

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA  
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-FACIAIS

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM CAVIDADES CIRURGICAMENTE  
CRIADAS EM FÊMUR DE RATO PREENCHIDAS COM DOIS BIOVIDROS COM  
DIFERENTES TAXAS DE PENTÓXIDO DE NIÓBIO**

ALESSANDRA CLÁUDIA JUNGES

Porto Alegre  
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA  
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-FACIAIS

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM CAVIDADES CIRURGICAMENTE  
CRIADAS EM FÊMUR DE RATO PREENCHIDAS COM DOIS BIOVIDROS COM  
DIFERENTES TAXAS DE PENTÓXIDO DE NIÓBIO**

ALESSANDRA CLÁUDIA JUNGES

LINHA DE PESQUISA:

Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia na Área de Concentração em Clínica Odontológica/Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Deise Ponzoni

Porto Alegre  
2015

### CIP - Catalogação na Publicação

Junges, Alessandra Cláudia  
Avaliação do reparo ósseo em cavidades  
cirurgicamente criadas em fêmur de rato preenchidas  
com dois biovidros com diferentes taxas de pentóxido  
de nióbio / Alessandra Cláudia Junges. -- 2015.  
35 f.

Orientador: Deise Ponzoni.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto  
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Substitutos ósseos. 2. Regeneração óssea. 3.  
Biomateriais. 4. Modelos animais. I. Ponzoni, Deise,  
orient. II. Título.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Cláudio e Juvilde, meu maior exemplo de amor, carinho, dedicação e cuidado.

Amo muito vocês.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, **Cláudio e Juilde**, por me apoiarem e darem suporte a todos os meus sonhos. Não há amor maior nesse mundo. Espero que eu consiga orgulhá-los em toda minha vida, pois vocês me orgulham todos os dias.

À minha orientadora **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Deise Ponzoni**, pela paciência e pelo tempo dedicado à minha orientação. Agradeço pelo comprometimento, responsabilidade e perfeição em todos os trabalhos realizados desde a Iniciação Científica, quando dei o primeiro passo na Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais.

Ao meu namorado, meu querido, meu melhor amigo, **Bruno Benetti**, por estar ao meu lado me incentivando sempre. Foi fundamental poder contar contigo.

Aos Professores **Carlos Eduardo Baraldi, Marcel Fasolo de Paris, Angelo Luiz Freddo, Adriana Corsetti** pelo conhecimento alegremente transmitido, por tornarem o ensino da Odontologia agradável.

À Professora **Fernanda Visioli** por ter aceitado nosso convite para colaborar nessa pesquisa. Agradeço por ter me recebido com tanto carinho, pela sua competência, por ser muito prestativa e querida.

À **Unidade de Experimentação Animal do HCPA**, em especial à Enfermeira **Marta Justina Giotti Cioat** e as Médicas Veterinárias **Fabíola Schons Meyer** e **Tuane Garcez** por estarem sempre dispostas a nos ajudar, pela dedicação e comprometimento com nossa pesquisa.

À **Unidade de Patologia Experimental do HCPA**, em especial à **Flávia Giusti**, por todo seu empenho para que tivéssemos um belo trabalho.

Ao **Laboratório de Materiais Dentários da UFRGS**, aos Professores **Vicente Castelo Branco Leitune** e **Fabício Mezzomo Collares**, pela formulação e desenvolvimento dos biovidros, por toda ajuda no decorrer da pesquisa.

Ao **InsCer da PUCRS**, em especial ao Biomédico **Samuel Greggio** e a Farmacêutica **Gianina Teribele Venturin**, pela calma e cuidado ao realizar a análise de micro-CT, pela dedicação para que a análise estivesse completa.

Ao **Laboratório Central de Microscopia e Microanálise da PUCRS**, em especial ao Técnico em Microscopia Eletrônica do LabCemm **Wagner Prates**, pela colaboração, disponibilidade e agilidade para conduzir a análise de MEV.

Ao **Guilherme Frainer** e a **Nathália Serpa**, pesquisadores do grupo de Zoologia da UFRGS, pela disponibilidade e auxílio na análise de imagens da microtomografia computadorizada.

Às alunas do curso de graduação em Odontologia da UFRGS, **Bruna Pires Porto**, **Bruna Mallmann** e **Cristina Comiotto** por toda a ajuda durante a fase experimental, por alegrarem essa fase tão importante da pesquisa. Quero que saibam que a colaboração e a disponibilidade de vocês foram essenciais para esse trabalho. Desejo-lhes muito sucesso e muita alegria.

Aos meus colegas de Mestrado, em especial **Caroline Comis Giongo**, **Eduardo Boero Daudt** e **Estevan Marçal da Silveira Stegues** pelo conhecimento compartilhado e pela amizade construída.

Ao Professor **Marcel Fasolo de Paris**, regente da Disciplina de Anestesiologia e Introdução à Exodontia, na qual realizei meu Estágio de Docência, bem como aos **alunos da ATO2017/2** que proporcionaram uma das melhores experiências que tive no Mestrado. Foi um prazer ter passado um semestre com vocês.

Ao **Programa de Pós-Graduação da UFRGS** pelo comprometimento de um ensino de excelência. Espero retribuir à sociedade o conhecimento adquirido.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** pelo apoio financeiro durante o Mestrado.

Ao **Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, pela viabilização desse trabalho.

## RESUMO

Substitutos ósseos são estudados com a finalidade de encontrar biomateriais que apresentem características semelhantes ao enxerto ósseo autógeno e que tenham facilidade para o seu uso. Em busca desses biomateriais, os vidros bioativos têm sido pesquisados demonstrando propriedades de osteoindução e osteocondução. Este estudo avalia o reparo ósseo associado ao emprego de vidros bioativos diferentes taxas de pentóxido de nióbio 3mol% e 10mol%, comparados ao enxerto ósseo autógeno. A amostra foi composta por 52 ratos aleatoriamente agrupados em quatro tempos experimentais (15, 30, 60, 90 dias pós-operatórios). Três cavidades cirúrgicas foram confeccionadas na diáfise femural direita, preenchidas randomicamente com o enxerto ósseo autógeno e as duas composições de vidros bioativos contendo pentóxido de nióbio. Avaliou-se através de análise histológica, microscopia eletrônica de varredura, microtomografia computadorizada e espectroscopia de micro-Raman. Os resultados mostraram reparo ósseo em estágio avançado pela análise histológica e diferenças significativas ( $P=0.0017$ ) entre o volume ósseo para o grupo de vidro bioativo composto por 3mol% de nióbio, evidência de incorporação dos biomateriais ao tecido ósseo neoformado pela análise de superfície e alta concentração de fosfato verificada em período precoce nos grupos de vidros bioativos. Tais achados mostraram que os vidros bioativos avaliados apresentaram propriedades de osteocondução e osteoindução.

Palavras-chave: Substitutos ósseos; Regeneração Óssea; Biomateriais; Modelos Animais.

## ABSTRACT

Bone substitutes are studied in order to find biomaterials that exhibit characteristics similar to autogenous bone graft and have easy to use. In pursuit of these biomaterials, bioactive glasses have been researched demonstrating osteoinductive and osteoconductive properties. This study evaluates bone healing associated with the use of bioactive glasses containing different rates of niobium pentoxide 3mol% and 10mol%, compared to autogenous bone graft. The sample consisted of 52 rats randomly grouped into four times (15, 30, 60, 90 postoperative days). Three surgical cavities were prepared in the right femoral shaft, randomly filled with autogenous bone graft and two compositions of bioactive glasses containing niobium pentoxide. It was evaluated by histological analysis, scanning electron microscopy, computed microtomography and micro-Raman spectroscopy. The results showed bone healing at an advanced stage by histological analysis and significant differences ( $P = 0.0017$ ) between bone volume to the bioactive glass group of 3mol% niobium, evidence of incorporation of biomaterials to the newly formed bone tissue for surface analysis and High concentration checked phosphate at an earlier period in the groups of bioactive glasses. These findings showed that the evaluated bioactive glasses showed osteoconductive and osteoinductive property.

Key words: Bone Substitutes; Bone Regeneration; Biocompatible Materials; Experimental Animal Models.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EOA	Enxerto ósseo autógeno
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
InsCer	Instituto do Cérebro da PUCRS
LabCemm	Laboratório Central de Microscopia e Microanálise
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Micro-CT	Microtomografia computadorizada
Nb10	Partículas de biovidros compostos por 10mol% de pentóxido de nióbio
Nb3	Partículas de biovidros compostos por 3mol% de pentóxido de nióbio
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## SUMÁRIO

1.	<b>ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....</b>	09
2.	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	14
2.1	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	14
3.	<b>ARTIGO.....</b>	15
4.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	32
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	33

## 1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

O enxerto ósseo é amplamente empregado em diferentes áreas da Odontologia e da Medicina. Dentre as finalidades, o mesmo é utilizado para recuperar deformidades pós-traumas, deficiências congênitas, perdas ósseas pós-cirúrgicas e reconstruções da estrutura maxilo-mandibular prévias à reabilitação implanto-suportada (CHAN et al., 2002; FINKEMEIER, 2002; PURICELLI et al., 2010). A literatura refere que, nos Estados Unidos, mais de quinhentos mil procedimentos ano estão relacionados ao emprego de enxerto ósseo (AXELRAD; KAKAR, EINHORN, 2007; VIRK et al., 2013).

O enxerto ósseo autógeno é considerado o padrão-ouro em diversos estudos que objetivam a reconstrução de estruturas perdidas (HOLLINGER et al., 1996). Apresenta como propriedades a osteogênese (capacidade de estimular formação óssea a partir dos osteoblastos), a osteoindução (ocorre quando as células primitivas são estimuladas a se transformar em células produtoras de tecido ósseo) e a osteocondução (capacidade de permitir o crescimento ósseo em sua superfície) (WILSON; LOW, 1992; ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001; CHAN et al., 2002; JUNIOR, 2003; FARDIN et al., 2010; GALIA et al., 2011).

Por outro lado, o enxerto ósseo autógeno apresenta como características maior morbidade cirúrgica, quantidade limitada e reabsorção imponderável. Essa última, condição influenciada pelo tipo de enxerto, pela sua origem embrionária e pelo sistema de fixação utilizado. (CHAN et al., 2002; LAURENCIN; KHAN, 2003; GIANNOUDIS; DINOPOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; GALIA et al., 2011).

A utilização de biomateriais representa uma alternativa diante da impossibilidade de emprego ou como forma de contornar as desvantagens apresentadas pelo enxerto ósseo autógeno (HOLLINGER et al., 1996; SCHWARTZ et al., 2008). São inúmeras as pesquisas envolvendo substitutos ósseos, especialmente no que se refere à sua capacidade de estimulação e condução do reparo ósseo (CORSETTI et al., 2008). Esses biomateriais devem apresentar características de biocompatibilidade, capacidade de integrar-se ao tecido a ser reparado; ser quimicamente inertes; manter a forma e apresentar comportamento preditivo ao longo do tempo (GREENBERG; SCHNEIDER, 2005). Dentre os materiais estudados estão as membranas biológicas, as hidroxiapatitas e os biovidros (FARDIN et al., 2010).

O primeiro vidro bioativo foi inventado por Larry Hench na Universidade da Flórida, em 1969. Até então, os materiais disponíveis, ditos bioinertes, não formavam uma superfície estável com os tecidos, sendo revestidos por cápsula fibrosa. Para contrapor esse problema,

Larry Hench desenvolveu um vidro degradável no sistema:  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ . A principal descoberta foi que esse composto, mais tarde chamado de biovidro 45S5, formou uma ligação com o osso tão forte que não podia ser removido sem quebrá-lo (HENCH et al., 1971).

O biovidro (Bioglass 45S5) tem como propriedades a osteocondução e a osteoprodução. A primeira propriedade permite neoformação óssea ao longo de sua superfície; a segunda ocorre quando uma superfície bioativa é colonizada por células osteogênicas, e, com isso agiliza o processo de reparo ósseo (JUNIOR, 2003; MACEDO, 2011).

Inúmeros são os estudos sobre biovidros. Obata et al. (2012) testou *in vitro* a incorporação de diferentes concentrações de pentóxido de nióbio aos vidros bioativos. Esse estudo sugere que biovidros associados a menores concentrações de pentóxido de nióbio favorecem a função dos osteoblastos e, com isso, aceleram o processo de reparo ósseo. Diversos autores incorporam substâncias aos vidros bioativos com a finalidade de melhorar as propriedades dos materiais. A tabela 1 resume alguns artigos exemplificando o material testado, o modelo animal, o número amostral, o período de estudo e as análises realizadas.

Schwartz et al. (2008) destaca que pequenas variações na composição do biomaterial podem levar a uma formação óssea diferenciada. Muitos são os estudos que avaliam a incorporação de outros materiais aos biovidros a fim de ampliar as propriedades já existentes e contornar possíveis desvantagens. Com esse intuito Chan et al. (2002) adicionou dextrano ao biovidro 45S5, que é de difícil manuseio quando usado em áreas extensas. Essa nova formulação proporcionou um material facilmente moldável e facilitou sua aplicação em áreas extensas. O autor demonstrou que a adição de dextrano não alterou o resultado de reparo ósseo e sugeriu estar diante de um potencial substituto para o enxerto ósseo autógeno.

O biovidro estudado por Tiomis et al. (2010) recebeu destaque por apresentar maior rapidez ao conduzir o processo de reparo ósseo, tal fato foi relacionado à sua propriedade osteocondutora.

Lima et al. (2011) estuda a incorporação de nióbio ao biovidro por meio da análise da biocompatibilidade do material em tecido subcutâneo de ratos. Através da análise histológica foi observada a presença de reação granulomatosa, do tipo corpo estranho, discreta com células gigantes. Os pesquisadores relatam como dificuldade do material a sua resistência à degradação e sugerem que a aplicação de um biovidro a base de nióbio ao tecido ósseo possa complementar sua avaliação.

No estudo de Yang et al. (2015) houve aplicação de um bioadesivo ao biovidro a fim de aprimorar as propriedades desse material. Analisou-se o comportamento de um defeito femural em coelho onde foi comparada a evolução do reparo ósseo sem biovidro, com biovidro e com diferentes composições do adesivo associado ao biovidro. Observou-se que o adesivo foi um agente osteogênico e promoveu a integração do substituto ósseo ao tecido neoformado, assim como estimulou a formação óssea.

O pentóxido de nióbio ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ) é empregado em composição de vários biomateriais (COVANI et al., 2007). Sua incorporação é uma alternativa para melhorar as propriedades dos vidros bioativos, pois é biocompatível, não citotóxico e osteoindutor (OBATA et al., 2012; KUSHWAHA et al., 2012; FOOLADI et al., 2013; LEITUNE et al., 2013). A presença de nióbio, de beta-tricálcio fosfato e de hidroxiapatita estão relacionadas ao aumento da atividade da fosfatase alcalina e da calcificação por osteoblastos (TAMAI et al., 2007).

A fim de contribuir para o desenvolvimento de substitutos ósseos que apresentem propriedades que se assemelham ao enxerto ósseo autógeno e superem as suas limitações, este estudo avalia o comportamento de dois biovidros compostos por diferentes composições de pentóxido de nióbio comparadas ao enxerto ósseo autógeno frente à estimulação do reparo ósseo *in vivo*, em um modelo experimental animal.

Tabela 1. Resumo de artigos que estudam biovidros.

Estudo/Ano	Biomaterial	Animal/ Defeito	N	Tempo pós- operatório	Análises/Principais resultados
CHAN et al. 2002	5 grupos 1- osso autógeno 2- biovidro 45S5 3- biovidro 45S5 + dextrano 4- biomaterial 2 + osso autógeno 5- biomaterial 3 + osso autógeno	Coelho/ Fêmur	48	2 dias; 1, 2, 3, 6 e 12 semanas	Histologia/ Adição de dextrano não apresentou efeitos adversos, contudo facilitou a manipulação do biovidro.
SCHWARTZ et al. 2008	12 grupos experimentais (controle, 5 grupos envolvendo PLGA, hidroxiapatita coralina, sulfato de cálcio, colágeno -hidroxiapatita - tricálcio fosfato, biovidro 45S5, hidroxiapatita bovina, matriz óssea desmineralizada	Ratos/ Tíbia	231	2, 4, 8 semanas	Histologia/ A matriz óssea desmineralizada mostrou ser uma das melhores opções de aplicação de enxerto ósseo.
TIOMIS et al. 2010	Biovidro particulado (Consul Bioglass – USBiomateriais)	Cães/ Mandíbula	28	8, 14, 21, 42, 60, 90 e 120 dias	Histologia/ Biovidro particulado é biocompatível e um substituto ósseo eficiente em cirurgias odontológicas que objetivam a regeneração do osso alveolar.
TIOMIS et al. 2011	Biovidro particulado (Consul Bioglass – USBiomateriais)	Cães/ Mandíbula	28	8, 14, 21, 42, 60, 90 e 120 dias	Clínica, Cirúrgica, Radiográfica/ Biovidro é biocompatível, tem efeito hemostático e as partículas apresentam tamanho adequado para o preenchimento de cavidades.
LIMA et al. 2011	Biovidro à base de óxido de nióbio e óxido fosforoso	Camundongos/ Subcutâneo	15	1, 3 e 9 semanas	Histologia, Microscopia eletrônica de varredura/ Biocompatível e não reabsorvível.
EL-MELIEGY et al. 2012	4 composições de biovidros (CaO-Na <sub>2</sub> O-K <sub>2</sub> O-MgO-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -SiO <sub>2</sub> -LiF-MgF <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub> )	- Ratos/ Fêmur	24	- 6 e 12 semanas	Testes <i>in vitro</i> Testes <i>in vivo</i> : histologia/ Biovidros com menos de 10mol% de Na <sub>2</sub> O e livre de K <sub>2</sub> O e Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> demonstraram bioatividade potencial <i>in vitro</i> e nova formação óssea <i>in vivo</i> . Biovidros com menor relação (SiO <sub>2</sub> +MgO)/(CaO+P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> +Na <sub>2</sub> O) mostraram maior bioatividade, enquanto biovidros com maior

					relação $(\text{SiO}_2+\text{MgO})/(\text{CaO}+\text{P}_2\text{O}_5+\text{Na}_2\text{O})$ mostraram menor bioatividade.
KIDO et al. 2013	Biosilicato	- Ratos/ Subcutâneo	65	- 7, 15, 30, 45 e 60 dias	Testes <i>in vitro</i> Testes <i>in vivo</i> : histologia/ Biocompatível e não citotóxico.
GABBAI- ARMELIN et al. 2015	Biovidro fibroso a base de $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-MgO-CaO-P}_2\text{O}_5$	- Ratos/ Tíbia	60	1, 7, 14 dias 15, 30, 60 dias	<i>In vitro</i> : Microscopia eletrônica de varredura <i>In vivo</i> : Histologia, Imunohistoquímica/ Degradação do material e substituição por tecido ósseo neoformado. Maior expressão de RUNX-2 no grupo de biomateriais nos tempos experimentais de 15 e 30 dias. Maior expressão de RANK-L no grupo de biomateriais nos tempos experimentais de 30 e 60 dias.
YANG et al. 2015	4 grupos: sem biovidro, biovidro, biovidro-2CS e biovidro-2CS-10BM	- Coelhos/ Fêmur	25	4 e 6 semanas	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i> : Histologia/ Biodesivo com potencial para uso como um agente biointegrante e osteogênico.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Este trabalho propõe-se a avaliar o processo de reparo ósseo em cavidades cirurgicamente criadas em fêmur de ratos. Os espécimes contendo os materiais (partículas de biovidros revestidas por diferentes taxas de pentóxido de nióbio) foram avaliados em diferentes tempos experimentais (15, 30, 60 e 90 dias). O enxerto ósseo autógeno foi utilizado como controle.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Realizar análise semi-quantitativa das lâminas histológicas pelo sistema de escores, por meio da comparação do processo de reparo ósseo entre os vidros bioativos (3mol% e 10mol%) e o enxerto ósseo autógeno.

Quantificar volume e densidade ósseos por meio de microtomografia computadorizada (micro-CT) e comparar os resultados entre os vidros bioativos (3mol% e 10mol%) e o enxerto ósseo autógeno.

Realizar a caracterização das partículas de biovidros compostas por pentóxido de nióbio (3mol% e 10mol%) pelos métodos de espectroscopia micro-Raman e microscopia eletrônica de varredura e comparar com o enxerto ósseo autógeno.

### **3. ARTIGO**

Esta dissertação será apresentada na forma de um artigo científico. Tal formato está de acordo com as regras estabelecidas no regimento do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Avaliação do reparo ósseo em cavidades cirurgicamente criadas em fêmur de rato contendo dois biovidros com diferentes taxas de pentóxido de nióbio.

Resumo: Substitutos ósseos são estudados com a finalidade de encontrar biomateriais que apresentem características semelhantes ao enxerto ósseo autógeno e que tenham facilidade para o seu uso. Em busca desses biomateriais, os vidros bioativos têm sido pesquisados demonstrando propriedades de osteoindução e osteocondução. Este estudo avalia o reparo ósseo associado ao emprego de vidros bioativos contendo diferentes taxas de pentóxido de nióbio 3mol% e 10mol%, comparados ao enxerto ósseo autógeno. A amostra foi composta por 52 ratos aleatoriamente agrupados em quatro tempos experimentais (15, 30, 60, 90 dias pós-operatórios). Três cavidades cirúrgicas foram confeccionadas na diáfise femural direita, preenchidas randomicamente com o enxerto ósseo autógeno e as duas composições de vidros bioativos com pentóxido de nióbio. Avaliou-se através de análise histológica, microscopia eletrônica de varredura, microtomografia computadorizada e espectroscopia de micro-Raman. Os resultados mostraram reparo ósseo em estágio avançado pela análise histológica e diferenças significativas ( $P=0.0017$ ) entre o volume ósseo para o grupo de vidro bioativo composto por 3mol% de nióbio, evidência de incorporação dos biomateriais ao tecido ósseo neoformado pela análise de superfície e alta concentração de fosfato verificada em período precoce nos grupos de vidros bioativos. Tais achados mostraram que os vidros bioativos avaliados apresentaram propriedades de osteocondução e osteoindução.

Palavras-chave: Substitutos ósseos; Regeneração Óssea; Biomateriais; Modelos Animais.

Key words: Bone Substitutes; Bone Regeneration; Biocompatible Materials; Experimental Animal Models.

### **Introdução:**

A pesquisa de biomateriais como substitutos ósseos busca materiais com propriedades que se assemelhem ao enxerto ósseo autógeno. Considerado o padrão-ouro, esse tipo de enxerto apresenta as propriedades de osteogênese, osteocondução e osteoindução. Em contrapartida, a sua utilização está associada a um maior tempo cirúrgico e maior morbidade<sup>1,2</sup>.

Dentre os biomateriais pesquisados estão os vidros bioativos, materiais que apresentam propriedades de osteocondução e osteoindução. A interação desse

biomaterial com os tecidos vivos ocorre por meio da liberação de íons, no momento da implantação do material, que desencadeiam uma série de reações que culminarão com a formação de uma camada superficial de apatita hidrocarbonada, análoga à fase mineral do tecido ósseo e que é capaz de estimular a deposição desse tecido e sua ligação entre o tecido vivo e o biomaterial<sup>3-5</sup>. Estudos também demonstram que a dissolução de íons, assim como a topografia dos vidros bioativos alteram a adsorção de proteínas e regulam a expressão de genes, modificando a expressão fenotípica de osteoblastos e sua proliferação, bem como a deposição de matriz extracelular<sup>3,6,7</sup>.

A bioatividade desse biomaterial depende de características associadas a sua produção, como a microestrutura e a composição química. A fundição é o método utilizado para a produção dos vidros como o 45S5® (vidro do sistema quaternário SiO<sub>2</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e os vidros do sistema CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub><sup>5,8,9</sup>. A incorporação do Pentóxido de Nióbio (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) representa uma alternativa para melhorar as propriedades dos vidros bioativos. Sua associação está relacionada à redução da citotoxicidade, à osteoindução e ao aumento da atividade da fosfatase alcalina<sup>9-12</sup>.

Estudos pré-clínicos têm sugerido efeitos benéficos do emprego de vidros bioativos. Entre eles maior rapidez no processo de reparo ósseo.

O objetivo desse estudo foi avaliar o reparo ósseo em cavidades criadas cirurgicamente no fêmur de ratos adultos preenchidas por vidros bioativos contendo duas composições de pentóxido de nióbio e por enxerto ósseo autógeno (EOA), baseado na análise histológica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microtomografia computadorizada (micro-CT) e espectroscopia de micro-Raman.

## **Materiais e Métodos:**

### **Animais**

A amostra foi composta por 52 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), com peso médio de 500g e seis meses de idade. Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos, com 13 animais em cada (o número amostral foi calculado através do software Winpepi versão 11.25, nível de significância de 5%, poder da amostra de 80%), de acordo com os tempos pós-operatórios de 15, 30, 60 e 90 dias. Todos os animais receberam ração comercial e água *ad libitum* ao longo do experimento. Foram alojados sob iluminação 12h claro / 12h escuro. Condições de temperatura e umidade em um ambiente de clima controlado.

### **Vidros Bioativos**

Os vidros bioativos do sistema  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O-Nb}_2\text{O}_5\text{-TiO}_2$  foram utilizados nesse estudo em duas composições: 3 mol% e 10 mol% de pentóxido de nióbio<sup>9</sup>. As partículas do biomaterial utilizadas apresentaram tamanho médio de 0,6mm, as mesmas ficaram retidas em uma peneira de mesh 30.

### **Protocolo Cirúrgico**

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina (50mg/kg) e cloridrato de xilazina (5mg/kg). A anestesia geral foi mantida com isoflurano 1-2V% vaporizado em oxigênio 100%. A área do fêmur direito foi preparada com solução de polivinilpirrolidona iodo 10%. Foi realizada uma incisão na pele de +-3cm, seguida da divulsão por planos dos tecidos. Com o auxílio de uma guia cirúrgica de titânio foram demarcadas as três cavidades com lápis grafite nº2. Três cavidades (2.0mm de diâmetro x 4.0mm) foram confeccionadas na diáfise femural direita, de proximal para distal, com broca trefina ativada por um motor em baixa rotação, sob irrigação constante, conforme protocolo de Puricelli et al<sup>21</sup>. O preenchimento das cavidades também foi randomizado: enxerto ósseo autógeno (EOA), vidro bioativo composto por 3mol% de pentóxido de nióbio (Nb3) e vidro bioativo composto por 10mol% de pentóxido de nióbio (Nb10). As partículas foram acomodadas nas cavidades com o auxílio de uma espátula até completar o preenchimento. A sutura foi realizada por planos com fio de poliglactina 910 5-0 e a pele com nylon 5-0 (Fig.1). Os animais receberam analgesia pós-operatória. Procedimentos perioperatórios foram realizados por um médico veterinário. Os autores realizaram as intervenções cirurgias.

### **Morte**

Após 15, 30, 60 e 90 dias, os animais foram mortos por sobredose anestésica de isoflurano até atingir o efeito de parada cardiorrespiratória, confirmada por veterinário. Em seguida foi realizada a remoção do fêmur direito, que foi fixado em formalina neutra tamponada 10%, por 48h, para conservação da peça.

### **Análise histológica**

As peças foram descalcificadas em ácido nítrico 5%, divididas ao meio longitudinalmente a fim de se alcançar o centro das cavidades, padronizando a altura

dos cortes. Após, foi realizado o processamento e a inclusão em parafina. Os cortes foram de 4µm de espessura e as lâminas foram coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). A análise semi-quantitativa foi realizada por uma patologista cega para as condições experimentais. O sistema de escore utilizado para cada cavidade cirúrgica criada foi: (1) reparo de até 30% da área do defeito ósseo; (2) reparo de 30 a 70% da área do defeito ósseo; (3) reparo de 70 a 100% da área do defeito ósseo, ausência de osso imaturo e obliteração cortical.

### **Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As peças foram fixadas, desidratadas e secas. Após, realizou-se o processo de metalização com ouro. Foram utilizadas quatro peças (uma de cada tempo: 15, 30, 60, 90 dias). O equipamento utilizado para a análise foi um microscópio eletrônico de varredura, modelo XL 30 – Philips, em uma tensão de 20 kV. Realizou-se uma análise descritiva por meio das imagens de superfície da amostra, usando o método de detecção de elétrons secundários (SE), em aumento de 100x.

### **Microtomografia computadorizada (micro-CT)**

Cinco animais do grupo experimental correspondentes ao tempo de 90 dias foram utilizados para as análises longitudinais (15, 30, 60 e 90 dias). Para a obtenção de imagens, os animais foram anestesiados com inalação de isoflurano (indução: 2,5-4%; manutenção: 1,5-2,5%). Os animais anestesiados foram colocados em posição supina. A duração do exame foi de 15 minutos em média, e o tempo total necessário desde a indução anestésica até o retorno à gaiola foi de 30 minutos.

O fêmur direito de cada animal foi posicionado no centro do campo de visão e escaneado pelo equipamento de Micro-CT Triumph II XOCT® (TriFoilImaging, Chatsworth, CA), observando os seguintes parâmetros de aquisição: voltagem no tubo de 80kVp, tamanho de ponto focal de 50µm, campo de visão de 80mm, binning 2x2 e tamanho de imagem de 1184x1120, ampliação 1.6x, número de projeção foi de 512. As imagens foram reconstruídas através de um software Triumph XOCT® (TriFoilImaging, Chatsworth, CA) em todas as dimensões espaciais.

A análise do comportamento dos biomateriais foi baseada a partir das sequências de imagens de micro-CT obtidas com espaçamento de 0,160mm de espessura entre elas no formato DICOM nos três planos (sagital, coronal e transversal) ao longo do eixo axial dos indivíduos (0,160 pixel size). As imagens foram processadas no software

Mimics© para a identificação e renderização das estruturas em 3D, bem como para a tomada de medidas de volume e densidade (Hounsfield units, HU). HUs são correlacionadas com as propriedades de densidade e os valores de volume são diretamente comparáveis em imagens no formato DICOM.

### **Espectroscopia de micro-Raman:**

Foram utilizados quatro animais do grupo experimental, sendo um de cada tempo pós-operatório. Espectroscopia micro-Raman foi realizada utilizando um microscópio de Raman SENTERRA (BrukerOptics, Ettlingen, Alemanha). As amostras foram analisadas utilizando os seguintes parâmetros de micro-Raman: 10mW diodo laser com comprimento de onda de 785nm e uma resolução espectral de  $\sim 3,5\text{cm}^{-1}$ . Mapeamento bi-dimensional foi realizado ao longo de um  $5\mu\text{m}$  por  $37\mu\text{m}$  em toda a área em intervalos de  $50\mu\text{m}$  utilizando etapas XYZ computadorizadas. Estas áreas cobertas do osso e biomaterial foram visualizadas e focadas em aumento de 500x. Tempo de acumulação por espectro foi de quatro segundos com quatro co-adições. As amostras foram mantidas úmidas em todo o processo experimental. Pós-processamento foi realizado em Opus7.2 (Bruker Optics) e consistiu em análise com a modelagem, que distinguiu os componentes espectrais do osso e do biomaterial. Os picos correspondentes de fosfato e amida II foram usados para a integração. Para a hidroxiapatita, foi usado  $960\text{cm}^{-1}$ , e para amida II, utilizou-se  $1450\text{cm}^{-1}$ .

### **Análise Estatística**

A análise estatística foi aplicada aos resultados da microtomografia computadorizada, utilizando o software SAS Enterprise Guide versão 6.1. Para a análise de densidade e volume foi realizada ANOVA (análise de variância) de medidas repetidas e teste de comparação de médias Tukey ao nível de significância de 5%.

### **Resultados**

#### ***Histologia:***

A análise histológica está representada na figura 2 que ilustra a evolução do reparo ósseo ao longo dos tempos experimentais. Realizou-se avaliação semi-quantitativa pelo sistema de escores descrito na tabela 3. Aos 15 dias pós-operatórios, o reparo estava mais avançado (escore 2 e 3) nos defeitos preenchidos com EOA e Nb3 quando comparados às cavidades preenchidas por Nb10 (escore 1). A partir dos 30 dias

pós-operatórios todas as cavidades encontravam-se em estágios avançados de reparo ósseo (escore 2 e 3). Aos 60 dias pós-operatórios todas as cavidades preenchidas por EOA apresentavam-se em estágio avançado de reparo (escore 3). Aos 90 dias pós-operatórios todas as cavidades, independente do preenchimento não demonstraram diferenças no reparo ósseo (escore 3).

#### ***MEV:***

Realizou-se análise de superfície da amostra pela MEV, ilustrada pela figura 3, de acordo com o preenchimento e os tempos experimentais. Nos grupos preenchidos por Nb3 e Nb10 observou-se que há necessidade de um tempo maior para que o osso neoformado envolva as partículas de biovidros quando comparados ao EOA, não sendo observadas diferenças entre Nb3 e Nb10 ao longo dos tempos experimentais.

#### ***Micro-CT:***

Para a análise de micro-CT (figura 4) a representação da imagem dos vidros bioativos e do EOA foi isolada da imagem do fêmur com a finalidade de avaliação da densidade e do volume de preenchimento das cavidades. Com relação a densidade (tabela 1) não foram observadas diferenças significativas entre Nb3 e Nb10 ( $P=0.1382$ ) ao longo dos períodos experimentais. Houve diferenças entre o EOA com o Nb3 e Nb10 ( $P<0,0001$ ). Foram observadas diferenças de volume do preenchimento das cavidades ao longo dos tempos experimentais. O volume das cavidades preenchidas com EOA diminuiu ao longo do tempo quando comparado ao Nb3 e Nb10 (tabela 2). O volume das cavidades preenchidas com Nb3 exibiu diferenças significativas quando comparado ao EOA já no período de 15 dias pós-operatórios ( $P=0.0017$ ).

#### ***Espectroscopia de micro-Raman:***

A espectroscopia de micro-Raman gerou gráficos de cores (figura 5), as quais representam a concentração de fosfato. A maior concentração é representada pela cor vermelha e a menor concentração pelas variações da cor azul. A figura 5A refere-se ao grupo EOA que apresentou maior concentração de fosfato aos 90 dias. O grupo Nb3 ilustrado pela figura 5B representa a maior concentração de fosfato aos 30 dias que segue pelos 60 e 90 dias. No grupo do Nb10 (figura 5C) sugere-se maior concentração nos 60 e 90 dias.

## Discussão

Os vidros bioativos utilizados nessa pesquisa foram incorporados pelo tecido ósseo e não substituídos, essa situação foi verificada por meio da análise de microscopia eletrônica de varredura claramente visualizada aos 90 dias (figura 3). Tal condição deve-se possivelmente ao método de preparo do material que se dá através de fundição<sup>4</sup>, ao contrário do que é referido por diversos autores que demonstram a reabsorção do biomaterial e a substituição por tecido ósseo<sup>1,13</sup>.

Diferentes substâncias têm sido incorporadas aos vidros bioativos com objetivo de melhorar as propriedades de manipulação<sup>1</sup> e biocompatibilidade<sup>16</sup>. O emprego de óxido de nióbio associado ao biovidro foi testado por Lima et al<sup>16</sup>, porém em aplicação em subcutâneo de ratos. A incorporação do pentóxido de nióbio aos materiais nessa pesquisa favoreceu a bioatividade, especialmente na concentração de 3mol%. De acordo com Obata et al<sup>9</sup> vidros bioativos com menor quantidade de nióbio favorecem a função dos osteoblastos, acelerando o reparo ósseo. Tal achado pode ser observado pela avaliação histológica, onde 22,22% das cavidades preenchidas por Nb3 correspondiam ao escore 3 de reparo ósseo, bem como pela espectroscopia de micro-Raman na qual desde os 30 dias pós-operatórios observa-se alta concentração de fosfato. A concentração de 10mol% de pentóxido de nióbio não favoreceu o processo de reparo quando comparado ao padrão-ouro.

As dificuldades de processamento das amostras para avaliação histológica estão associadas ao fato de que os vidros bioativos não sofreram descalcificação<sup>16</sup>. Apesar dessas dificuldades, a análise histológica permanece sendo o método mais empregado para avaliação de reparo ósseo<sup>1,13,14,16-20</sup>. A microscopia eletrônica de varredura realizada através da metalização com ouro inviabilizou a análise de composição química, pois o ouro e o nióbio apresentam pesos atômicos semelhantes. Essa metodologia de análise permitiu a observação da incorporação dos biovidros e do enxerto ósseo autógeno com a estrutura óssea adjacente através da avaliação de superfície.

A espectroscopia de micro-Raman demonstrou maior concentração de fosfato a partir dos 30 dias para Nb3 e dos 60 dias para Nb10 quando comparados ao enxerto ósseo autógeno, sugerindo que essa concentração possa estar associada à aceleração da formação de hidroxiapatita e conseqüente reparo ósseo<sup>22</sup>. A análise longitudinal realizada através da micro-CT permitiu o estudo *in vivo* da evolução temporal no mesmo animal, da incorporação dos biomateriais e do enxerto ósseo autógeno, além de

permitir as medidas de densidade e volume associadas aos preenchimentos das cavidades<sup>23,24</sup>. Apesar das variações de volume observadas nas cavidades preenchidas por vidros bioativos ao longo dos períodos experimentais, Nb3 e Nb10 apresentam resultados superiores quando comparados ao padrão ouro (EOA).

A quantidade ilimitada de biomaterial disponível e a ausência de segundo sítio cirúrgico<sup>25,26</sup> facilitaram a execução do experimento. O tamanho das partículas dos vidros bioativos compostos por pentóxido de nióbio (3mol% e 10 mol%) favoreceram o manuseio e a acomodação nas cavidades de pequeno volume. Não houve extravasamento do material fora das cavidades cirurgicamente criadas. As características do biomaterial ofereceram condições adequadas para a esterilização em peróxido de hidrogênio e armazenamento, fatores já destacados por Corsetti et al.<sup>27</sup>.

A pesquisa seguiu os padrões atuais que orientam a pesquisa utilizando modelos animais: randomização, cegamento, cálculo amostral e grupos de comparação. O rato foi escolhido como modelo animal por vários autores que pesquisam vidros bioativos<sup>13,17-19</sup>. Por apresentar pequeno porte facilitou o manuseio, apresentou custo acessível e possibilitou a realização de diferentes análises, inclusive a análise longitudinal por microtomografia computadorizada. O fêmur ofereceu condições ideais para confecção de três cavidades cirurgicamente criadas. Permitiu a comparação na mesma estrutura dos biomateriais com enxerto ósseo autógeno. Não foram observadas fraturas nessa estrutura óssea.

As diferentes metodologias de análise empregadas nessa pesquisa permitem concluir que os vidros bioativos compostos por pentóxido de nióbio (3mol% e 10mol%) apresentam propriedades de osteoindução e osteocondução. Estudos pré-clínicos ainda são necessários para avaliação criteriosa e aperfeiçoamento desses biomateriais proporcionando resultados seguros que possibilitem a sua aplicação clínica. Os resultados obtidos nesse estudo são positivos e incentivam a continuidade de pesquisas avaliando os vidros bioativos e o reparo ósseo.

#### **Financiamento:**

Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Educação (Brasil).

#### **Conflito de interesses:** Não

### **Aprovação Ética:**

Esse estudo foi aprovado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (GPPG/HCPA) pelo Comitê de Ética Experimental com o número 14-0360. Todos os procedimentos do estudo foram conduzidos de acordo com os Princípios Éticos Brasileiros de Pesquisa Experimental Animal, conforme estabelecido pela Lei 11794 de 8 Outubro de 2008 (Ato Arouca), e pelos Princípios Éticos de Pesquisa Experimental descritos pelo Laboratório de Ciência Animal (antigo Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais). Foram feitos todos os esforços para minimizar o sofrimento dos animais ao longo das experiências, bem como para usar apenas o número de animais que era essencial para a produção de dados científicos confiáveis.

**Agradecimentos:** Agradecemos às Médicas Veterinárias Fabíola Schons Meyer e Tuane Garcez, Enfermeira Marta Justina Giotti Cioato (HCPA-UFRGS); Samuel Greggio e Gianina Venturim (InsCer-PUCRS); Wagner Prates (LabCEMM-PUCRS); Guilherme Frainer e Nathália Serpa (Ceclimar-UFRGS); estudantes de Odontologia Bruna Pires Porto, Bruna Mallmann e Cristina Comiotto (UFRGS).

### **Referências:**

1. CHAN C, THOMPSON I, ROBINSON P, WILSON J, HENCH L. Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2002; **31**: 73–77.
2. LAURENCIN CT, KHAN Y. Bone grafts and bone graft substitutes: a brief history. In: Laurencin CT, editor. Bone graft substitutes. Bridgeport, NY: *ASTM International*; 2003.
3. HENCH LL, THOMPSON, I. Twenty-first century challenges for biomaterials. *J. R. Soc. Interface.* 2010; **7**: S379–S391.
4. ARCOS D, VALLET-REGI M. Sol–gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia.* 2010; **6** (8): 2874–2888.
5. GROH D, DOHLER F, BRAUER DS. Bioactive glasses with improved processing. Part 1. Thermal properties, ion release and apatite formation. *Acta Biomaterialia.* 2014; **10**(10): 4465–4473.
6. TSIGKOU O, JONES JR, POLAK JM, STEVENS MM. Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass conditioned

medium in the absence of osteogenic supplements. *Biomaterials*. 2009; **30** (21): 3542-3550.

7. LIN K, ZHOU Y, ZHOU Y, QU H, CHEN F, ZHU Y, CHANG J. Biomimetic hydroxyapatite porous microspheres with co-substituted essential trace elements: surfactant-free hydrothermal synthesis, enhanced degradation and drug release. *J Mater Chem*. 2011a; **21**: 16558-16565.

8. HENCH LL, SPLINTER RJ, ALLEN WC, GREENLEE TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res Symp*. 1971; **334**: 117-141.

9. OBATA A, TAKAHASHI Y, MIYAJIMA T, UEDA K, NARUSHIMA T, KASUGA T. Effects of Niobium Ions Released from Calcium Phosphate Invert Glasses Containing Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> on Osteoblast-Like Cell Function. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2012; **4** (10): 5684–5690.

10. KUSHWAHA M, PAN X, HOLLOWAY JA, DENRY IL. Differentiation of human mesenchymal stem cells on niobium-doped fluorapatite glass-ceramics. *Dent Mater*. 2012; **28** (3): 252-260.

11. FOOLADI AAI, HOSSEINI HM, HAFEZI F, HOSSEINNEJAD F, NOURANI MR. Sol-gel-derived bioactive glass containing SiO<sub>2</sub>-MgO-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> as an antibacterial scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research A*. 2013; **101A** (6): 1582-1587.

12. LEITUNE VCB, COLLARES FM, TAKIMI A, LIMA GB, PETZHOLD CL, BERGMANN CP, SAMUEL SMW. Niobium pentoxide as a novel filler for dental adhesive resin. *Journal of Dentistry*. 2013; **41** (2): 106-113.

13. SCHWARTZ Z, DOUKARSKY-MARX T, NASATZKY E, GOULTSCHIN J, RANLY DM, GREENSPAN DC, SELA J, BOYAN BD. Differential effects of bone graft substitutes on regeneration of bone marrow. *Clin. Oral Impl. Res*. 2008; **19** (12): 1233–1245.

14. TIOMIS AC, BORGES APB, DALBERT APF, DUARTE TS, PONTES KCS, CARVALHO TB, CARLO-REIS EC. Avaliação histológica do biovidro particulado na reparação de defeito experimental em mandíbula de cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 2010; **62** (1): 80-85.

15. TIOMIS AC, BORGES APB, DAIBERT APF, DUARTE TS, CARLO-REIS EC, CARVALHO TB. Particulate bioglass in the regeneration of alveolar bone in dogs: clinical, surgical and radiographic evaluations. *Rev. Ceres, Viçosa* 2011; **58** (2): 149-154.

16. LIMA CJ, DA SILVA IIC, DE BARROS LFH, GRANJEIRO JM, DA SILVA MHP. Resposta do tecido subcutâneo de camundongos à implantação de um novo biovidro à base de óxido de nióbio. *Revista Matéria* 2011; **16**(1): 574 – 582.

17. EL-MELIEGY E, HAMZAWY EMA, EL-KADY AM, SALAMA A, EL-RASHEDI A. Development and bioactivity evaluation of bioglasses with low Na<sub>2</sub>O content based on the system Na<sub>2</sub>O–CaO–MgO–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>–SiO<sub>2</sub>. *J Mater Sci: Mater Med*. 2012; **23**: 2069–2080.
18. KIDO HW, OLIVEIRA P, PARIZOTTO NA, CROVACE MC, ZANOTTO ED, PEITL-FILHO O, FERNANDES KPS, MESQUITA-FERRARI RA, RIBEIRO DA, RENNO ACM. Histopathological, cytotoxicity and genotoxicity evaluation of Biosilicate® glass–ceramic scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research A*. 2013; **101A** (3): 667-673.
19. GABBAI-ARMELIN PR, SOUZA MT, KIDO HW, TIM CR, BOSSINI OS, AGRAMP, FERNANDES KR, PASTOR FAC, ZANOTTO ED, PARIZOTTO NA, PEITL O, RENNO ACM. Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. *J Mater Sci: Mater Med*. 2015; **26**:177.
20. YANG S, GUO Q, SHORES LS, ALY A, RAMAKRISHNAN M, KIM GH, LU Q, SU L, ELISSEEFF JH. Use of a chondroitin sulfate bioadhesive to enhance integration of bioglass particles for repairing critical-size bone defects. *Journal Of Biomedical Materials Research A*. 2015; **103A** (1): 235-242.
21. PURICELLI E, CORSETTI A, PONZONI D, MARTINS GL, LEITE MG, SANTOS LA. Characterization of bone repair in rat femur after treatment with calciumphosphate cement and autogenous bone graft. *Head &Face Medicine*.2010; **6** (10): 1-8.
22. OLSZTA MJ, CHENG X, JEE SS, KUMAR R, KIM YY, KAUFMAN MJ, DOUGLAS EP, GOWER LB. Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering R*. 2007; **58**: 77–116.
23. DE CLERCK NM, MEURRENS K, WEILER H, DYCK DV, VANHOUTTE G, TERPSTRA P, POSTNOV AA. High-Resolution X-ray Microtomography for the Detection of Lung Tumors in Living Mice. *Neoplasia*. 2004; **6**(4): 374–379.
24. WAARSING JH, DAY JS, VAN DER LINDEN JC, EDERVEEN AG, SPANJERS C, DE CLERCK N, SASOV A, VERHAAR JAN, WEINANS H. Detecting and tracking local changes in the tibiae of individual rats: a novel method to analyse longitudinal in vivo micro-CT data. *Bone*. 2004; **34**(1): 163 – 169
25. FARDIN AC, JARDIMECG, PEREIRA FC, GUSKUMA MH, ARANEGA AM, JÚNIOR IGJ. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. *Innov Implant J, Biomater Esthet*. 2010; **5** (3): 48-52.
26. GREENBERG, B. M.; SCHNEIDER, S. J. Alloplastic reconstruction of large cranio orbital defects: a comparative evaluation. *Ann Plast Surg*.2005; **55** (1): 43-51.
27. CORSETTI, A. et al. Avaliação da presença de microorganismos aeróbios em blocos de cimento fosfato de cálcio submetidos a três técnicas de esterilização. *Revistada Faculdade de Odontologia de Passo Fundo*. 2008; **13** (2): 27-32.

Tabela 1. Análise de micro-CT - Comparação das médias de densidades (Hounsfield units - HU) dos preenchimentos.

Preenchimento das cavidades	Média	DP
Nb10	2722.22 HU <sup>a</sup>	42,3557
Nb3	2598.25 HU <sup>a</sup>	42,3557
EOA	1752.35 HU <sup>b</sup>	43,7393

<sup>ab</sup>: Diferentes letras indicam diferença significativa. ANOVA de medidas repetidas, seguida pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de significância.

DP: Desvio-Padrão

EOA: enxerto ósseo autógeno

Nb3: partículas de biovidros compostas por 3mol% de pentóxido de nióbio

Nb10: partículas de biovidros compostas por 10mol% de pentóxido de nióbio

Tabela 2. Análise de micro-CT - Comparação das médias de volume (mm<sup>3</sup>) dos preenchimentos ao longo do tempo.

Preenchimento das cavidades	15dias	DP	30 dias	DP	60 dias	DP	90 dias	DP
Nb10	8,2 <sup>ab</sup>	0,8915	9,51 <sup>a</sup>	0,8453	10,02 <sup>a</sup>	1,0022	9,75 <sup>a</sup>	1,1906
Nb3	11,1 <sup>a</sup>	0,8915	9,22 <sup>a</sup>	0,8453	9,98 <sup>a</sup>	1,0022	8,15 <sup>ab</sup>	1,1906
EOA	3,33 <sup>b</sup>	0,8915	2,19 <sup>b</sup>	0,8453	1,39 <sup>b</sup>	1,0335	1,26 <sup>b</sup>	1,2704

<sup>a b</sup>: Diferentes letras indicam diferença significativa por ANOVA de medidas repetidas, seguida pelo teste de comparação de médias de Tukey a 5% de significância.

DP: Desvio-Padrão

EOA: enxerto ósseo autógeno

Nb3: partículas de biovidros compostas por 3mol% de pentóxido de nióbio

Nb10: partículas de biovidros compostas por 10mol% de pentóxido de nióbio

Tabela 3. Resultado da análise semi-quantitativa realizada por escores.

		Escore 1 (até 30%)		Escore 2 (30-70%)		Escore 3 (70-100%)		Perdas
		n	%	n	%	n	%	
<b>15 dias</b>	EOA	2	28,57	5	71,42	0	0	3
	Nb3	3	33,33	4	44,44	2	22,22	1
	Nb10	4	44,44	5	55,55	0	0	1
<b>30 dias</b>	EOA	0	0	3	37,5	5	62,5	2
	Nb3	0	0	5	55,55	4	44,44	1
	Nb10	0	0	7	77,77	2	22,22	1
<b>60 dias</b>	EOA	0	0	0	0	9	100	1
	Nb3	0	0	2	25	6	75	2
	Nb10	0	0	2	22,22	7	77	1
<b>90 dias</b>	EOA	0	0	0	0	8	100	2
	Nb3	0	0	0	0	9	100	1
	Nb10	0	0	0	0	6	100	4

Notas: n: número de cavidades

EOA: enxerto ósseo autógeno

Nb3: partículas de biovidros compostas por 3mol% de pentóxido de nióbio

Nb10: partículas de biovidros compostas por 10mol% de pentóxido de nióbio

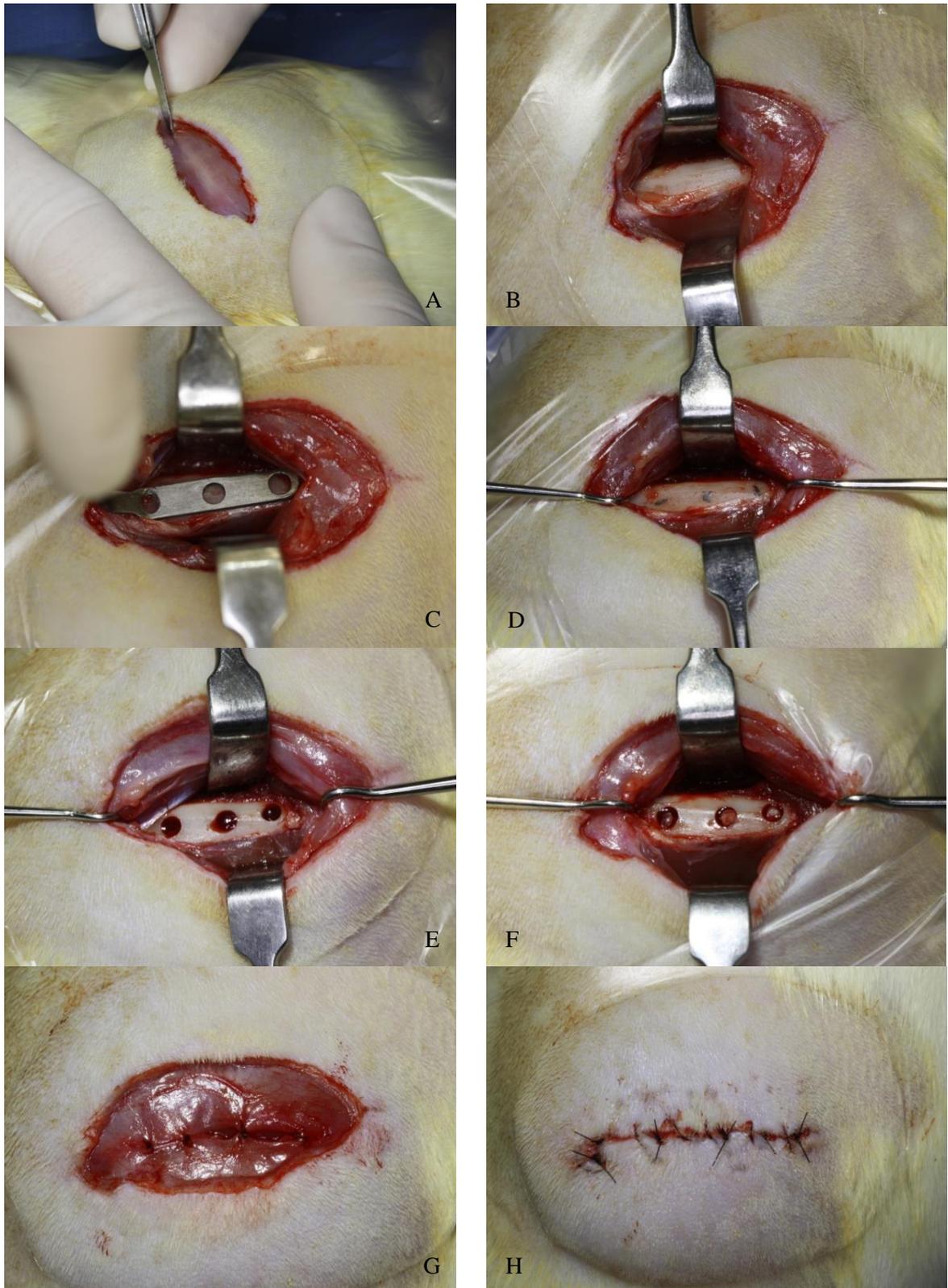


Fig. 1. Sequência de procedimentos cirúrgicos. (A) Incisão em pele; (B) Divulsão dos tecidos por planos musculares e acesso a superfície cortical do fêmur direito; (C) Posicionamento de guia para marcação das cavidades; (D) Marcação das cavidades com lápis; (E) Cavidades realizadas com trefina ativada por motor elétrico em baixa rotação; (F) Cavidades preenchidas pelos dois biomateriais (Nb3 e Nb10) e EOA; (G) Sutura por planos com fio de poliglactina 910 5-0; (H) Sutura em pele com fio mononylon 5-0.

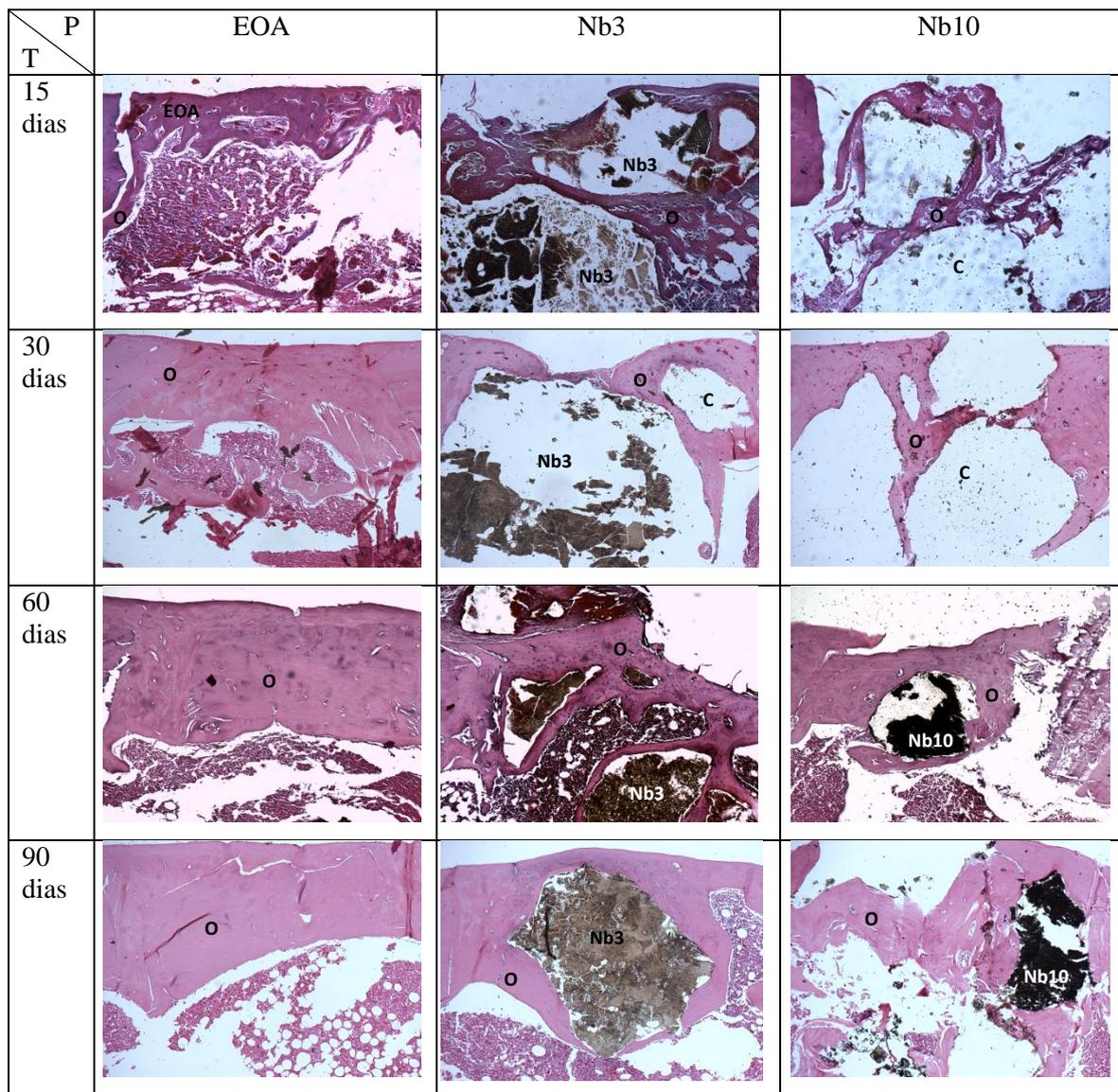


Fig.2. Imagens histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE), em aumento de 8x, de acordo com o tempo experimental e o preenchimento das cavidades.

Nota: EOA: enxerto ósseo autógeno

Nb3: partículas de biovidros compostas por 3mol% de pentóxido de nióbio

Nb10: partículas de biovidros compostas por 10mol% de pentóxido de nióbio

O: osso neoformado

C: cavidade onde havia biomaterial

P: preenchimento

T: tempo

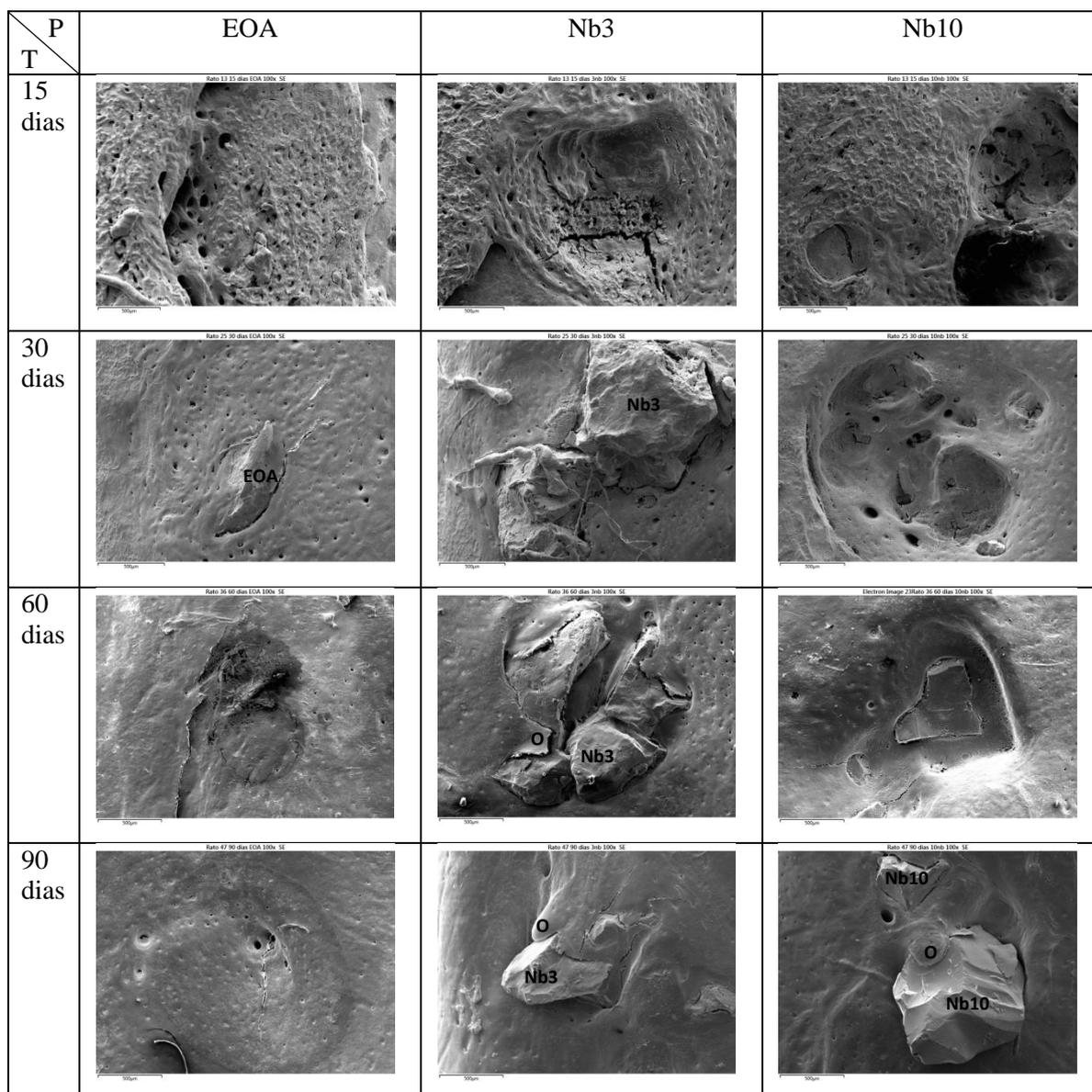


Fig. 3. MEV- análise qualitativa da superfície do osso, método de detecção de elétrons secundários (SE) de acordo com o tempo experimental e o método de preenchimento das cavidades. Aumento de 100x.

Nota: EOA: enxerto ósseo autógeno

Nb3: partículas de biovidros compostas por 3mol% de pentóxido de nióbio

Nb10: partículas de biovidros compostas por 10mol% de pentóxido de nióbio

O: osso neoformado

P: preenchimento

T: tempo

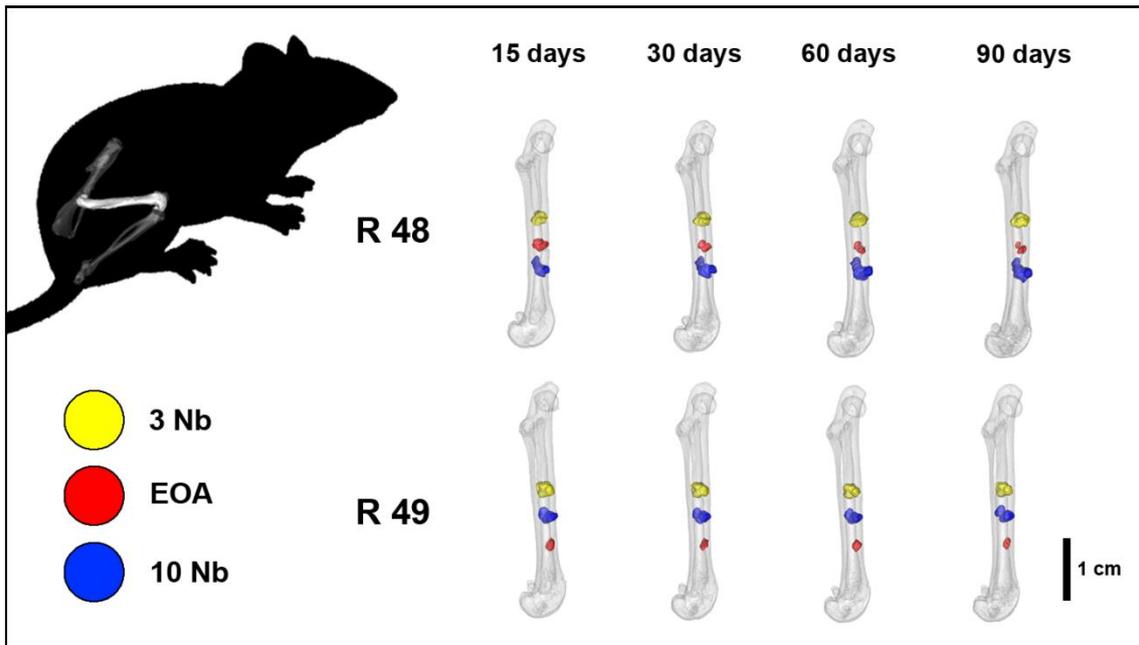


Fig. 4. Representação em 2D da reconstrução volumétrica dos preenchimentos das cavidades em dois animais de acordo com a evolução temporal. As cores amarela, azul e vermelha representam respectivamente o preenchimento com Nb3, Nb10, EOA.

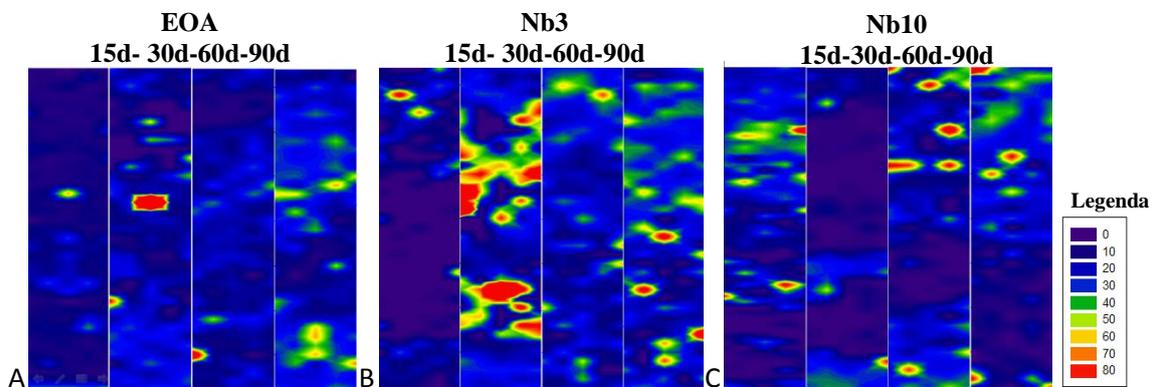


Fig. 5. Representação dos resultados de espectroscopia de micro-Raman. (A) Cavidades preenchidas por EOA; (B) cavidades preenchidas por Nb3; (C) cavidades preenchidas por Nb10.

Nota: EOA: enxerto ósseo autógeno

Nb3: partículas de biovidros compostas por 3mol% de pentóxido de nióbio

Nb10: partículas de biovidros compostas por 10mol% de pentóxido de nióbio

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Diversos são os grupos que pesquisam diferentes composições e materiais agregados aos vidros bioativos no intuito de melhorar suas propriedades. A tabela 1 sintetizou algumas dessas pesquisas, demonstrando que diferentes protocolos, tempos, modelos experimentais e áreas de implantação são estudadas.

Nesta pesquisa os vidros bioativos estudados não sofreram degradação, característica que está presente em outros biomateriais. Tal situação não foi prejudicial à evolução do reparo ósseo. Os biomateriais empregados, por não sofrerem descalcificação, influenciaram a qualidade do material obtido para a análise histológica em muitas das amostras. Contudo, nas peças que permitiram a realização dos cortes, nos diferentes grupos e tempos experimentais, foi observada a bioatividade, além da capacidade de osteoindução e osteocondução desses biomateriais, caracterizada pela formação de tecido ósseo envolvendo as partículas e ausência de resposta inflamatória. A análise de microscopia eletrônica de varredura também permitiu a visualização de tecido ósseo envolvendo as partículas ao longo do processo de reparo. Destaca-se que as cavidades preenchidas por partículas de vidros bioativos compostas por pentóxido de nióbio 3mol% apresentaram, na análise histológica e espectroscopia de micro-Raman, melhores propriedades do que àquelas cavidades preenchidas por partículas de vidros bioativos compostas por pentóxido de nióbio 10mol%.

## REFERÊNCIAS

- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J**, Heidelberg, v.10, no.2, p. 96-101, Oct. 2001.
- ARCOS, D.; VALLET-REGI, M. Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, Kidlington, v. 6, no. 8, p. 2874-2888, Aug. 2010.
- AXELRAD, T.W.; KAKAR, S.; EINHORN, T.A. New technologies for the enhancement of skeletal repair. **Injury**, Bristol, v.38, no. suppl 1, p. S49-62, Mar. 2007.
- CHAN, C. et al. Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 31, no. 1, p. 73-77, Feb. 2002.
- CORSETTI, A. et al. Avaliação da presença de microorganismos aeróbios em blocos de cimento fosfato de cálcio submetidos a três técnicas de esterilização. **Revista da Faculdade de Odontologia de Passo Fundo**, v.13, no.2, p.27-32, Maio-Agosto 2008.
- COVANI, U. et al. Biomaterials for orthopedics: A roughness analysis by atomic force microscopy. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Hoboken, v. 82A. no.3, p.723-730, Sep. 2007.
- DE CLERCK, N.M. et al. High-Resolution X-ray Microtomography for the Detection of Lung Tumors in Living Mice. **Neoplasia**, New York, v. 6, no. 4, p. 374-379, Jul-Aug. 2004.
- EL-MELIEGY E. et al. Development and bioactivity evaluation of bioglasses with low Na<sub>2</sub>O content based on the system Na<sub>2</sub>O-CaO-MgO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>. **J Mater Sci: Mater Med**, London, v. 23, no. 9, p. 2069-2080, Sep. 2012.
- FARDIN, A.C. et al. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. **Innov Implant J, Biomater Esthet**, São Paulo, v. 5, no. 3, p. 48-52, Set-Dez. 2010.
- FINKEMEIER, C.G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. **J Bone Joint Surg Am**, Boston, v.84, no. 3, p. 454-64, Mar. 2002.
- FOOLADI, A.A.I. et al. Sol-gel-derived bioactive glass containing SiO<sub>2</sub>-MgO-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> as an antibacterial scaffold. **Journal of Biomedical Materials Research A**, Hoboken, v.101A, no. 6, p. 1582-1587, Jun. 2013.
- GABBAI-ARMELIN, P.R. et al. Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. **J Mater Sci: Mater Med**, London, v. 26, no. 5, p. 177, May. 2015.
- GALIA, C.R. et al. Caracterização físico-química do enxerto de osso bovino liofilizado. **Rev Bras Ortop**, v. 46, no. 4, p. 444-51, 2011.
- GIANNOUDIS, P.V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. **Injury**, Bristol, v. 36, no. suppl 3, p. S20-7, Nov. 2005.
- GREENBERG, B. M.; SCHNEIDER, S. J. Alloplastic reconstruction of large cranio-orbital defects: a comparative evaluation. **Ann Plast Surg**, Boston, v.55, no.1, p.43-51, Jul. 2005.

GROH, D.; DOHLER, F.; BRAUER, D.S. Bioactive glasses with improved processing. Part 1. Thermal properties, ion release and apatite formation. **Acta Biomaterialia**, Kidlington, v. 10, no. 10, p. 4465-4473, Oct. 2014.

HENCH, L. L. et al. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. **J Biomed Mater Res Symp**, v. 334, p. 117-141. 1971.

HENCH, L.L.; THOMPSON, I. Twenty-first century challenges for biomaterials. **J. R. Soc. Interface**, London, v. 7, no. suppl 4, p. S379–S391, Aug. 2010.

HOLLINGER, J.O. et al. Role of bone substitutes. **Clin Orthop**, Philadelphia, no. 324, p. 55-65, Mar. 1996.

KUSHWAHA, M. et al. Differentiation of human mesenchymal stem cells on niobium-doped fluorapatite glass-ceramics. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 28, no. 3, p. 252-260, Mar. 2012.

JUNIOR, P.G. **Obtenção de biovitro cerâmicas por cristalização controlada do vidro  $1\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{CaO} \cdot 2\text{SiO}_2$** . 2003. 74f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Materiais) – Faculdade de Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.

KIDO, H.W. et al. Histopathological, cytotoxicity and genotoxicity evaluation of Biosilicate® glass–ceramic scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research A**, Hoboken, v. 101A, no. 3, p. 667-673, Mar. 2013.

KUSHWAHA, M. et al. Differentiation of human mesenchymal stem cells on niobium-doped fluorapatite glass-ceramics. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 28, no. 3, p. 252-260, Mar. 2012.

LAURENCIN, C.T.; KHAN, Y. Bone grafts and bone graft substitutes: a brief history. In: Laurencin CT, editor. Bone graft substitutes. Bridgport, NJ: **ASTM International**; 2003.

LEITUNE, V.C.B. et al. Niobium pentoxide as a novel filler for dental adhesive resin. **Journal of Dentistry**, Bristol, v. 41, no. 2, p. 106-113, Feb. 2013.

LIMA, C.J. et al. Resposta do tecido subcutâneo de camundongos à implantação de um novo biovidro à base de óxido de nióbio. **Revista Matéria**, v. 16, no. 1, p. 574-582, 2011.

LIN, K. et al. Biomimetic hydroxyapatite porous microspheres with co-substituted essential trace elements: surfactant-free hydrothermal synthesis, enhanced degradation and drug release. **J Mater Chem**, v. 21, p. 16558-16565, Sep. 2011.

MACEDO, F.A.F.F. **Desenvolvimento e caracterização do compósito biocerâmica/polilactona com angiotensina 1-7 e avaliação em cultura primária de osteoblastos**. 2013. 89p. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia. Universidade Federal de Minas Gerais.

OBATA, A. et al. Effects of Niobium Ions Released from Calcium Phosphate Invert Glasses Containing Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> on Osteoblast-Like Cell Function. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, Washington, v. 4, no. 10, p. 5684–5690, Oct. 2012.

OLSZTA, M.J. et al. Bone structure and formation: A new perspective. **Materials Science and Engineering R**, v. 58, p. 77–116, 2007.

PURICELLI, E. et al. Characterization of bone repair in rat femur after treatment with calciumphosphate cement and autogenous bone graft. **Head & Face Medicine**. London, v. 6, no. 10, p.1-8, Jun. 2010.

SCHWARTZ, Z. et al. Differential effects of bone graft substitutes on regeneration of bone marrow. **Clin Oral Impl Res**, Copenhagen, v.19, no.12, p. 1233-1245, Dec. 2008.

TAMAI, M. et al. Synthesis of a novel b-tricalciumphosphate/hydroxyapatite biphasic calciumphosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties. **Journal of Artificial Organs**, v. 10, p. 22-28, 2007.

TIOMIS, A.C. et al. Avaliação histológica do biovidro particulado na reparação de defeito experimental em mandíbula de cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 62, no. 1, p. 80-85, Fev. 2010.

TIOMIS, A.C. et al. Particulate bioglass in the regeneration of alveolar bone in dogs: clinical, surgical and radiographic evaluations. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 58, no. 2, p. 149-154, Mar-Abril 2011.

TSIGKOU, O. et al. Differentiation of fetalosteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. **Biomaterials**, Guilford, England, v. 30, no. 21, p. 3542-3550, Jul. 2009.

VIRK, M.S. et al. Systemic administration of sclerostin antibody enhances bone repair in a critical-sized femoral defect in a rat model. **J Bone Joint SurgAm**, Boston, v. 95, no.8, p.694–701, Apr. 2013.

WAARSING, J.H. et al. Detecting and tracking local changes in the tibiae of individual rats: a novel method to analyse longitudinal in vivo micro-CT data. **Bone**, Elmsford, v. 34, no. 1, p. 163-169, 2004.

WILSON, J.; LOW, S.B. Bioactive ceramics for periodontal treatment: Comparative studies in Patus monkeys. **J Appl Biomater**, New York, v. 3, no. 2, p. 123-129, Summer 1992.

YANG, S. et al. Use of a chondroitin sulfate bioadhesive to enhance integration of bioglass particles for repairing critical-size bone defects. **Journal Of Biomedical Materials Research A**, Hoboken, v. 103A, no. 1, p. 235-242, Jan. 2015.