essa taxa era menor que 10%, o que representa um aumento de mais de 500% na expectativa de vida, ademais, estima-se que no ano de 2020 a expectativa de vida média seja de 90 anos<sup>26</sup>.

Atrelada ao envelhecimento está, na maioria dos casos, uma redução progressiva na qualidade de vida, causada por uma queda sistêmica na qualidade dos tecidos conectivos. A densidade e força óssea, por exemplo, apresenta-se reduzida em cerca de 50% após os 40 anos, quando comparada a um indivíduo jovem sem osteopenia, principalmente em mulheres, aumentando assim a chance de colapsos de vértebras, fraturas de ossos longos e quadris, o que num indivíduo idoso representa um evento consideravelmente crítico que pode conduzir ao óbito<sup>26</sup>. Somado a esse fato está o progressivo aumento na quantidade de acidentes automotivos que leva a um crescente aumento na incidência de fraturas oriundas de traumas de grande impacto<sup>3-5</sup>, e que por vezes provocam considerável perda óssea. Quando essa perda óssea é demasiada cria-se um defeito crítico, que é uma falha no osso a qual, devido a distancia entre as extremidades fraturadas, o organismo não consegue reparar sem que haja uma intervenção, como o uso de enxertos autólogos ou homólogos<sup>22</sup>.

Defeitos ósseos dessa magnitude podem também advir de infecções, conhecidas como osteomielites muito comuns após fraturas expostas do fêmur e ossos da perna<sup>34</sup>. Além disso, carcinomas ósseos podem comprometer grandes áreas e a retirada dessas áreas comprometidas implica na criação de grandes cavidades nos ossos que são consideradas defeitos críticos e necessitam de enxertos para serem preenchidos. O problema com os enxertos autólogos e homólogos é que existe limitação na fonte de osso do doador e, no caso dos enxertos homólogos, há também o risco de transmissão de doenças<sup>2</sup>.

Considerando essa problemática, abordagens alternativas para o preenchimento de defeitos críticos e que resultassem na melhoria da qualidade de vida dos indivíduos se tornaram cada vez mais necessárias, o que conduziu ao desenvolvimento dos

biomateriais<sup>18,2</sup>. A princípio, se buscou materiais que pudessem estar em contato com os tecidos vivos sem desencadear uma resposta inflamatória significativa, ou seja, que fossem bioinertes<sup>18,21</sup>.

Como esses materiais, no geral, tinham uma vida útil por volta de 10 a 15 anos se observou crescente frequência com a qual eles se deterioravam antes da morte do paciente<sup>18</sup>. A degradação dos materiais bioinertes é causada, em parte, pela natureza morfológica da fixação desses materiais nos ossos<sup>20,21</sup>. Assim, micromovimentos, degradação da superfície do material ou da superfície do osso adjacente ao implante acabam comprometendo a fixação mecânica. A ligação material-osso torna-se oscilante e progressivamente perde qualidade até que se tornam não funcionais e necessitam ser substituídas através de novo procedimento cirúrgico<sup>18</sup>, causando mais transtornos ao paciente além de os sujeitarem aos riscos atrelados a cirurgias.

No início da década de 70 o pesquisador, Larry L. Hench e seus colaboradores, desenvolveram um biomaterial que não só incitava quase nenhuma reação inflamatória pelo organismo como também criava pontes com os tecidos vivos, o Bioglass 45S5 (Bioglass®)<sup>54</sup>. Esse material é um vidro bioativo pertencente ao sistema  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$  (45%wt  $\text{SiO}_2$ , 24,5%wt  $\text{CaO}$ , 24,5%  $\text{Na}_2\text{O}$  e 6%wt  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) que possui a capacidade de se ligar firmemente ao osso e tecidos moles adjacentes<sup>18,21,25,43</sup>. A ligação do vidro bioativo com o tecido ósseo foi bem descrita por Hench em onze reações, sendo as cinco primeiras inorgânicas que culminam com a formação de uma camada cristalizada de hidroxiapatita carbonatada e as demais reações são de natureza biológica, decorrentes da resposta do organismo à presença da camada cristalizada. Essas reações inorgânicas e biológicas juntas criam uma forte ligação entre o material e o osso<sup>18</sup>.

Apesar da excelência na bioatividade a exploração comercial do BG45S5 se restringiu a odontologia e algumas aplicações em ortopedia, principalmente em substituição de ossículos da orelha média, reconstruções faciais e como constituinte de cremes dentais. O principal fator que restringiu o uso do Bioglass® é o seu baixo desempenho mecânico, não permitindo que o mesmo seja utilizado em ossos sob constante carga<sup>25</sup>. Assim,

melhorar as propriedades mecânicas do vidro mantendo a bioatividade parecia a solução para a expansão das vendas de vidros bioativos para uso em traumatologia-ortopedia.

Em vista disso, diversos métodos que associassem a bioatividade desses vidros com a resistência mecânica foram propostos, como revestir próteses metálicas (de titânio, por exemplo) com o biovidro, mas parece que o coeficiente de expansão térmica deste não se equipara ao do titânio o que inviabilizou sua aprovação para uso clínico<sup>25</sup>. Na tentativa de se melhorar as propriedades mecânicas dos vidros bioativos várias composições contendo este misturado a outros materiais vem sendo testadas. Uma solução interessante é a adição do Nióbio na forma de óxido a rede vítrea<sup>50</sup>.

Como componentes de ligas metálicas, sabe-se que a presença do nióbio promove melhora significativa na resistência à corrosão e a fadiga mecânica, além disso, a sua biocompatibilidade vem sendo demonstrada<sup>7,17,39,41</sup>. A presença do óxido de nióbio na constituição dos vidros parece acelerar as reações inorgânicas que culminam com a formação da camada de hidroxiapatita carbonatada em sua superfície, que é um evento crucial para ligação osso/implante<sup>36</sup>.

O aumento do desempenho mecânico e da resistência a corrosão de materiais contendo nióbio é bem descrita na literatura, indicando que a introdução do nióbio na composição de biomateriais pode ser uma alternativa para a confecção de implantes a serem utilizados em ossos sobre constante carga. No entanto, a bioatividade de vidros contendo nióbio, bem como sua biocompatibilidade não é muito bem documentada. O entendimento desses fatores é essencial para que se possa atestar a qualidade e segurança do biomaterial. Ademais, o Brasil atualmente detém 98% das reservas exploráveis de nióbio do mundo, logo, aplicações que agreguem valor a esse material irão contribuir positivamente para riqueza do país<sup>47</sup>.

## 2.0 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 HISTOLOGIA ÓSSEA:

O tecido ósseo é um tipo especial de tecido conjuntivo constituído por células e uma matriz extracelular calcificada que apresenta importantes funções no organismo. A matriz extracelular óssea é constituída por uma fase mineral (65%) e uma fase orgânica (35%). Os componentes orgânicos da matriz incluem as fibras de colágeno tipo I (90%), glicoproteínas e proteoglicanos. Água e outras diversas moléculas estão também presentes na matriz<sup>28</sup>. A rigidez conferida aos ossos advém dos componentes da fase mineral da matriz extracelular óssea, principalmente o fosfato de cálcio  $\text{Ca}^3(\text{PO}_4)_2$  que forma cristais semelhantes aos cristais do mineral geológico hidroxiapatita<sup>28</sup>.

As células ósseas são oriundas de duas linhagens diferentes: (a) a linhagem osteoblástica (que inclui células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos) que provém das células mesenquimais (células constituintes do mesênquima, o tecido conjuntivo embrionário) e que alcança seu estágio mais maduro como osteócito e (b) a linhagem monócito-macrófago-osteoclasto, na qual monócitos da corrente sanguínea se diferenciam em macrófagos ao alcançar o tecido e por influencia dos osteoblastos se tornam osteoclastos<sup>28,51</sup>.

As células osteoprogenitoras são células-fonte, que podem se proliferar e diferenciar, e tem origem nas células mesenquimais pluripotentes, que são células que podem se diferenciar tanto em células osteogênicas como em células musculares, adipócitos, fibroblastos e condroblastos. A opção pela progênie osteoblástica é controlada principalmente pelo gene o Cbfa1 (família do fator de ligação-centro) e regulada pela leptina (um peptídeo sintetizado pelos adipócitos) por um mecanismo central que envolve o hipotálamo, o que é comprovado em pacientes de com lipodistrofia (ausência de adipócitos na gordura branca) que exibem uma calcificação excessiva do osso (osteoesclerose) e uma formação óssea acelerada<sup>42,51</sup>.

Essas células osteoprogenitoras se diferenciam em células cubóides, altamente polarizadas, que se dispõem em uma monocamada que recobre todos as trabéculas ósseas

chamadas de osteoblastos. Essas são células secretoras típicas que apresentam retículo endoplasmático rugoso RER bastante desenvolvido, aparelho de golgi e um nucléolo volumoso. A diferenciação das células osteoprogenitoras em células osteoblásticas é mediada por moléculas sinalizadoras e necessita da proximidade de um vaso sanguíneo para ocorrer (caso a célula osteogênica esteja distante de uma fonte sanguínea, ela se diferencia em condroblasto)<sup>42,51</sup>.

A principal função dos osteoblastos é a de produção de componentes da matriz extracelular, principalmente o colágeno I, porém, o papel dessas células na formação, manutenção, remodelamento e reparo ósseo é complexo e envolve a produção de alguns fatores de crescimento que agem sobre células vizinhas, sobre elas mesmo e de maneira endócrina além da participação no mecanismo de reabsorção óssea, que é protagonizado pelos osteoclastos. Quando a matriz extracelular se mineraliza, aprisiona o osteoblasto numa lacuna e ele passa para um estágio menos ativo sendo chamado de osteócito, que tem função de manutenção da matriz óssea<sup>28</sup>.

A mineralização da matriz óssea é o último passo da formação de uma lamela óssea. No entanto, os ossos estão sob constante remodelamento, no qual atuam concomitantemente os osteoblastos produzindo osso e os osteoclastos, o reabsorvendo. O osteoclasto é o último membro da linhagem monócito-macrófago-osteoclasto, sendo células grandes, multinucleadas, que se encontram aderidas ao osso em lacunas denominadas lacunas de Howship, sua função principal é a de reabsorção óssea, que envolve, a dissolução dos componentes inorgânicos da matriz (desmineralização óssea) mediada pela  $H^+$  - ATPase no ambiente ácido e a degradação enzimática dos componentes orgânicos pela catepsina K<sup>28,42,51</sup>.

A diferenciação dos osteoclastos é regulada pelos osteoblastos, que liberam o ligante do receptor do fator estimulante de colônia de macrófago (M-CSF) que se liga ao seu receptor na superfície de macrófagos (derivados dos monócitos) e induz a expressão do RANK (receptor para ativação do fator nuclear Kappa B) também na superfície dos macrófagos, mas, a liberação da osteoprotegerina pelos osteoblastos impede a diferenciação dos macrófagos em osteoclastos uma vez que ela se liga ao ligante RANKL (produzido pelos osteoblastos) impedindo que esse se acople ao receptor RANK dos macrófagos. O

paratormônio (PTH) estimula o osteoblasto a sintetizar M-CSF e RANKL e bloqueia a síntese da osteoprotegina, favorecendo assim a ligação do RANKL com o receptor RANK e posterior diferenciação dos macrófagos em osteoclastos<sup>44</sup>.

## 2.2 OSTEOGÊNESE

Os ossos sempre se desenvolvem a partir de um modelo conjuntivo prévio, esse modelo pode ser um tecido conjuntivo mesenquimal ou cartilágneo. Quando a ossificação provém de um molde conjuntivo mesenquimal ela é dita intramembranosa e ocorre nos ossos do crânio como parietais, frontal, parte do occipital, temporal, mandíbula e maxilas. Quando um molde cartilágneo precede a formação óssea essa é chamada de endocondral e ocorre principalmente nos ossos longos como úmero, tíbia, fêmur etc<sup>42,44,51</sup>.

A ossificação intramembranosa se inicia com a agregação de célula mesenquimais que é controlada por polipeptídeos do Wnt, hedgehog, FGF e pelas famílias do TGF-B. Uma vez agregadas essas células se diferenciam em osteoblastos, formando o blastema ósseo. No interior do blastema os osteoblastos se diferenciam em osteócitos que ficam conectados entre si por seus prolongamentos citoplasmáticos e envolvidos por uma camada periférica de osteoblastos, esses osteoblastos secretam dentro do blastema os componentes da matriz óssea, que através da chegada do cálcio pelos vasos sanguíneos será mineralizada. Os osteócitos aprisionados se comunicam pelos canálculos formados ao redor dos seus prolongamentos citoplasmáticos interconectados<sup>28,42,44,51</sup>.

Durante a ossificação intramembranosa, vários focos de ossificação se formam concomitantemente na membrana mesenquimal primitiva, contudo, com o subsequente remodelamento esses focos se encontram e uma compacta camada de osso se forma. Essa camada compacta, nos osso planos como os do crânio, ocorre na superfície externa (relacionada com o perióstio) e na superfície interna (relacionada com o endóstio) entre as duas camadas existem trabéculas ósseas desorientadas, organizadas de forma não compacta, contendo em seus espaços um tecido contendo células precursoras das células sanguíneas conhecido como medula óssea, o conjunto das duas camadas de osso compacto e o osso trabecular que as interpõem é denominado díplo<sup>42</sup>.

A ossificação endocondral ocorre principalmente na formação das vértebras, sacro e ossos dos membros e se caracteriza pela ossificação de um molde cartilágneo prévio com formato que lembra o osso adulto. Um centro de ossificação primário se forma quando os condrócitos presentes no centro do modelo de cartilagem maturam, hipertrofiam e passam a liberar fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) que estimula o brotamento de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes no perióstio (que se substituiu o pericôndrio prévio ao mesmo tempo que o centro de ossificação primário se formava). Esse vaso sanguíneo que invade o molde é chamado de brotoperióstio e conduz células osteoprogenitoras que iram dar início a ossificação do centro primário<sup>28,51</sup>.

Com a formação do centro de ossificação primário o osso começa a substituir a cartilagem de forma excêntrica e, numa fase mais tardia do desenvolvimento, que varia de osso para osso, centros de ossificação secundários se formam nas extremidades do modelo por um mecanismo semelhante ao do centro primário. Entre os centros primário e secundário permanece até por volta dos 20 anos de idade uma cartilagem hialina conhecida como disco epifisário, cujos condrócitos não hipertrofiam e proliferam devido a ação do indian hedgehog (Ihh), dessa forma o disco epifisário participa do crescimento longitudinal dos ossos longos durante a infância e puberdade e na idade adulta permanece apenas como uma linha epifisária<sup>28</sup>.

### **2.3 FATORES DE CRESCIMENTO RELACIONADOS AS CÉLULAS ÓSSEAS**

São vários os fatores que regulam o comportamento das células responsáveis pela produção, manutenção e remodelamento da matriz óssea. Dentre eles estão alguns hormônios, citocinas, proteinases, moléculas de adesão e fatores de crescimento. Os fatores de crescimento envolvidos incluem algumas famílias como IGF (fator de crescimento tipo insulínico), alguns membros da superfamília TGF-B, FGF e PDGF, além de alguns membros da família EGF (fator de crescimento epidérmico). Esses fatores de crescimento podem agir localmente (autocrina e parácrina) ou de forma sistêmica (endócrina), se ligando a receptores localizados na superfície ou no citoplasma das células ósseas alvo e assim ativando vias intrínsecas de sinalização celular que culminam com a expressão de genes ou realização alguma outra atividade pela célula-alvo<sup>51</sup>.

### **2.3.1 Fator de crescimento tipo insulínico (IGF):**

Os IGFs I e II são hormônios polipeptídeos relacionados a insulina. IGF-I é primariamente sintetizado no fígado sob influência do GH (hormônio do crescimento). Os IGFs são polipeptídeos com massa molecular de 7600 que existem no plasma primariamente associados com proteínas ligantes de IGF, conhecidas como **IGFBPs**<sup>51</sup>. As IGFBPs estão relacionadas com a regulação da distribuição do IGF aos tecidos, sob controle endócrino. Os IGF-I e II estão presentes na matriz óssea e são sintetizados por osteoblastos sob regulação de alguns fatores como o **hormônio paratireóideo** que aumenta a síntese e o 17B-estradiol que foi mostrado promover a expressão do mRNA IGF-I, ao passo que, 1,25 dihidroxivitamina D3, cortisol e alguns fatores de crescimento locais como FGF-2, TGF-β1 e PDGF se mostraram inibidores da produção de IGF-II por osteoblastos de roedores<sup>20,28,51</sup>.

Com relação ao IGF-II o hormônio paratireóideo, 17B-estradiol e 1,25 dihidroxivitamina D3, parecem não afetar a sua secreção. Contudo, parece que FGF-2, TGF-β1 e PDGF, assim como sobre o IGF-I, também provocam uma redução na produção do IGF-II. Os IGFs participam também da reabsorção óssea, uma vez que se demonstrou que os IGF-I e II podem promover a formação de osteoclastos em culturas de células de medula óssea, apesar de não terem efeitos sobre os osteoclastos isolados<sup>51,53</sup>. Assim, acredita-se que a participação dos IGFs na reabsorção óssea seja indireta, através da sua ligação com receptores IGF-I e II na superfície dos osteoblastos. É conhecida a capacidade dos IGFs de estimular a proliferação de osteoblástica, assim como, a produção de matriz óssea por essas células<sup>20,51,52,53</sup>.

### **2.3.2 Fator de crescimento transformante-beta (TGF-β) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPS):**

TGF-β e BMPs são membros de uma superfamília que inclui produtos de genes estruturalmente relacionados divididos em grupos intimamente relacionados, responsáveis por várias atividades complexas em uma ampla gama de tecidos. Esses efeitos incluem o crescimento celular, proliferação, apoptose e expressão de novos genes<sup>51</sup>.

A família do TGF-β consiste de três produtos do gene mammalian (TGF-β1-3), um gene TGF-β4 e um TGF-5 (identificado como *Xenopus laevis*). O TGF-β é produzido como

um complexo latente constituído por duas moléculas cada uma contendo TGF- $\beta$  maduro e um peptídeo associado a latência (LAP). Para promover seu efeito biológico os membros da família TGF- $\beta$  precisam se ligar a seus receptores específicos, TBR1 e TBR2. Os ossos são a principal fonte de TGF- $\beta$ 1 que é produzido pelos osteoblastos em duas formas, tanto um precursor com 100kDa, quanto um complexo de 190kDa que é depositado na matriz óssea mineralizada. Tem sido mostrado que o TGF-B age estimulando a formação óssea através do recrutamento e proliferação de osteoblastos, portanto, parece ser um fator quimiotático para essas células<sup>3,51</sup>. Contudo, consistentes estudos mostram que o TGF-B inibe a expressão e a síntese de osteocalcina em células osteoblásticas, mostrando que apesar de estimular sua proliferação o TGF-B inibe a maturação dessas células<sup>3,51</sup>. Alguns fatores relacionados a absorção óssea como hormônio paratireóideo, dihidroxivitamina D3, interleucina-1 tem sido mostrados induzir a liberação de TGF-B, e a inibição da reabsorção óssea previne a sua liberação, mostrando que esse fator de crescimento também está relacionado a reabsorção óssea<sup>51</sup>.

A BMPs (Proteínas morfogenéticas ósseas) são uma grande família de proteínas que compartilham perfis estruturais comuns com alguns membros da família TGF-B, dividida em quatro subgrupos (BMP2, BMP-3, CDMP e um subgrupo não classificado composto por BMP-9, BMP-10, BMP-15). Os membros da família BMP se ligam a receptores do tipo I (BMPR-IA, BMPR-IB) e II (BMPR-II) que são necessários para a transdução de sinal<sup>51</sup>, porém, um estudo recente demonstrou que a inativação do BMPR-II em membro de embriões de camundongos não comprometeu a ossificação endocondral, sugerindo-se que essa seja controlada exclusivamente por receptores BMP-I (para as BMPs)<sup>14</sup>.

As BMPs parecem iniciar o processo de formação óssea desde a migração de células mesênquimais, sua diferenciação em condroblastos e condrocitos, mineralização da cartilagem, angiogênese, diferenciação osteoblástica, formação óssea até o subsequente remodelamento ósseo. O interessante é que as BMPs parecem iniciar esses eventos que são mantidos por outros fatores de crescimento. Além disso, vários membros da família BMP apresentam atividade quimiotática para osteoblastos humanos. Em suma, as BMPs participam da proliferação e diferenciação osteoblástica<sup>51</sup>.

### **2.3.3 Fatores de crescimento fibroblástico (FGF):**

Os fatores de crescimento fibroblásticos são uma família composta por nove membros cujos protótipos são FGF ácido (FGF-I) e básico (FGF-II) e que regulam a proliferação e diferenciação celular. O FGF interage com receptores de tirosina quinase transmembrânica FGF (FGFR). O FGF extracelular encontra-se ligado a heparina ou heparan sulfatado podendo assim ficar armazenado na matriz extracelular. A ligação do FGF com seu receptor FGFR desempenha importante papel no esqueleto<sup>1,51</sup>. Os osteoblastos sintetizam e liberam FGF-2, que ficam armazenados na matriz e podem ser liberados durante a reabsorção óssea. O FGF-2 resulta em um aumento no número de osteoblastos e formação de osso novo, apesar de o resultado de alguns estudos sugerirem que o aumento ou diminuição da formação óssea ser dose dependente. O FGF parece estimular a produção de outros fatores de crescimento como IGF-I e II e reduzir a produção de outros com TGF-B. A importância do complexo FGF/FGFR tem sido demonstrada pela identificação de mutações gênicas que conduzem a anormalidades ósseas<sup>3,51</sup>.

### **2.3.4 Fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF):**

Os PDGFs são fatores de crescimento polipeptídeos diméricos codificados por dois genes PDGF-A E PDGF-B que podem formar 3 tipos diferentes de dímeros de ligação disulfídica, PDGF-AA,-AB,-BB que elicitam suas funções biológicas através da ligação com três tipos de receptores:  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$  e  $\beta\beta$ , sendo que o PDGF-AA se liga ao receptor  $\alpha\alpha$ , o PDGF-AB se liga aos receptores  $\alpha\alpha$  e  $\alpha\beta$ , e o PDGF-BB se liga a todos os três tipos de receptores. Os osteoblastos sintetizam PDGF-A e PDGF-B, e a expressão desses dois é aumentada quando TGF-B está presente, os osteoblastos então liberam essas PDGFs para ficarem depositadas na matriz óssea para serem liberadas durante a reabsorção óssea ou secretam para agir sobre si mesmo e sobre as células vizinhas, portanto, com efeito autócrino e parácrino. As três isoformas do PDGF podem promover a proliferação osteoblástica. Alguns estudos reportam uma ação sobre a reabsorção óssea do PDGF-AB e PDGF-BB e que o PDGF-AA não desempenha essa função<sup>51</sup>.

Alguns outros fatores de crescimento tem se mostrado influenciar o metabolismo ósseo como, por exemplo, o EGF (Fator de crescimento), aumentando a proliferação e a

produção de prostaglandina E2 nos osteoblastos. Ele também aumenta a reabsorção óssea tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo*. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um fator de crescimento polipeptídico que estimula a proliferação de células endoteliais, via receptores de VEGF conhecidos com flt-1 e KDR, mas que é produzido por osteoblastos, além de outras células, sendo estimulado por prostaglandinas, 1,25 dihidroxivitamina-D3 e IGF-I, devido a íntima relação entre os osteoblastos e os vasos sanguíneos o VEGF liberado pelos osteoblastos agem promovendo a proliferação de vasos e também de forma parácrina aumentando a produção de outros fatores de crescimento por células vizinhas<sup>1,10,32</sup>.

## **2.4 BIOMATERIAIS E VIDROS BIOATIVOS:**

O início das pesquisas com biomateriais data do século passado e foi impulsionado pelo aumento progressivo na expectativa de vida da população mundial e por diversas amputações e outras lesões graves decorrentes de acidentes e principalmente guerras, fatos que juntos promoveram rápido aumento no número de protetizações<sup>21</sup>. A princípio buscava-se desenvolver um material que pudesse ser implantado no corpo humano, a fim de substituir partes perdidas, sem estimular uma resposta inflamatória pelo organismo, ou seja, buscava-se desenvolver materiais bioinertes<sup>18,21,25,50</sup>.

Diversos materiais bioinertes foram criados a base de metais como alumina, zircônia, titânio dentre outros, e utilizados na ortopedia em próteses, placas, parafusos, hastes etc<sup>18</sup>, sendo o meio de fixação desses materiais aos ossos meramente mecânico (Fixação mecânica). Posteriormente, na tentativa de aumentar a estabilidade da ligação entre o osso e o implante, modificações na superfície dos implantes foram feitas como, por exemplo, a criação de poros de 100-150µm para permitir o crescimento de vasos sanguíneos e posterior preenchimento com osso e assim melhorar a coaptação (Fixação Biológica)<sup>18</sup>. No entanto, como esses materiais, no geral, tinham uma vida útil de 10 a 20 anos observou-se crescente frequência com a qual eles se deterioravam previamente a morte do paciente<sup>20</sup>.

A degradação dos materiais bioinertes é causada em parte pela natureza morfológica da fixação desses materiais com os ossos<sup>20,21</sup>. Micromovimentos, degradação da superfície do material ou do osso adjacente acabam por comprometer a fixação mecânica e então a

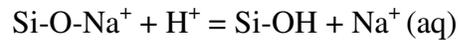
ligação material-osso torna-se oscilante e progressivamente perde qualidade até que se tornam não-funcionais e necessitam ser substituídas através de novo procedimento cirúrgico, causando mais transtornos ao paciente além de os sujeitarem a riscos atrelados a cirurgia<sup>20</sup>.

Essa problemática, somada a diversos registros de insucesso de implantes de materiais bionertes (como os metais e polietileno) em vítimas de guerra, impulsionou as pesquisas que conduziram a descoberta de um novo biomaterial, que além de ser bioinerte era capaz de se ligar aos tecidos vivos (Fixação Bioativa), e assim, aumentar a estabilidade da interface tecido-material, um vidro, chamado de vidro bioativo, produzido pelo pesquisador Larry. L. Hench no ano de 1969 na Universidade da Florida<sup>21</sup>.

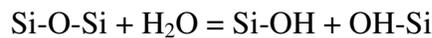
Hench partiu da hipótese de que *“O corpo humano rejeita materiais poliméricos sintéticos e metálicos, formando uma cápsula de tecido conjuntivo, por que os tecidos vivos não são feitos desses materiais. Os ossos contêm fosfato de cálcio hidratado, a hidroxiapatita (HA) e, portanto, se o material for capaz de formar uma camada de hidroxiapatita in vivo ele não será rejeitado pelo corpo”*. Assim, ele desenvolveu um vidro bioativo pertencente ao sistema  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$  contendo 45%wt  $\text{SiO}_2$ , 24,5%wt  $\text{CaO}$ , 24,5%  $\text{Na}_2\text{O}$  e 6%wt  $\text{P}_2\text{O}_5$  chamado de Bioglass 45S5, comercialmente conhecido como Bioglass® que, além de incitar mínima resposta inflamatória do corpo, estimula reações biológicas específicas em sua superfície que culminam com a formação de uma interface estável entre o tecido e o material, sendo, por isso, considerado bioativo<sup>21</sup>.

A ligação do Bioglass® com o osso se dá devido a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HAC) na superfície do material quando em contato com os fluidos corpóreos, como essa camada se assemelha quimicamente com a fase mineral dos ossos<sup>4</sup> acredita-se que haja a ligação com o tecido vivo através da ancoragem de fibras colágenas ao material e o subsequente crescimento do tecido ósseo sobre sua superfície. O mecanismo exato de formação dessa ligação ainda não é completamente compreendido, mas, algumas das reações que ocorrem na superfície do material conduzindo a formação da camada de hidroxiapatita carbonatada (HAC) são assim descritas por Hench:

Primeira etapa: Há uma troca rápida de íons entre o material (Na<sup>+</sup> e Ca<sup>+</sup>) e o líquido corpóreo (H<sup>+</sup>), levando a hidrólise da sílica e a criação de grupos silanóis (Si-OH) sobre a superfície do material, aumentando o pH da solução devido o consumo dos íons H<sup>+</sup>.



Segunda etapa: O aumento do pH conduz a dissolução da sílica (SiO<sub>2</sub>), formando ácido sílico (Si(OH)<sub>4</sub>) na solução, além da formação contínua dos grupos silanóis. (Si-OH).



Terceira etapa: Condensação e polimerização de uma camada de sílica amorfa (sílica gel) de 1-2µm sobre a superfície do material.



Quarta etapa: A dissolução do vidro é acompanhada pela migração de íons cálcio (Ca<sup>+</sup>) e fosfato (PO<sub>4</sub>)<sup>3-</sup> para a camada de sílica gel, formando uma camada de fosfato de cálcio amorfa (FCA).

Quinta etapa: A camada de fosfato de cálcio amorfa incorpora hidroxilas (OH<sup>-</sup>) e íons carbonatos (CO<sub>3</sub>)<sup>2-</sup> da solução e cristaliza uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HAC)(13).

As cinco primeiras etapas são reações inorgânicas que acontecem mesmo quando o material é imerso em água, fluido corpóreo simulado (FCS), solução tris-base, dentre outras e tem como resultado final a formação da camada de hidroxiapatita carbonata. Parece que a nanoporosidade da superfície e a carga negativa dos grupos silanóis desempenham papel essencial na adsorção de proteínas como integrinas, plasminogênio, fibronectina, fibrinogênio e fator Hageman (HMWK), que é seguida da coagulação e ativação do sistema complemento e adesão celular através da ligação de receptores nos osteoblastos a ligantes protéicos. Essas várias proteínas e moléculas que se ligam a superfície atuam também na ativação de zimogênios<sup>18</sup>.

Vários fatores de crescimento são adsorvidos a superfície do material, assim como várias metaloproteinases são ativadas e atuam diretamente sobre a proliferação e

diferenciação osteoblástica. Os osteoblastos diferenciados passam a produzir e secretar os componentes da matriz extracelular, que irá se mineralizar, este processo é semelhante a ossificação intramembranosa que acontece durante o desenvolvimento embrionário<sup>18</sup>. A formação do osso sobre a superfície do material cria uma firme ligação, que é relatada ser até mesmo mais rígida que o material e do que o próprio osso e que atesta a capacidade osteocondutiva do material<sup>21</sup>.

A capacidade de estimular a proliferação e diferenciação osteoblástica é uma característica bem documentada para o Bioglass®, porém, o mecanismo de ação do vidro sobre as células ainda está sob investigação<sup>20,50,52</sup>. Sabe-se que quando imerso no fluido orgânico o vidro reage com a solução liberando íons ativos (Ca, Si, Na), a concentração do silício por exemplo foi mostrada aumentar em 88x após dissolução do Bioglass®, enquanto um aumento menor foi observado na concentração do íon cálcio (10% a mais que o controle). Sabe-se que o íon cálcio no meio extracelular induz a proliferação e a quimiotaxia dos osteoblastos por meio da ligação com uma proteína G acoplada a receptores extracelulares sensíveis ao cálcio. Contudo, os receptores sensíveis a Si ainda não foram identificados<sup>52</sup>.

Estudados de uma forma conjunta os produtos iônicos oriundos da dissolução do Bioglass® se mostraram atuar sobre o crescimento, proliferação, diferenciação e apoptose dos osteoblastos através do aumento na expressão de uma série de genes relacionados a essas funções. Os principais genes super-expressos após a exposição aos produtos do vidro bioativo foram o CD44, Ciclina D1, MAPK-2, integrina  $\beta$ 1, gene RCL relacionado ao crescimento e responsivo a c-myc. O RCL é um promotor de crescimento sendo um efetor do protooncogene c-myc que também foi mostrado aumentado em 1.5 vezes. A expressão do c-myc (que induz a proliferação celular e o crescimento) é regulada por um fator de transcrição PuF, que também se mostrou aumentar em 1.7 vezes sua expressão quando exposto aos íons derivados do Bioglass®<sup>52</sup>.

A ciclina D1 induz a proliferação osteoblástica através da fosforilação dos produtos do gene retinoblastoma, o que resulta numa maior síntese de fatores de transcrição importantes para o início da replicação do DNA, assim, ela promove a passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular(14). Concomitantemente, genes relacionados a apoptose

(Capian e DAD1) também tiveram expressão aumentada, regulando assim a taxa de apoptose, para permitir que apenas células viáveis passem para a fase S<sup>20,52</sup>.

A super-expressão de vários genes que codificam proteínas pertencentes a diversas vias intracelulares (ERK, Map, Quinase-2 MAPKAP, MAPK-2, MAPK p38, ERK1) demonstra que várias cascatas de sinalização podem mediar as ações sobre os osteoblastos induzidas pela sua exposição aos íons derivados do biovidro. Essas vias são ativadas por moléculas sinalizadoras, como o IGF (Insulin-like Growth factor) e o VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) que também foram super-expressos. A expressão de mRNA de IGF-II foi aumentada em 290% e de sua proteína ligante IGFBP-3 em 200%, além disso, observou-se a expressão aumentada em 340% e 310% da metaloproteinase-2 e da catepsina-D respectivamente, que são proteases que clivam a IGFB-3 e liberam o IGF-II ativo, assim a concentração de IGF-II livre aumentou 168%<sup>53</sup>.

O IGF-II é um potente mitogênico produzido pelos osteoblastos que fica armazenado na matriz óssea ligado a uma proteína ligante IGFBP, formando complexos de armazenamento. A metaloproteína-3 e a catepsina-D atuam regulando a liberação do peptídeo IGF-II ativo através da quebra da ligação do IGF-II com a sua proteína carregadora IGFBP. O IGF-II mostrou-se ter efeito autócrino e/ou parácrino sobre as células ósseas, estimulando a proliferação e diferenciação dos osteoblastos (15). O fato dos produtos da dissolução do Bioglass® estimularem o aumento na concentração de IGF-II livre denota sua capacidade osteoindutiva, promovendo o crescimento ósseo mesmo longe da sua superfície<sup>21</sup>.

A indução da expressão aumentada do VEGF pelos íons provenientes da dissolução do vidro bioativo é de particular importância, uma vez que esse fator de crescimento mostrou-se estar envolvido tanto na angiogênese<sup>6,13,46</sup> (brotamento de novos vasos a partir de vasos existentes) quanto na osteogênese<sup>1</sup>. Existem cinco isoformas do VEGF (A,B,C,D e E) geradas a partir de um “*splicing*” alternativo de um único gene VEGF, todas elas se ligam a dois receptores VEGFR-1 (*flt-1*) e VEGFR-2 (*KDR/flk-1*)(36). A ligação do VEGF com seu receptor nas células endoteliais induz a proliferação e migração celular e inibe a apoptose, e por isso é o principal fator de crescimento relacionado com a angiogênese<sup>46</sup>. O brotamento de novos vasos é importante para o desenvolvimento e reparo dos tecidos uma

vez que nutrientes, moléculas sinalizadoras, hormônios e oxigênio, por exemplo, são conduzidos pelos novos vasos para nutrir o tecido em desenvolvimento ou regeneração<sup>12,45,46</sup>.

O processo da angiogênese apresenta seis etapas: (1) o vaso de origem se dilata; (2) há destruição da membrana basal das células endoteliais que estão distanciadas umas das outras; (3) as células endoteliais então migram e se proliferam; (4) são gerados capilares e estruturas semelhantes a tubos; (5) a membrana basal é refeita (6) há o recrutamento de pericitos e células musculares lisas<sup>46</sup>. A importância da angiogênese na ossificação é conhecida há muito tempo, uma vez que o tecido ósseo simplesmente irá degenerar e morrer na ausência de vasos sanguíneos<sup>24</sup>. Ademais, o VEGF atua também diretamente sobre os osteoblastos em conjunto com outras moléculas e proteínas sinalizadoras como o BMP (proteína morfogenética óssea), FGF (fator de crescimento fibroblástico)<sup>1</sup>.

A interação VEGF-VEGFRs ativa a via MAPK/ERK que irá por fim afetar a expressão dos genes bFGF e BMP-2 além de promover a proliferação celular. A via MAPK/ERK também é ativada pela ligação bFGF-FGFR que promove além da proliferação celular a expressão de genes do VEGF, BMP/R e fator de transcrição Runx2. A expressão de bFGF, VEGF e Runx2/cbfa1 é também modulada por um complexo heteromérico Smad 4, derivado da fosforilação dos Smad 1, 5 e 8 pela interação BMP-BMPR<sup>1</sup>.

O potencial osteocondutivo e osteoindutivo do Bioglass®, assim como sua capacidade de estimular a angiogênese, possibilitou seu uso em diversos campos da medicina e odontologia. A exploração comercial dos vidros bioativos se iniciou com a manufatura de dispositivos monolíticos como próteses de ouvido médio (MEP®) que eram manufaturados em forma de cones com três tamanhos diferentes e um implante para manutenção da crista endóssea, que eram inseridos nas cavidades frescas pós-extração dentária para fornecer uma crista estável para dentaduras<sup>25</sup>.

Como os cirurgiões ortopédicos e dentistas preferem usar partículas e grãos que eles podem facilmente pressionar dentro de um defeito ósseo, empresas passaram a produzir o Bioglass® na forma de partículas de 90-710µm de comprimento. Esse material em forma

de pó é amplamente utilizado em reconstruções de mandíbula e preenchimento de defeitos ósseos sob baixa carga<sup>25</sup>.

Novas formulações de vidros bioativos foram aprovadas e vendidas como o Biogran® (BIOMET 3i, Palm Beach Gardens, FL) que é um enxerto ósseo com a mesma composição do Bioglass 45S5, mas, com partículas menores (300-600µm) e o BonAlive® (BonAlive Biomaterials, Turku, Finland) desenvolvido na Finlândia, com formulação S53P4 e que recebeu aprovação para uso em cirurgias ortopédicas em 2006. Até o momento o maior sucesso comercial do Bioglass® é como agente de reparo em cremes dentais, chamado NovaMin® (GlaxoSmithKline, UK), que reduz a hipersensibilidade dentária<sup>25</sup>.

A formulação original do Bioglass 45S5 já foi usada em mais de um milhão de pacientes da odontologia e ortopedia, no entanto, essa quantidade é ainda muito baixa visto o potencial do material. A principal barreira comercial da exploração do Bioglass 45S5 são as suas propriedades mecânicas, pois, como postulado por Hench e Ethridge em 1982: *“a resposta do material a estímulos físicos deve ser semelhante a do tecido que ele substitui”*, logo, o material além de ser biocompatível deve ser “mecanicamente compatível”, propriedade que o bioglass 45S5 não apresenta quando utilizados em ossos sob carga constante, atrito e em ossos muito móveis<sup>19</sup>. Passou-se a testar a utilização do vidro bioativo como revestimento de próteses metálicas como titânio, mas parece que o coeficiente de expansão térmica do biovidro não se equipara ao do titânio o que inviabilizou sua aprovação para uso clínico<sup>25</sup>.

Na tentativa de se melhorar as propriedades mecânicas dos vidros bioativos várias composições contendo o vidro misturado a outros materiais vem sendo testadas. Uma solução interessante é a adição do Nióbio na forma de óxido a rede vítrea<sup>41</sup>. O Nióbio é um metal de transição encontrado na forma de minério como niobita (Fe, Mn), niobita-tantalita [(Fe,Mn)(Ta,Nb<sub>2</sub>)O<sub>6</sub>], pirocloro (NaCaNb<sub>2</sub>O<sub>6</sub> F) e euxenita [(Y, Ca, Ce, U, Th)] que, devido a sua alta resistência mecânica e térmica, é amplamente utilizado em ligas metálicas em indústrias nucleares, soldas elétricas, motores de jatos, foguetes, em capacitores e em supercondutores e devido a sua alta resistência a corrosão na forma de óxido vem sendo também utilizado como tinta de revestimento na indústria petrolífera<sup>47</sup>.

Estudos têm mostrado que o nióbio, como componente de ligas metálicas, promove melhora significativa na resistência à corrosão e a fadiga mecânica, além disso, a sua biocompatibilidade vem sendo demonstrada. Miyazaki et al 2008. mostraram que os géis de oxido de nióbio foram capazes de formar apatita dentro de uma semana de imersão em fluido corpóreo simulado, indicando que os grupos Nb-OH podem atuar como centros de nucleação para apatita, assim como os grupos silanóis (Si-OH)<sup>41</sup>. Outros estudos concluíram que a presença do óxido de nióbio melhora a biocompatibilidade e promove bioatividade<sup>39</sup>. Os poucos relatos na literatura sobre os efeitos do óxido de nióbio incorporados em vidros bioativos indicam que a presença do íon Nb<sup>5+</sup> na rede vítrea promove melhorias na resistência mecânica e na bioatividade<sup>16,35,41</sup>.

A análise das propriedades, osteocondutivas, osteoindutivas, tóxicas e da capacidade pró-angiogênica dos compostos a base de nióbio é bastante relevante uma vez que um material que possua bioatividade atrelada a um maior desempenho mecânico despontará como uma alternativa inovadora para a reconstrução de ossos suportam constante carga mecânica.

## **3.0 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral:**

Analisar em ratos da linhagem Wistar as propriedades bioativas de vidros contendo óxido de nióbio  $Nb_2O_5$  em sua composição e estabelecer qual a concentração ideal deste óxido para estimular a osteoindução, osteocondução e angiogênese.

### **3.2 Objetivos Específicos:**

3.2.2 Comparar qualitativa e quantitativamente a capacidade osteocondutiva e osteoindutiva da adição de diferentes quantidades de nióbio em biovidros, na forma de hastes, implantados no terço proximal da tíbia de ratos.

3.2.3 Comparar através de reações imuno-histoquímicas e morfometria a capacidade de estimular a angiogênese dos biovidros na forma de pó contendo diferentes concentrações do óxido de nióbio, implantados no músculo de ratos.

## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

Tratou-se de um estudo experimental de corte transversal, realizado no período entre agosto de 2012 e julho de 2014, no departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), no qual biovidros na forma de hastes e em pó, contendo diferentes quantidades de óxido de nióbio ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ) foram implantados num defeito na tíbia e no músculo, respectivamente, de ratos albinos da linhagem Wistar, para efeito de comparação, e através dos mesmos procedimentos, o Bioglass® foi implantado em um grupo controle. O protocolo experimental estava de acordo com os princípios éticos de experimentação com animais adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela comissão de Ética em Uso de Animais – CEUA/Unicamp (protocolo nº 2777-1).

### 4.1 Preparo dos vidros bioativos

Para o preparo dos materiais vítreos foi utilizado o tradicional método de fusão-resfriamento, descrito na literatura<sup>31</sup>. Esta metodologia é baseada nos processos convencionais de preparo de vidros, a qual envolve a fusão de uma mistura dos materiais de partida, no caso dos materiais empregados neste trabalho, óxidos. A tabela 1 fornece informações detalhadas de composição e nomenclatura de todos os materiais que foram explorados neste estudo.

**Tabela 1** - Nomenclatura e composição química dos diferentes materiais vítreos preparados neste estudo

| Composição em porcentagem molar |                |              |                       |                        |                         |
|---------------------------------|----------------|--------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| Amostras                        | $\text{SiO}_2$ | $\text{CaO}$ | $\text{Na}_2\text{O}$ | $\text{P}_2\text{O}_5$ | $\text{Nb}_2\text{O}_5$ |
|                                 | % mol          | % mol        | % mol                 | % mol                  | % mol                   |
| <b>BG45S5</b>                   | 46,1           | 26,9         | 24,4                  | 2,6                    | -                       |
| <b>BGPN2.6</b>                  | 46,1           | 26,9         | 24,4                  | -                      | 2,6                     |
| <b>BGPN1.3</b>                  | 46,1           | 26,9         | 24,4                  | 1,3                    | 1,3                     |
| <b>BGSN1</b>                    | 45,1           | 26,9         | 24,4                  | 2,6                    | 1,0                     |

Onde; os símbolos S, P e N referem-se respectivamente aos óxidos  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$  e  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ .

As modificações introduzidas pela adição de  $Nb_2O_5$  na composição do biovidro Bioglass® 45S5 foram realizadas pela substituição de parte do teor de  $SiO_2$  ou de  $P_2O_5$ . Logo, toda a nomenclatura foi baseada nas variações introduzidas na composição química. Deste modo, o material Bioglass® 45S5 foi chamado de BG45S5. Para os demais, a seguinte norma foi adotada: BG (Bioglass) + símbolo do óxido removido + símbolo do óxido incrementado + a quantidade em porcentagem em mol. Para exemplificar, BGSN1, significando que o  $SiO_2$  foi substituído por  $Nb_2O_5$  na quantidade de 1% em mol.

Os óxidos  $Na_2O$  e  $CaO$  empregados na síntese foram obtidos a partir seus respectivos carbonatos. Todos os reagentes precursores empregados no preparo dos vidros e suas características estão dispostos na Tabela 2.

**Tabela 2** - Características de todos os reagentes precursores dos materiais vítreos preparados

| <b>Reagente</b>             | <b>Precursor</b> | <b>Marca</b>         | <b>Pureza</b>     |
|-----------------------------|------------------|----------------------|-------------------|
| <b><math>SiO_2</math></b>   | $SiO_2$          | <i>Sigma-Aldrich</i> | 99,8%             |
| <b><math>CaO</math></b>     | $CaCO_3$         | <i>Merck</i>         | >99,5%            |
| <b><math>Na_2O</math></b>   | $Na_2CO_3$       | <i>Sigma-Aldrich</i> | 99,00%            |
| <b><math>P_2O_5</math></b>  | $P_2O_5$         | <i>Sigma-Aldrich</i> | 99,99%            |
| <b><math>Nb_2O_5</math></b> | $Nb_2O_5$        | <i>CBMM</i>          | <i>Grau ótico</i> |

Em uma etapa prévia à fusão, os compostos  $SiO_2$ ,  $CaCO_3$  e  $Na_2CO_3$  foram misturados e moídos em um graal de ágata para homogeneização dos materiais. Em seguida, essa mistura foi levada ao forno em cadinho de platina para descarbonatação conforme programa de temperaturas descrito na Tabela 3.

**Tabela 3** - Programa térmico utilizado na descarbonatação dos reagentes  $CaCO_3$  e  $Na_2CO_3$

| <b>Programa</b> | <b>Temperatura</b> | <b>Rampa</b> | <b>Patamar</b> |
|-----------------|--------------------|--------------|----------------|
| <b>Passo 1</b>  | 500 °C             | 5°C/ min.    | 60 minutos     |
| <b>Passo 2</b>  | 950 °C             | 5°C/ min.    | 90 minutos     |

A mistura dos óxidos obtida foi armazenada em frascos plásticos em dessecador até o momento do preparo do biovidro. O  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e  $\text{P}_2\text{O}_5$  foram acrescentados à mistura somente momentos antes do processo de fusão dos óxidos. A fusão foi realizada em cadinho de Pt, empregando um forno Lindberg blue a 1400 °C por 3 horas. Durante esse período o fundido foi cuidadosamente agitado por duas vezes, objetivando uma melhor homogeneização da mistura. Terminado o tempo de fusão o fundido foi vertido em água (método fritas), sendo separado rapidamente por filtragem e secagem em estufa.

As frações pó empregadas neste estudo foram obtidas macerando o biovidro particulado em graal de ágata, selecionando com auxílio de peneiras para granulometria menor que 10  $\mu\text{m}$ .

## **4.2 Animais**

Foram utilizados 40 ratos albinos (*Rattus norvegicus*), machos da linhagem Wistar com oito semanas de idade procedentes do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). Foi realizada uma amostragem por conveniência na qual os animais foram divididos em 4 grupos de 10 ratos cada. Em cada grupo um tipo de material era implantado na tíbia (em forma de haste) e no músculo (em pó), sendo eles o BGPN1.3, BGPN2.6 e BGSN1. O grupo BG45S5 serviu como controle. Cada grupo foi ainda subdividido em dois de acordo com o tempo de experimentação pós-operatório, sendo um com 14 e o outro com 28 dias (Figura 1).

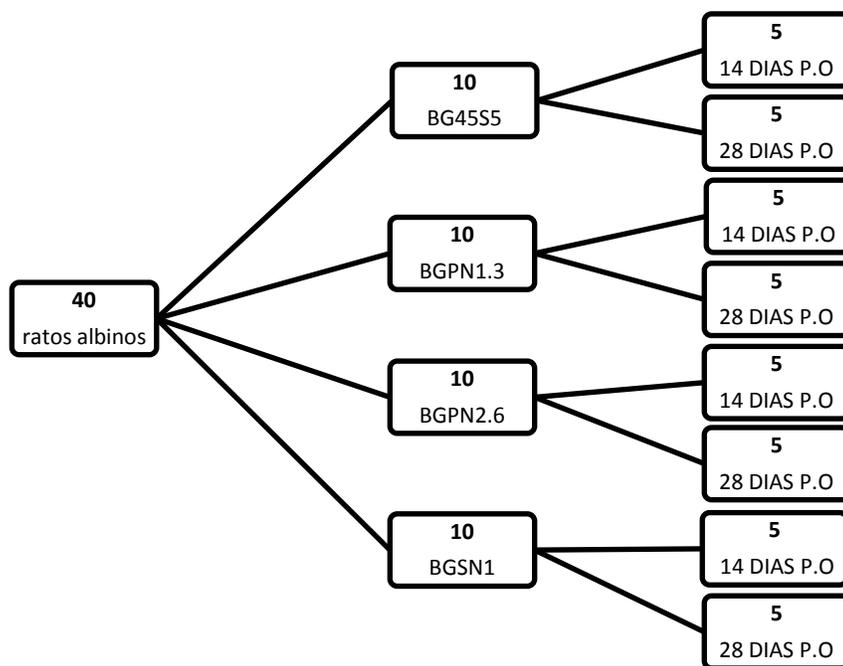


Figura 1: Divisão dos animais nos diferentes grupos.

### 4.3 Procedimento cirúrgico

Previamente ao procedimento cirúrgico os animais foram anestesiados com uma solução de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina na proporção de 1:1 na dose de 0,15ml/100g de peso, após a injeção do anestésico esperou-se o tempo mínimo de 10 minutos ou tempo suficiente para que o animal não respondesse ao teste de prensão da pata traseira em seguida foi realizada a tricotomia da pata traseira e assepsia com álcool 70%.

#### 4.3.1 Implante intramuscular

Para o implante intramuscular, 50mg do biovidro, na forma de pó (previamente autoclavado) foram misturadas ao selante de fibrina (TISSUCOL kit 2mL BAXTER) poucos instantes antes de implantado. Essa medida foi tomada para facilitar o manejo do material, visto que a sua implantação na forma de pó dificulta as análises histológicas devido a ampla disseminação do material no fluido intramuscular.

A incisão foi realizada com aproximadamente dois centímetros de comprimento, paralela ao ligamento patelar para exposição da musculatura medial da coxa. Medialmente ao feixe neurovascular do membro inferior um defeito na musculatura adutora da coxa foi criado e, essa cavidade foi preenchida com 50mg do biovidro na forma de pó (Figura 2). Após o preenchimento da cavidade com o pó essa era suturada.



**Figura 2:** *Cirurgia de implante intramuscular*

#### **4.3.2 Defeito ósseo e Preenchimento com haste de vidro**

Após a sutura do músculo, o perióstio do terço proximal da tíbia era rebatido fazendo-se três incisões, sendo duas horizontais e uma vertical unindo as extremidades das duas outras, formando uma “janela”, isso expunha a cortical proximal da tíbia. Um defeito ósseo transcortical com 2mm de diâmetro foi criado com uma broca esférica diamantada com ponta ativa de 2mm de diâmetro (Figura 3). O defeito foi então preenchido com o biovidro na forma de haste (previamente autoclavado) até o encaixe total. O perióstio era suturado recobrando o defeito e o implante, a seguir foi suturada a pele e nela se aplicava Rifamicina a fim de prevenir infecções. O analgésico Dipirona Sódica na dose de 875mg/Kg era administrado, via oral, nos cinco dias seguintes a cirurgia.



**Figura 3:** *Defeito no terço proximal da face anteromedial da tíbia esquerda.*

#### **4.4 Eutanásia dos animais**

Após completar o período de experimentação, os animais sofreram eutanásia com uma dose excessiva de anestésico (Solução 1:1 de Cloridrato de Cetamina e Xilazina na dose 0,30ml/100g).

#### **4.5 Retirada e preparo das amostras**

##### **4.5.1 Retirada e fixação do fragmento muscular**

Após a eutanásia dos animais o fragmento do músculo contendo o biomaterial era retirado tomando como referência o ponto da sutura dado na cirurgia. O espécime excisado foi imediatamente colocado numa solução fixadora (Bouin) onde permanecia por 48 horas, a solução estava contida em potes estéreis devidamente identificados.

##### **4.5.2 Retirada e Fixação da tíbia contendo a haste de vidro**

Uma vez procedida a eutanásia e a retirada do fragmento muscular contendo o material a tíbia foi retirada através de sua desarticulação nas articulações do joelho e tornozelo, e foi seguida por uma “limpeza” do osso retirando-se o excesso de tecido muscular envolta, deixando-se apenas uma pequena lâmina de tecido mole a fim de evitar

danos ao perióstio. O osso foi colocado em solução de formalina a 10% com solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,3, a temperatura ambiente pelo período de 48 horas para fixação.

Passadas 48 horas de fixação tanto as tíbias quanto os fragmentos musculares (visto que espera-se que o material induza a formação de osso dentro do fragmento) foram submetidos a um processo de descalcificação em solução de EDTA 5% (fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio bibásico, NaCl e EDTA sal dissódico) que foi trocada de 2 em 2 dias durante o período de 4 semanas ou tempo necessário para que se pudesse transpassar com facilidade uma agulha pelo espécime.

#### **4.6 Microscopia de luz**

Uma vez procedidas a fixação e a descalcificação os fragmentos eram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e embebidos em parafina líquida para confecção dos blocos para microtomia. Foram obtidos cortes de 6 µm de espessura que foram corados com Hematoxilina e Eosina.

#### **4.7 Imuno-histoquímica**

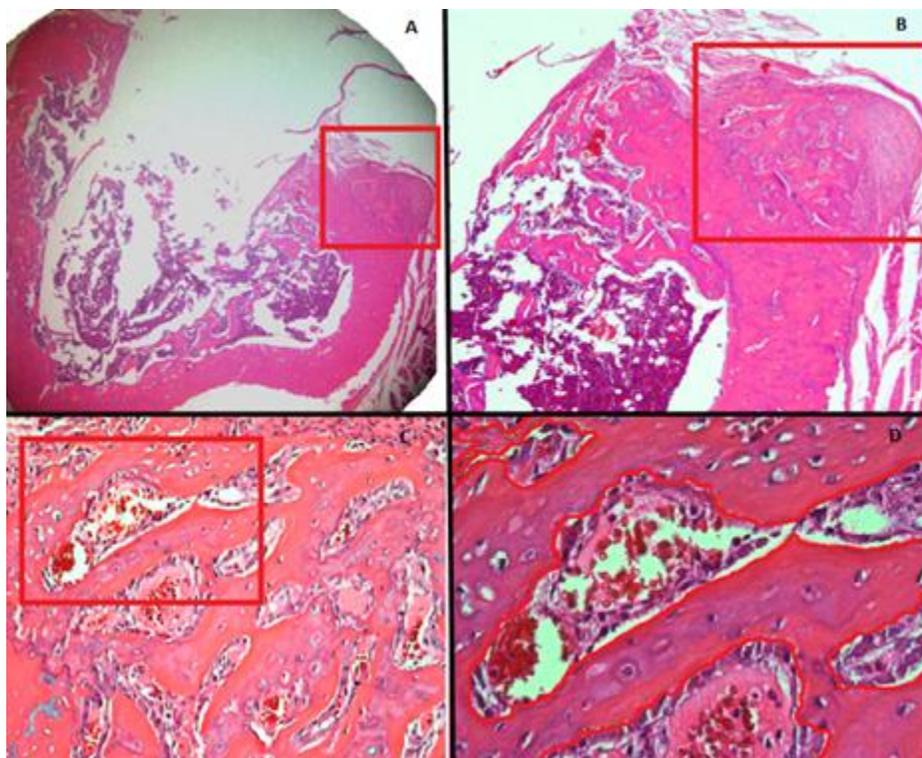
As secções transversais dos músculos contendo os implantes foram desparafinadas em xilol e reidratadas numa série descendente gradual de alcoóis. A recuperação antigênica foi feita em tampão citrato em três ciclos de cinco minutos em microondas. A peroxidase endógena foi bloqueada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% em metanol absoluto. Após o bloqueio das proteínas inespecíficas em BSA3% por uma hora os cortes foram incubados *overnight* com anticorpos monoclonais de rato anti-VEGF. Anticorpos IgG anti-mouse conjugado com peroxidase foram utilizados como anticorpos secundários. Diaminobenzidina (DAB) foi utilizada para revelar. Os cortes foram então contra-corados com hematoxilina por 10 segundos.

## 4.8 Análises Morfométricas

Foi utilizado um fotomicroscópio da marca Nikon modelo 80i com câmera Nikon modelo DS-Ri1 e o software NIS-Elements: Advanced Research 3.0 (USA) no qual foram avaliados os seguintes parâmetros:

### 4.8.1 Área de osso subperiosteal no defeito ósseo

A mensuração da área de osso subperiosteal neoformada foi feita em um campo com objetiva de 40x na cortical de cada lado adjacente ao implante em cinco cortes não-seriados de cada animal e a média entre as áreas mensuradas era registrada (Figura 4). O número mínimo e confiável de campos para as medidas morfométricas foi obtido de acordo com o estudo de Mandarim-de-Lacerda (1995).



**Figura 4:** Fotomicrografias demonstrando o método de mensuração da área de osso subperiosteal (Coloração: hematoxilina e eosina). A: Aumento 20X; B: Aumento de 40X; C: Aumento de 200X; D: Aumento de 400X.

#### 4.8.2 Osso esponjoso neoformado nas tíbias 14 dias

A quantidade de osso esponjoso neoformada foi aferida num aumento de 40x através da técnica de sobreposição de pontos de intersecção método introduzido por Mandarim-de-Lacerda 1995. Para isso se usou uma grade com 99 pontos de intersecção na qual era registrada a quantidade de pontos de intersecção sobre fragmentos ósseos (Figura 5).

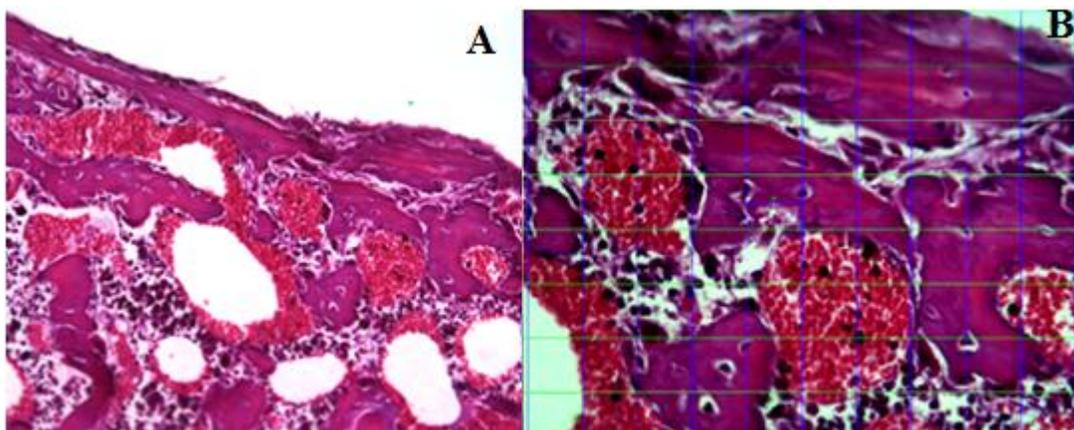
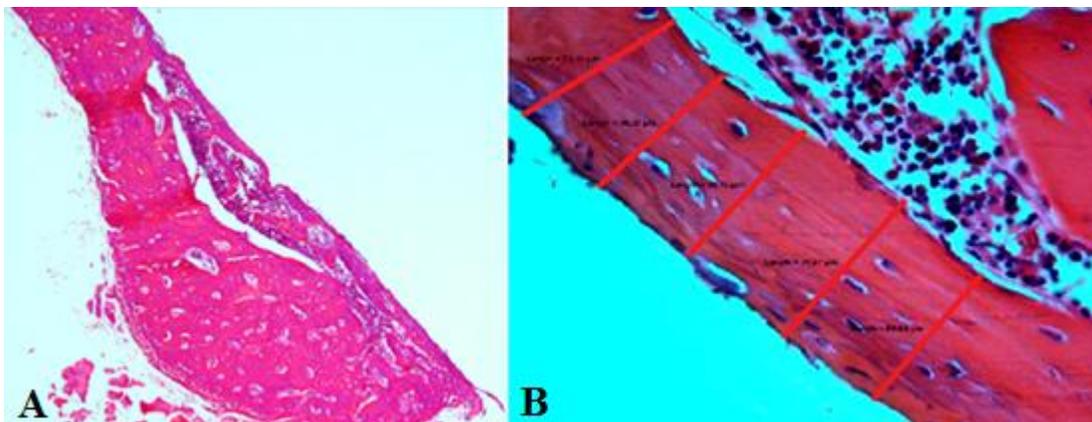


Figura 5: Fotomicrografias demonstrando o método de mensuração do osso esponjoso (Coloração: hematoxilina e eosina). A: Aumento de 100x; B: Aumento de 400x.

#### 4.8.3 Espessura da lâmina óssea formada ao redor do implante

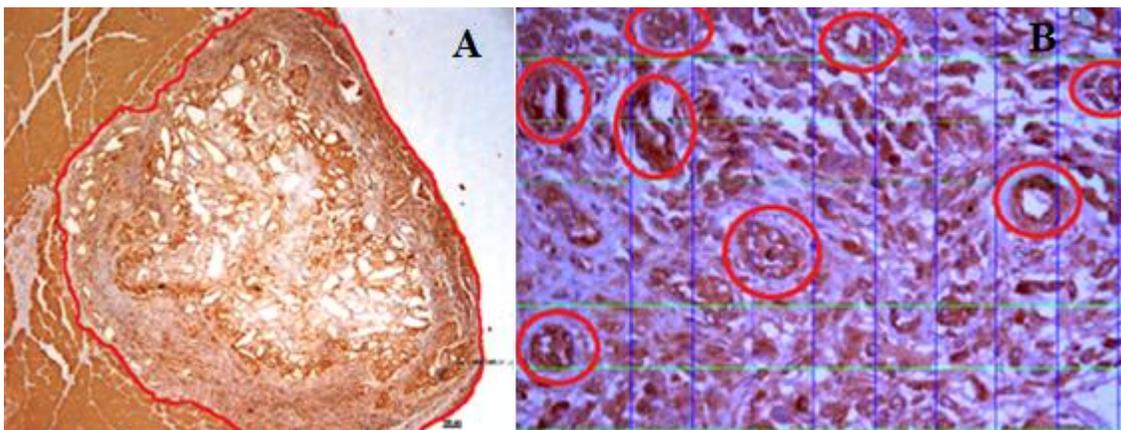
A espessura da lâmina óssea formada ao redor do implante foi mensurada numa objetiva de 40x em 20 pontos diferentes, sendo cinco medidas por campo, e a escolha dos campos era feita aleatoriamente (Figura 6).



**Figura 6:** Fotomicrografias demonstrando o método de análise da espessura da lâmina formada ao redor do implante (Coloração: hematoxilina e eosina). A: Aumento de 20X. B: Aumento de 400X.

#### 4.8.4 Número de vasos sanguíneos

A contagem dos vasos sanguíneos era feita manualmente no aumento de 40x das lâminas marcadas por técnica imunohistoquímica com anti-VEGF. O número total de vasos ao redor do implante foi registrado e a densidade de vasos foi calculada dividindo esse número pela área total ocupada pelo material implantado (Figura 7).



**Figura 7:** Fotomicrografia da técnica utilizada para contagem dos vasos (Marcação Imunohistóquímica anti-VEGF). A: Área total do implante (aumento de 40X); B: Contagem dos vasos (aumento de 400x).

## 4.9 Análise Estatística

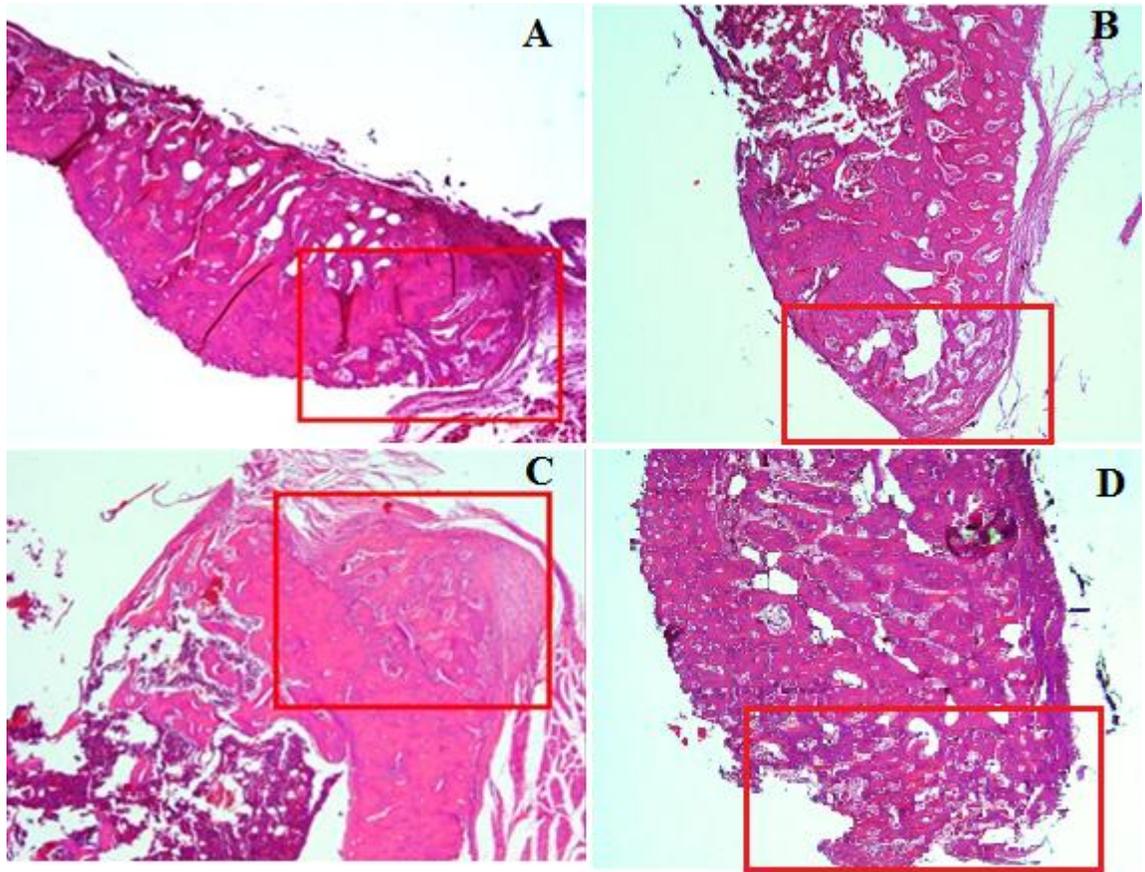
Foi realizado o teste Shapiro-Wilk para atestar a normalidade dos dados. A comparação entre as médias das áreas de osso subperiosteal dos grupos, bem como entre as médias das espessuras da lâmina óssea formada ao redor do implante e número de vasos sanguíneos por  $\text{mm}^2$  foram feitas através de um ANOVA – One-way com *post hoc* Tukey (caso as variâncias fossem homogêneas) ou Games – Howell (para variâncias não homogêneas). As comparações entre a quantidade de osso esponjoso formado nos grupos de 14 dias, devido a não-normalidade dos dados, foram feitas através do teste Kruskal-Wallis, usando-se a comparação entre o grupo controle (BG45S5) e cada um dos grupos através do teste Mann-Whitney como *post hoc*. Para essas comparações uma correção de Bonferroni foi aplicada e então os efeitos foram reportados em um nível de significância de 0,0167. Para os demais testes adotou-se um  $\alpha = 0,05$ .

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE DAS TÍBIAS:

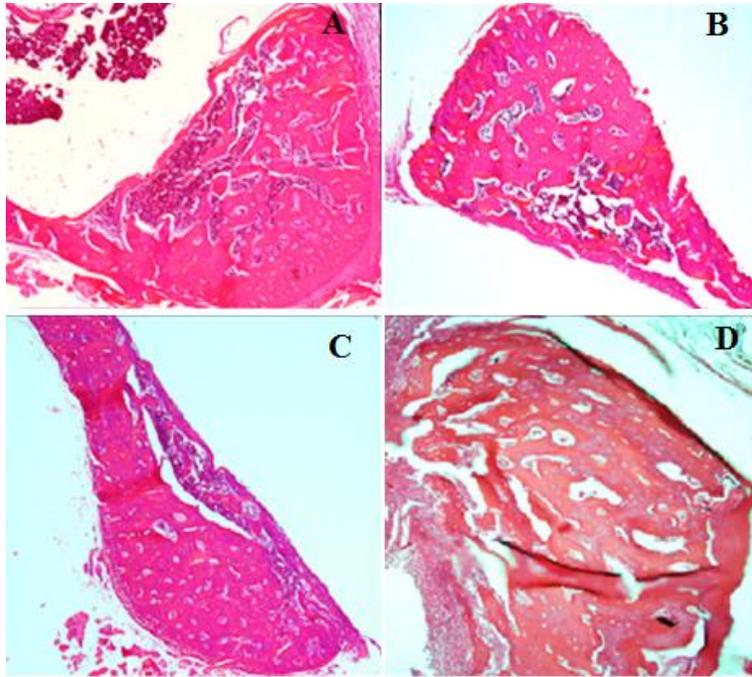
#### 5.1.1 Análise Histológica:

Em todos os grupos e para todas as datas pós-cirurgia, pôde-se observar que a presença do implante de vidro estimulou a formação de um calo ósseo na cortical ao redor do implante, onde o osso imaturo rico em células e colágeno desorganizado predomina (figura 8). Em nenhum dos grupos foram observados sinais significativos de inflamação ou rejeição ao material, com degeneração óssea ou presença de infiltrado inflamatório significativo.



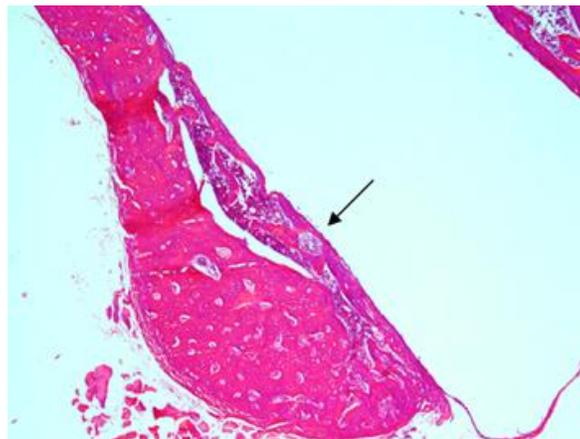
**Figura 8:** Fotomicrografias de cortes transversais da tíbia. Presença do calo ósseo na cortical adjacente ao implante de BG45S5 (A), BGSN1 (B), BGNP2.6 (C), BGNP1.3 (D) após 14 dias (Coloração: hematoxilina e eosina) . Aumento de 40X.

No 28° dia a parte da cortical que estava em contato com o vidro apresentou trabéculas bem mais compactas do que no 14° dia em todos os grupos, exceto no grupo BGSN1 (Figura 9).



**Figura 9:** Fotomicrografias de cortes transversais das tíbias 28 dias após implante do BG45S5 (A), BGN1.3 (B), BGN2.6 (C), BGSN1 (D) (Coloração: hematoxilina e eosina). Aumento de 40X (A,B,C) e 100X (D).

Após 28 dias uma lâmina óssea era nítida ao redor do implante em todos os grupos, demonstrando a capacidade osteocondutiva de todos os materiais testados (Figura 10).



**Figura 10:** Fotomicrografia de um corte transversal da tíbia demonstrando a lâmina óssea formada em todos os grupos após 28 dias de implante (Seta (Coloração: hematoxilina e eosina). Aumento de 40X).

### 5.1.2 Morfometria:

A comparação entre as médias das áreas de osso subperiosteal entre os grupos 14 dias e entre os grupos 28 dias revelou não haver diferença entre os grupos após 14 dias [ $F(3,16) = 1,881, p = 0,174, \omega = 0,34$ ]. No entanto, no 28º dia a adição do óxido de nióbio na composição do vidro apresentou um efeito significativo sobre a indução de formação óssea [ $F(3,16) = 6,375, p = 0,005, \omega = 0,67$ ] sendo que o grupo no qual foi implantado o BGNP1.3 apresentou uma área média de osso subperiosteal ( $51513,88 \pm 1265,13 \mu^2$ ) significativamente maior que o grupo controle (BG45S5) ( $46537,19 \pm 2050,08 \mu^2$ ) e do que o grupo BGSN1 ( $40614,49 \pm 3360,57 \mu^2$ ) (Figura 11).

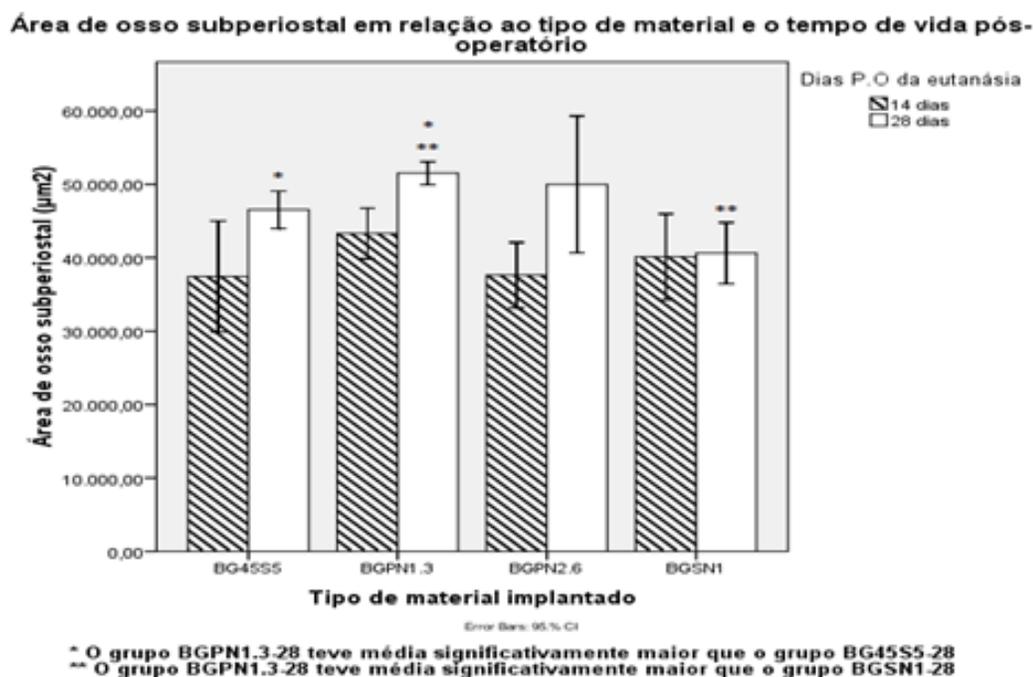


Figura 11: Área média de osso subperiosteal mensurada em cada grupo

Quando comparadas as espessuras médias das lâminas ósseas formadas ao redor do implante nos grupos 28 dias, observou-se não haver diferença significativa entre os grupos [ $F(3,16) = 0,423, p = 0,739, \omega = 0,31$ ] (Figura 12).

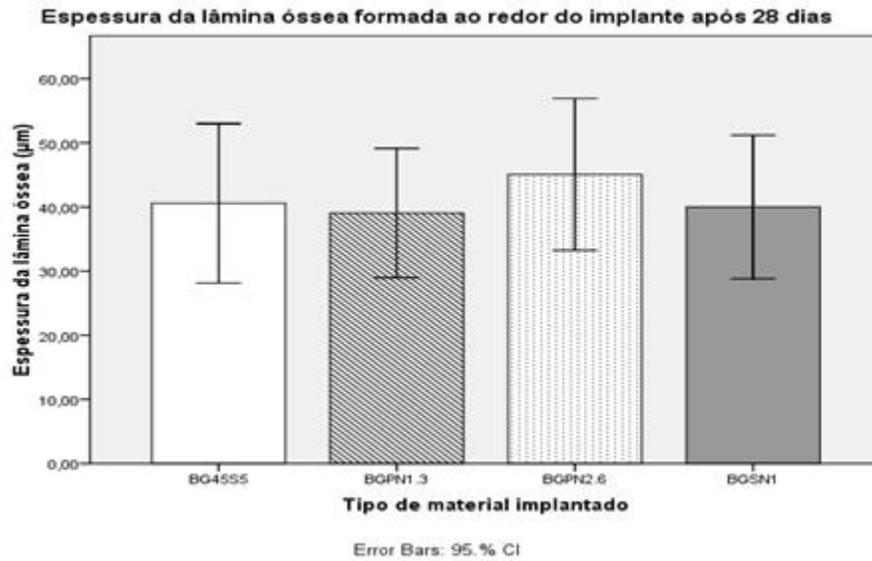


Figura 12: *Espeçuras médias das lâminas ósseas formadas ao redor do implante após 28 dias.*

A quantidade de osso esponjoso diferiu significativamente entre os grupos [H(3) = 11,93, p= 0,008]. Foi utilizado o teste Mann-Whitney para determinar onde estava a diferença. Uma correção de Bonferroni foi aplicada e então os efeitos foram reportados em um nível de significância de 0,0167. A substituição de 1,3% de peso total do P2O5 por Nb2O5 resultou num aumento significativo (U= 0,000, p=0,004, r= 0,84) da quantidade de pontos sobre tecido ósseo, ao passo que, os grupos BGN2.6 (U = 12, p=0,495, r=0,033) e BGSN1 (U=5,5, p=0,087, r=0,46) não diferiram do controle. (Figura 13).

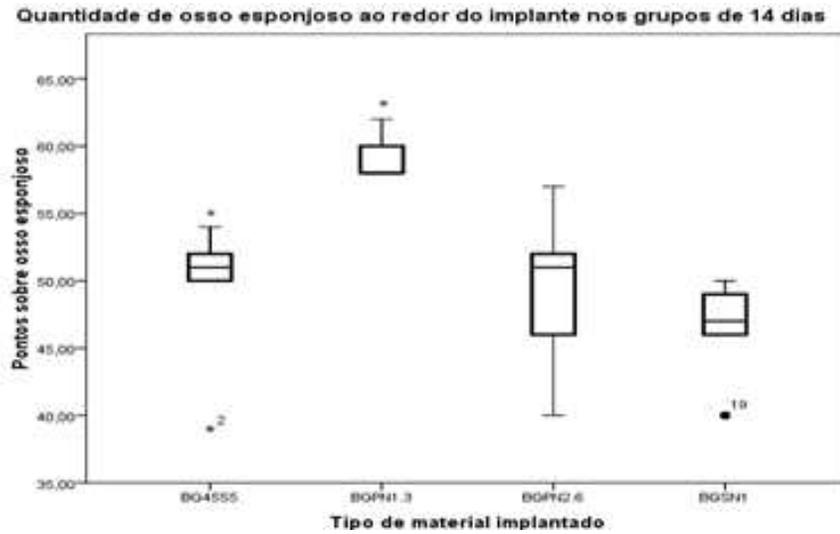
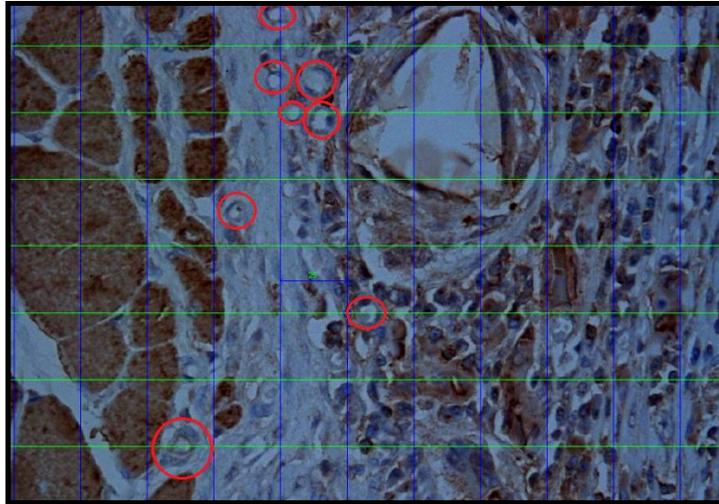


Figura 13: *Quantidade de osso esponjoso formado ao redor do implante após 14 dias. \*Diferença significativa  $p < 0,0167$*

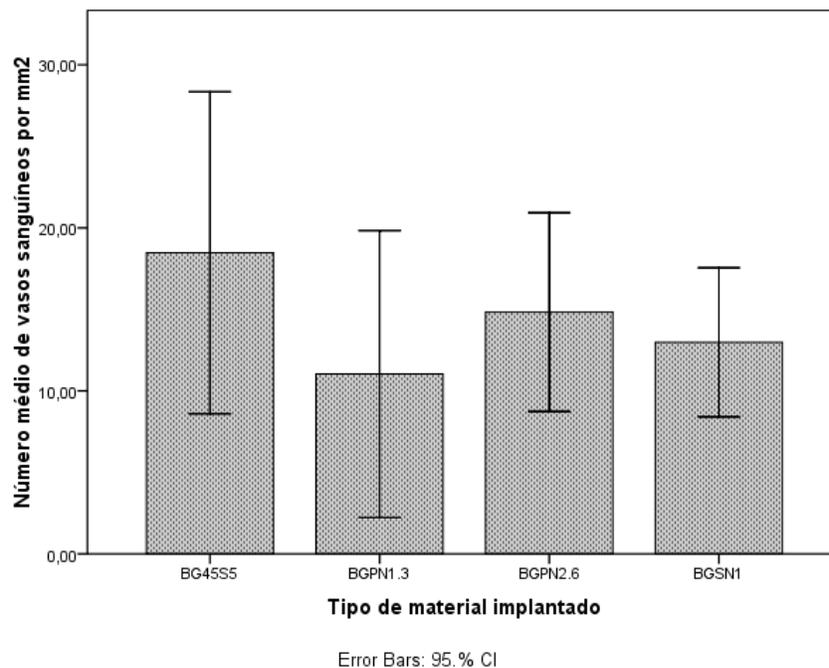
## 5.2 NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS

Vasos sanguíneos foram observados principalmente na cápsula fibrosa que se formou ao redor do implante, mostrando que a presença do implante estimulou a formação de ramos vasculares a partir de vasos existentes no tecido ao redor, formando uma rede que circundava todo o implante por vezes emitindo ramos mais profundos no mesmo. Pôde-se observar ampla marcação do VEGF em toda área de implante, em diversos tipos celulares, em todos os grupos, tanto após 14 quanto após 28 dias (Figura 14).



**Figura 14:** Fotomicrografias de cortes transversos dos fragmentos musculares contendo o biomaterial na forma de pó (marcação imunohistoquímica anti- VEGF). Vasos sanguíneos podem ser observados na cápsula fibrosa que separava o implante (BGN1.3) do tecido muscular (Círculos vermelhos). Áreas acastanhadas são as que contém VEGF imunomarcado (Aumento de 100X).

Tanto após 14 quanto após 28 dias havia de 10 a 18 vasos sanguíneos por mm<sup>2</sup> na área do implante em todos os grupos, não havendo diferença significativa entre eles [F(3,20)= 1,137, p=0,358, ω= 0,13]. (Figura 15).



**Figura 15:** Densidade de vasos sanguíneos nas áreas do implante intramuscular após 14 e 28 dias.

## 6.0 DISCUSSÃO

Os vidros bioativos apesar de apresentarem bioatividade classe A (osteointutivo e osteocondutivo) sofrem grande restrição em sua exploração comercial devido a baixa resistência mecânica, o que impossibilita seu uso em ossos que suportam carga mecânica constante. Esse fato estimulou a busca por materiais mais resistentes, que mantivessem bioatividade semelhante. A introdução do óxido de nióbio em ligas metálicas e em revestimento de implantes vem se mostrando uma solução para melhora de suas propriedades mecânicas, uma vez que esse confere ao vidro uma maior resistência a corrosão e à fadiga<sup>16,31,48</sup>, nesse contexto, a utilização do óxido de nióbio como componente de vidros bioativos parece ser uma alternativa promissora para incremento de suas propriedades mecânicas e conseqüentemente de sua exploração comercial, porém, nenhum estudo analisou a biocompatibilidade e bioatividade de vidros contendo esse óxido. Nesse contexto, o presente estudo objetivou testar as propriedades bioativas dos vidros contendo óxido de nióbio. Os resultados encontrados revelaram que os tecidos respondem aos vidros estudados de forma semelhante ao vidro controle não apresentando resposta inflamatória significativa.

### 6.1 Biocompatibilidade

A avaliação da citotoxicidade dos implantes vítreos deve levar em consideração os efeitos locais e sistêmicos decorrentes da presença do implante, uma vez que localmente o implante reage com o tecido adjacente e que íons provenientes da corrosão do material podem atuar de forma sistêmica. O presente estudo analisou apenas as respostas locais da adição de 1, 1,3 e 2,6% de peso total de óxido de nióbio na composição do Bioglass®, já que os efeitos sistêmicos foram bem descritos por Dsouki et al. 2014<sup>9</sup> que, após tratarem ratos com uma dose única intraperitoneal de 3% de óxido de nióbio diluído em PBS, quantificaram as células do peritônio e sua viabilidade, realizaram citometria de fluxo no sangue e análise histológica de cortes do fígado. Esses autores concluíram que o óxido de nióbio, nessa proporção, estimulou um aumento do número de células no peritônio sem alterar a viabilidade celular, não havendo modificações hematológicas e que uma

degeneração hidrópica média é observada 7 dias após o tratamento mas que os hepatócitos se regeneram completamente até 12º dia, demonstrando que essa degeneração não é progressiva.

A avaliação qualitativa do implante no osso mostrou ausência de células inflamatórias ou degeneração dos osteoblastos tanto no 14º quanto no 28º dia sem qualquer sinal de dano ao tecido ósseo preexistente, revelando compatibilidade com o tecido ósseo. Esses resultados corroboram os achados de Matsuno et al. 2001 que ao analisarem a resposta tecidual a implantes de ligas de nióbio atestaram a biocompatibilidade e osteocondutividade do material quando sob a pele e na medula óssea de ratos. Outro estudo, analisando a biocompatibilidade do nióbio como revestimento de implantes *in vitro*, concluiu que a superfície de nióbio apresenta biocompatibilidade superior a superfície plástica controle (do meio de cultura) e do que a superfície de aço inoxidável<sup>48</sup>.

Esses achados mostram que os vidros contendo óxido de nióbio em sua composição não apresentam toxicidade local quando implantados em ossos e que essa resposta foi similar ao vidro BG45S5, amplamente utilizado para diversos fins biomédicos. Esse resultado completa os achados sobre a biocompatibilidade do nióbio que em conjunto apontam o nióbio como um metal biocompatível, seja local ou sistemicamente, que pode ser utilizado para implantes sem risco aos pacientes.

## **6.2 Bioatividade**

Todos os vidros implantados apresentaram-se bioativos uma vez que estimularam a formação de um calo ósseo na cortical adjacente. A magnitude desse calo diferiu entre os grupos, sendo que no grupo onde foi implantado o BGPn1.3 a formação óssea foi significativamente superior ao vidro controle (BG45S5) após 28 dias. Além disso, a quantidade de osso esponjoso formado em resposta a presença da haste de vidro foi superior ao controle após 14 dias.

A capacidade osteocondutiva de ligas metálicas e revestimentos contendo nióbio é bem descrita na literatura<sup>39,48</sup>. Ademais, na sua forma de óxido e como componente de

vitrocerâmicas, sabe-se que a liberação de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+}$  (provenientes do  $\text{CaO}$  e  $\text{NaO}$ ) pelo material que ocorre em troca com o  $\text{H}^{+}$  da solução leva a formação de grupos  $\text{Nb-OH}^{29}$ . Esses grupos  $\text{Nb-OH}$  são efetivos para a nucleação da apatita, formando cristais com formas cônicas ou esféricas, a depender das enzimas e proteínas presentes na solução<sup>27,29</sup> mas que independentemente da forma aumentam a complexidade da superfície do material, aumentando assim a sua área de contato, o que aumentaria a adsorção de proteínas<sup>30</sup>. Um estudo recente mostrou que a adição do nióbio acelera e potencializa as reações que ocorrem na interface material-osso que conduzem a formação da camada de hidroxiapatita<sup>36</sup> o que poderia contribuir para uma maior osteoindução pelo mecanismo de osteogênese de contato.

Kushwaha et al. 2011, ao cultivar células mesenquimais humanas sobre vitrocerâmicas de fluorapatita dopadas com 1% de óxido de nióbio e com modificações microestruturais em sua superfície, mostrou haver maior adesão celular sobre superfícies mais complexas, em comparação com uma superfície polida e que além de se aderirem precocemente ao material, as células se diferenciaram em osteoblastos, secretaram matriz rica em fibrilas semelhante a colágeno e nódulos ricos em cálcio se formaram, foi digna de nota nesse estudo a preferência da adesão dos prolongamentos osteoblásticos as esferas submicroscópicas formadas a partir da nucleação da apatita, quando analisados sob microscopia eletrônica de varredura.

Os resultados do presente estudo confirmam os achados de Matsuno et al. 2001 com respeito a formação de uma lamina óssea ao redor do implante com espessura variando entre 29 e 48  $\mu\text{m}$ . Os autores do estudo citado atestaram a eficácia da observação e mensuração da espessura dessa lâmina através de microscopia óptica de lâminas coradas com HE comparando este tipo de análise com análise de imagem composicional e mapeamento elemental por EPMA, onde os resultados encontrados foram semelhantes, e os permitiram comprovar a capacidade osteocondutiva de um implante metálico com forma de fio, alojado na medula óssea do fêmur de ratos wistar. A formação dessa mostra que todos os vidros são osteocondutivos.

Possivelmente o aumento do pH proporcionado pela dissolução de parte da superfície do material, somado a nucleação da apatita desestabiliza a interface material-osso, o que é necessário para a ligação osso material *in vivo*, uma vez que essa modificação cria uma micro complexidade tridimensional que permite a osteogênese de contato provavelmente pela maior adsorção de fibrina. A osteogênese de contato é explicada por Davies 2007 como sendo completamente dependente da complexidade da superfície a qual o osso vai crescer. Em sua revisão ele defende a teoria de que o osso é que se liga ao material e não o contrário como se pensava, e que para que isso aconteça faz-se necessário uma superfície não polida, com uma complexidade em escala micro ou nanoscópica para permitir maior área para adsorção de proteínas, principalmente fibrina, pois sobre a fibrina há agregação de plaquetas que se ativam e liberam citocinas que recrutam células indiferenciadas e estimulam a diferenciação destas em células semelhantes a osteoblastos, que liberam matriz e essa se calcifica de forma a se interdigitar entre as ranhuras microscópicas na superfície do material.

Aplicando-se esses conceitos aos resultados do presente estudo, a formação da lâmina óssea ao redor do vidro contendo óxido de nióbio e a maior formação de osso subperiosteal em contato com a haste de vidro pode ter ocorrido devido a uma maior complexidade da superfície do material causada pela dissolução de parte da superfície no fluido corpóreo ao passo que a parte contendo o nióbio manteve-se e serviu de centro de nucleação de apatita, formando esferas ou cones, fazendo assim com que a superfície se tornasse bastante irregular em escala micro e/ou nanoscópica, permitindo a subsequente ligação com o osso pelo mecanismo supracitado.

Os biovidros com nióbio testados no presente estudo mostraram-se osteoindutivos, uma vez que estimularam a formação de maior volume osso superiosteal tanto na segunda quanto na quarta semana pós-cirúrgica e estimularam a formação de uma lâmina óssea ao redor da haste implantada na tíbia após 28 dias. Esses achados mostraram que a incorporação do óxido de nióbio na rede do vidro não prejudicou a capacidade do material de induzir a diferenciação de células mesenquimais da camada interna do periósteo em células da linhagem osteogênica. Sabe-se que os vidros bioativos são capazes de estimular a diferenciação e proliferação de células mesenquimais em osteoblásticas por estimular

passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular, e que isso é induzido pela ligação dos íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Si}^{+2}$  a receptores de superfícies dessas células, desencadeando cascatas intracelulares que culminam com a expressão de genes relacionados a esse avanço no ciclo celular<sup>20</sup>.

Os resultados do presente estudo não permitem afirmar se a formação do tecido ósseo foi estimulada pela dissolução dos mesmos íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Si}^{+}$  que ocorre no BG45S5 sem participação dos íons Nb+ ou se houve há participação dos íons Nb na sinalização que desencadeou a diferenciação, proliferação e maturação dos osteoblastos. Não há estudos que analisaram os íons provenientes da dissolução de vidros bioativos contendo óxido de nióbio, como existe para o BG45S5<sup>52,53</sup> porém, Matsuno et al. 2001 analisando através de EPMA revelou não haver íons Nb ao redor do implante intramedular de um metal composto quase que puramente de nióbio, demonstrando a alta resistência a corrosão desse metal.

### **6.3 Angiogênese**

A análise de cortes transversais dos músculos contendo o vidro na forma de pó misturado a cola de fibrina marcados por técnica imunohistoquímica revelou que vários vasos sanguíneos estavam presentes na região do implante, principalmente na cápsula fibrosa que circundava os implantes, não havendo diferenças significativas entre os grupos, o que demonstra que os vidros com nióbio em sua composição, assim como o BG45S5 também são capazes de estimular a angiogênese.

A angiogênese é um processo essencial para formação e regeneração de qualquer tecido, pois é através dos novos vasos que o oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento, por exemplo, poderão chegar as células bem como resíduos provenientes do metabolismo celular serão removidos. Nesse contexto, é fundamental que implantes sejam capazes de permitir e/ou estimular a formação de vasos que vão ser responsáveis pelo sucesso a médio e longo prazo do enxerto. Diversos estudos relatam a capacidade pró-angiogênica do Bioglass 45S5 como constituinte de compósitos biodegradáveis, esponjas, e vidro-cerâmicas, bem como em estudos in vitro suplementando meios de cultura com os produtos iônicos da dissolução do vidro<sup>6,15,32,33</sup>.

Essa capacidade dos vidros bioativos é atribuída a uma possível interação dos íons provenientes da dissolução do vidro no fluido corpóreo, principalmente Si e Ca com receptores de membrana de uma série de células capazes de sintetizar e secretar fatores de crescimentos relacionados com a angiogênese (principalmente o VEGF). Os receptores específicos sensíveis a esses íons não são conhecidos, nem qual a influencia de cada um deles separadamente, no entanto, é fato que há um aumento de 200% na expressão do gene VEGF em osteoblastos quando expostos aos produtos da dissolução do Bioglass 45S5<sup>52</sup>. Uma avaliação qualitativa dos cortes transversos dos músculos contendo o implante permite se observar que há ampla marcação do VEGF por todo o corte em todos os grupos tanto após 2 quanto após 4 semanas de cirurgia, o que apenas nos permite hipotetizar que os vidros contendo óxido de nióbio assim como o BG45S5 estimularam a produção do VEGF por diversos tipos celulares<sup>52</sup> e que o VEGF juntamente com outros fatores (como a hipóxia) teria estimulado o brotamento de vasos a partir de vasos preexistentes nos tecido adjacente através da conversão de células endoteliais quiescentes em um fenótipo angiogênico pela ligação do VEGF com receptores transmembrânicos VEGF 1,2 e 3 com um domínio catalítico intracelular que ativa uma cascata de sinalização específica<sup>46</sup>.

Nos vidros contendo óxido de nióbio o mecanismo de indução da angiogênese deve ser o mesmo do BG45S5 uma vez que estudos mostram que esse íon tem baixíssima solubilidade logo, dificilmente deixa o material para se dissolver no fluido e então, não estaria diretamente relacionado com esse processo. De fato o presente estudo mostra que músculos implantados com qualquer um dos materiais apresentaram densidade de vasos semelhantes o que nos permite inferir que a adição no Nb na composição do Bioglass não comprometeu sua capacidade pró-angiogênica em nenhuma das concentrações estudadas, sendo assim, os benefícios provenientes dessa adição (mecânicas e bioativos) podem ser aproveitados sem perda dessa propriedade tão importante (pró-angiogênica).

O presente estudo apresenta resultados que indicam boa osteocondutividade, osteoindutividade e biocompatibilidade dos vidros contendo Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, principalmente ao se substituir 1,3% de peso total do P2O<sub>5</sub> por 1,3% de peso total do Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. No entanto, vários aspectos dos mecanismos pelos quais esses vidros estimulam a osteogênese ainda precisam ser esclarecidos, como quais os produtos da dissolução desses vidros, quais as moléculas

sinalizadoras estão envolvidas, quais as vias intracelulares ativas e como o material influencia o ciclo celular de osteoblastos expostos a ele.

## **7.0 CONCLUSÃO**

A substituição da 1,3 wt% do  $P_2O_5$  (formador de rede) por  $Nb_2O_5$  na rede do vidro (feita no BGPN1.3) destacou-se resultando no aumento da bioatividade do material, estimulando maior formação tanto de osso cortical quanto esponjoso, além disso, essa substituição não alterou significativamente o número de vasos sanguíneos na área de implante. Ademais, os vidros contendo nióbio apresentaram-se compatíveis com o tecido ósseo uma vez que a resposta inflamatória incitada pela sua presença foi praticamente nula, assim, em conjunto esses achados atestam que a adição de nióbio melhora a bioatividade do BG45S5 podendo assim ser usada como solução para a produção de implantes.

## REFERÊNCIAS:

1. **Bai Y, Yin G, Huang Z, et al.** Localized delivery of growth factors for angiogenesis and bone formation in tissue engineering. *Int Immunopharmacol.* 2013;16(2):214–223.
2. **Binyamin G, Shafi BM, Mery CM.** Biomaterials : A primer for surgeons. *Seminars in Pediatric Surgery.* 2006;15(4):276–283.
3. **Bosetti M, Boccafoschi F, Leigheb M, et al.** Effect of different growth factors on human osteoblasts activities: a possible application in bone regeneration for tissue engineering. *Biomol Eng.* 2007;24(6):613–608.
4. **Carlos A, Herrera A.** Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Nov Química.* 2010;33(6):1352–1358.
5. **Davies JE.** Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials.* 2007;28(1):5058–5067.
6. **Day RM.** Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue Engineering.* 2005;11(5):768–777.
7. **Denry I, Holloway J, Nakkula R, et al.** Effect of niobium content on the microstructure and thermal properties of fluorapatite glass-ceramics. *Appl Biomater.* 2005;75(B):18–24.
8. **Doremus RH.** *Glass Science.* 2th edition. Wiley, 1994. 339p.
9. **Dsouki NA, Lima MP de, Corazzini R, et al.** Cytotoxic , hematologic and histologic effects of niobium pentoxide in Swiss mice. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25(1):1301-1305.
10. **Elçin YM, Dixit V, Gitnick G.** Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing. 2001;25(7):558–565.
11. **Falavigna A, Neto OR, Antonio F, et al.** Fratura traumática de coluna torácica T1-T10. 2004;62(4):1095–1099.
12. **Ferrara N.** Vascular endothelial growth factor: Basic Science and clinical Progress. 2004;25(4):581–611.
13. **Ferrara N.** Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;280:1358-1366.

14. **Gamer LW, Tsuji K, Cox K, et al.** BMPR-II is dispensable for formation of the limb skeleton. *Genesis*. 2011;49(9):719–724.
15. **Gerhardt L-C, Widdows KL, Erol MM, et al.** The pro-angiogenic properties of multi-functional bioactive glass composite scaffolds. *Biomaterials*. 2011;32(17):4096–4108.
16. **Ghussn L, Prado MO, Russo DO, et al.** Crystallization of a niobium phosphate glass. *J Non Cryst Solids*. 2006;352(32-35):3391–3397.
17. **Golubkov VV, Dymshits OS, Zhilin AA, et al.** Crystallization of Glasses in the  $K_2O - Nb_2O_5 - SiO_2$  System. *Glas Phys Chem*. 2001;27(6):504–511.
18. **Cao W, Hench LL.** Bioactive Materials. *Ceramics International*. 1996; 22:493–507.
19. **Hench LL, Ethridge EC.** *Biomaterials: An interfacial approach*. New York: Academic Press; 1982.
20. **Hench LL, Polak JM, Xynos ID, Buttery LDK.** Bioactive materials to control cell cycle. 2000;3(1):313–323.
21. **Hench LL.** The story of Bioglass. *J Mater Sci: Mater Med*. 2006;17(1):967–978.
22. **Hollinger J, Kleinschmidt J.** The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. 1990;1(1):60–68.
23. **Horibe EK, Pereira MD, Ferreira LM, et al.** Perfil epidemiológico de fraturas mandibulares tratadas na universidade federal de são paulo – escola paulista de medicina. 2004;50(4):417–421.
24. **Hunter J.** The blood, inflammation, and Gun-shot wounds. JAMES WEBSTER; 1817.
25. **Jones JR.** Acta Biomaterialia Review of bioactive glass : From Hench to hybrids. *Acta Biomater*; 2013;9(1):4457–4486.
26. **Kalache A, et al.** O envelhecimento da população mundial. Um desafio novo. *Rev. Saúde públ.* 1987, 21:200-10.
27. **Karlinsey RL, Hara AT, Yi K, et al.** Bioactivity of novel self-assembled crystalline  $Nb_2O_5$  microstructures in simulated and human salivas. *Biomed Mater*. 2006;1:16–23.
28. **Kierszenbaum AL, Tres LL.** *Histologia e biologia celular- uma introdução a patologia*. 3ª edição. Elsevier Brasil, 2012. 720p.
29. **Kokubo T, Kim H, Kawashita M.** Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. 2003;24:2161–2175.

30. **Kushwaha M, Pan X, Holloway JA, et al.** Differentiation of human mesenchymal stem cells on niobium-doped fluorapatite glass-ceramics. *Dent Mater. The Academy of Dental Materials*; 2011;28(3):252–260.
31. **Lefebvre L, Chevalier J, Gremillard L, et al.** Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments. *Acta Mater.* 2007;55(10):3305–3313.
32. **Leu A, Stieger SM, Dayton P, et al.** Angiogenic Response to Bioactive Glass Promotes Bone Healing in an Irradiated Calvarial Defect. *Tissue Engineering.* 2009;15(4):877-885.
33. **Leu A, Leach JK.** Proangiogenic Potential of a Collagen/Bioactive Glass Substrate. 2008;25(5):1222–1229.
34. **Lima AL, Zumiotti AV, Uip DE, et al.** Fatores preditivos de infecção em pacientes com fraturas expostas nos membros inferiores. *Acta Ortopédica Bras.* 2004;12(1):32-39.
35. **Lima C, Silva I, Barros L, et al.** Resposta do tecido subcutâneo de camundongos à implantação de um novo biovidro à base de óxido de nióbio. *Rev Matéria.* 2011;574–582.
36. **Lopes JH, Magalhães A, Mazali I, et al.** Effect of niobium oxide on the structure and properties of melt-derived bioactive glasses. *Campinas*; 2014 p. 29.
37. **Mandarim-de-Lacerda CA.** Métodos quantitativos em morfologia. Rio de Janeiro: EDURJ, 1995. 131p.
38. **Mayr-Wohlfart U, Fiedler J, Gunther KP, et al.** Proliferation and differentiation rates of a human osteoblast-like cell line (SaOS-2) in contact with different bone substitutes materials. *J Biomed Mater Res* 2001;57:132–139.
39. **Matsuno H, Yokoyama A, Watari F, Uo M.** Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials.* 2001;22:1253–1262.
40. **Milner PI, Clegg PD, Stewart MC.** Stem cell – based therapies for bone repair. 2011;27:299–314.
41. **Miyazaki T.** Development of bioactive materials based on bone-bonding mechanism on metal oxides. *J Ceram Soc Japan.* 2008;116(2):260-264.
42. **Moore KL, Persaud TV, Torchia MG.** *Embriologia Clínica.* 9º ed. Elsevier Brasil, 2013. 560p.
43. **Moreira-gonzalez A, Loboeki C, Barakat K, et al.** Defects in Rabbits. Evaluation of 45S5 bioactive glass combined as a bone substitute in the reconstruction of critical size calvarial defects in rabbits. *J Craniofac Surg.* 2005;16(1):63-70.

44. **Nakamura H.** Morphology, Function, and Differentiation of Bone Cells. *J Hard Tissue Biol.* 2007;16(1):15–22.
45. **Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB.* 1999;13(1):9–22.
46. **Nomi M, Atala A, Coppi P, et al.** Principals of neovascularization for tissue engineering. 2002;23:463–483.
47. **Novak I, Ziolek M.** Niobium Compounds: Preparation, Characterization, and Application in Heterogeneous Catalysis. *Chem Rev.* 1999; 99:3603–3624.
48. **Olivares-Navarrete R, Olaya JJ, Ramírez C, et al.** Biocompatibility of Niobium Coatings. *Coatings.* 2011;1:72–87.
49. **Patrocínio LG, Patrocínio JA, Henrique B, et al.** Fratura de mandíbula: análise de 293 pacientes tratados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. 2005;71(5):560–565.
50. **Rahaman MN, Day DE, Bal BS, et al.** Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia.* 2011;7(6):2355–2373.
51. **Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP, editors.** Dynamics of Bone and Cartilage metabolism. Academic Press; 1999.
52. **Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, et al.** Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res.* 2000;55(2):151-157.
53. **Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, et al.** Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem and Biophys Res Com.* 2000;276:461–465.
54. **Wilson J, Pigott GH.** Toxicology and biocompatibility of bioglasses. *J Biom Mat Res.* 1981;15:805-817.

ANEXO:



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

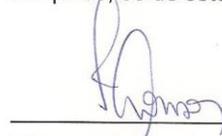
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Bioatividade de vidrocerâmicas compostas por nióbio: estudo experimental" (protocolo nº 2777-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Angelo Camilli / Lucas Pereira Lopes de Souza, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 05 de setembro de 2012.

Campinas, 05 de setembro de 2012.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>