



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Ivonete Sena dos Santos

**Participação das células osteoprogenitoras e da matriz extracelular na
regeneração de defeitos ósseos com aplicação de enxertos xenógeno e
alógeno**

Rio de Janeiro

2021

Ivonete Sena dos Santos

Participação das células osteoprogenitoras e da matriz extracelular na regeneração de defeitos ósseos com aplicação de enxertos xenógeno e alógeno

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S237 Santos, Ivonete Sena dos.
Participação das células osteoprogenitoras e da matriz extracelular na regeneração de defeitos ósseos com aplicação de enxertos xenógeno e alógeno / Ivonete Sena dos Santos – 2021.
59f.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Ossos – Transplantes - Teses. 2. Xenoenxertos. 3. Aloenxertos. 4. Matriz extracelular - Teses. 5. Substitutos Ósseos. I. Carvalho, Jorge José de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.314

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Ivonete Sena dos Santos

Participação das células osteoprogenitoras e da matriz extracelular na regeneração de defeitos ósseos com aplicação de enxertos xenógeno e alógeno

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de setembro de 2021.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Marisa Maria Dreyer Breitenbach

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Jemima Fuentes Ribeiro da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Aldir Nascimento Machado

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àqueles que, presentes nos bastidores, imbuídos com o espírito de cooperação, estavam sempre prontos para auxiliar em qualquer demanda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família. Aos meus pais, Paulo e Ivete, agradeço por apoiarem minha dedicação aos estudos, incentivando minha ânsia por conhecimento desde o meu primeiro dia de aula. Aos meus filhos, Lucas e Tiago, agradeço por compreenderem minha dedicação à pesquisa, desculparem minhas ausências e auxiliarem nas tarefas cotidianas, o que permite dirigir minha atenção ao trabalho. E à minha irmã, Andréa, sempre a primeira a manifestar sua alegria e apoio com minhas conquistas.

Agradeço ao meu orientador que me recebeu com entusiasmo no LUBT, acreditando na minha capacidade, incentivando minha inscrição neste programa, e que com orientações seguras conduziu esta pesquisa.

Para Ana Lúcia, que me acolheu com inequívoco entusiasmo, e sempre esteve acessível para dirimir dúvidas, registro meu especial agradecimento.

A Victor Hugo e a Verônica, meus sinceros agradecimentos pela sua colaboração em cada passo dos experimentos.

Para Cherley, que conheci no final desta jornada, porém ofereceu sua experiência e conselhos valiosos.

Aos professores, técnicos, colaboradores e alunos de doutorado, mestrado e iniciação científica do LUBT deixo registrado meu agradecimento pelo convívio harmonioso, pela boa vontade em auxiliar em todas as etapas da pesquisa, compartilhando experiências que enriqueceram não apenas minha vida como este trabalho.

In memoriam, deixo registrado a maneira prestativa com a qual, a secretária do programa de pós-graduação Roberta, sempre me atendeu.

Agradeço a Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), as agências de fomento de pesquisa, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que disponibilizaram recursos, sem os quais não seria possível a realização desta pesquisa.

RESUMO

SANTOS, Ivonete Sena dos. **Participação das células osteoprogenitoras e da matriz extracelular na regeneração de defeitos ósseos com aplicação de enxertos xenógeno e alógeno.** 2021. 59 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

O defeito ósseo pode ter como causas: traumas faciais, atrofia óssea alveolar, reabsorção do osso alveolar, cânceres e tumores que levam a desconforto e alterações das funções. Vários materiais são propostos para a enxertia óssea, porém apresentam limitações quanto às propriedades requeridas para osteogênese. A reconstrução destes defeitos são um desafio para a engenharia tecidual. A indústria tem inovado, oferecendo biomateriais com mais de uma fase, visando combinar as propriedades dos diversos materiais para obter a osteocondução e a osteoindução, além de investir na nanotecnologia, que oferece biomateriais com características capazes de mimetizar a estrutura óssea. O objetivo deste estudo foi comparar um material xenogênico à base de hidroxiapatita (HA) micrométrica, com um biomaterial alogênico à base de HA e β -trifosfato de cálcio, nanométricos. Após criação de um defeito ósseo crítico, na calvária de ratos Wistar foram inseridos: xenomaterial no grupo BO, alogênico material no grupo REG e outro grupo controle (CTRL) sem inserção de material, apenas coágulo. Para avaliação geral das estruturas, foi realizada a coloração para HE. Além disso, foi realizada a coloração para Tricrômico de Goldner e imunomarcção para OPN para avaliação das áreas ossificadas e imunomarcção para VEGF para observar a formação de vasos sanguíneos. A coloração foi realizada para HE pelo método regressivo e para o Tricrômico de Goldner foram usados hematoxilina férrica de Weigert, corante *Ponceau Acid Fuchsin*, ácido fosfomolibdico *orange G* e solução *light-green*. Nas imunomarcações foram realizadas a recuperação antigênica. Na imunomarcção para OPN foi usado o anticorpo primário anti-Osteopontina (Santa Cruz, sc-21742), diluído em PBS/BSA a 1% (1:200) e para VEGF foi usado o anticorpo primário anti-VEGF (Santa Cruz, sc-1876), diluído em PBS/BSA a 1% (1:100), ambos, foram incubados com estreptavidina VECTASTAIN® Universal Quick HRP Kit). Os dados foram analisados usando o ANOVA *one-way*, seguido pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) e pós-teste de Dunn. O resultado da análise histológica com HE e Tricrômico de Goldner e imunomarcção para OPN e VEGF mostrou apenas fibras colágenas no grupo CTRL, enquanto no Grupo BO e REG observamos o biomaterial associado a tecido conjuntivo e áreas ossificadas. No grupo REG, a observação da marcação com OPN mostrou enclausuramento de células com características de osteoblastos em área com tecido recentemente ossificado. A análise histomorfométrica apresentou diferença estatística significativa ao comparar o grupo REG e CTRL com OPN, VEGF e coloração por Tricrômico de Goldner. A média de áreas coradas com Tricrômico de Goldner, OPN e VEGF foram expressivamente maiores no grupo REG. A conclusão foi que o biomaterial alogênico, com partículas nanométricas é perfeitamente adequado para utilização na reconstrução de tecidos ósseos; a produção de VEGF, que favorece a angiogênese, e da OPN, que indica ossificação, foi maior no grupo com biomaterial alogênico e a manutenção do coágulo, apenas, não favoreceu a osteogênese.

Palavras-chave: Osteoblastos. Matriz extracelular. Nanomateriais. Hidroxiapatita. β -trifosfato de cálcio. Osteocondução. Osteoindução.

ABSTRACT

SANTOS, Ivonete Sena dos. **Participation of osteoprogenitor cells and extracellular matrix in the regeneration of bone defects with application of xenogen and allogeneic grafts.** 2021. 59 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

The bone defect can be caused by facial trauma, alveolar bone atrophy, alveolar bone resorption, cancers and tumors that lead to discomfort and changes in functions. Several materials are proposed for bone grafting, but they have limitations regarding the properties required for osteogenesis. The reconstruction of these defects is a challenge for tissue engineering. The industry has innovated by offering biomaterials with more than one phase in order to combine the properties of different materials to lead to osteoconduction and osteoinduction. In addition, they invest in nanotechnology, which also offers biomaterials with characteristics capable of mimicking bone structure. The aim of this study was to compare a xeno-biomaterial based on hydroxyapatite (HA) micrometer, with an allogeneic biomaterial based on HA and β -calcium triphosphate, nanometers. After creating a critical bone defect in Wistar rats calvaria, xenomaterial was inserted in the BO group, allogeneic material in the REG group and another CTRL group, without insertion of material, just clot. For general evaluation of the structures, staining for HE was performed. In addition, Goldner's Trichrome staining were performed to assess the ossified areas and VEGF immunostaining to observe blood vessel formation. Staining was performed for HE by regressive method and staining for Goldner's Trichrome, Weigert's iron hematoxilin, Ponceau Acid Fuchsin dye, phosphomolybdic acid orange G and light-green solution were used. In immunostaining, antigen retrieval was performed. In immunostaining for OPN, the primary anti-Osteopontin antibody (Santa Cruz, sc-21742), diluted in PBS/BSA at 1% (1:1200) was used and for VEGF the primary anti-VEGF antibody (Santa Cruz, sc-1876), diluted in PBS/BSA at 1% (1:100) was used both were incubated with streptavidin VECTASTAIN[®] Universal Quick HRP Kit. Data were analyzed using one-way ANOVA, followed by the non-parametric Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$) and Dunn's post-test. The outcome of the histological analysis with HE and Goldner's Trichrome and immunostaining with OPN and VEGF showed only collagen fibers in the CTRL group, in the BO Group and REG showed biomaterial associated with connective tissue and ossified areas. Histomorphometric analysis was statistically significant when comparing the REG and CTRL group with OPN, VEGF and Goldner's Trichrome. The mean of stained areas with Goldner's Trichrome, OPN and VEGF was expressively higher in the REG group. The conclusion was that the nanometric biomaterial is perfectly suitable for use in bone tissue reconstruction; the production of VEGF, which favors angiogenesis, and of OPN, which indicates ossification, was greater in the group with synthetic biomaterial, and the maintenance of only the clot does not favor osteogenesis.

Keywords: Osteoblasts. Extracellular matrix. Nanomaterials. Hydroxyapatite. β -calcium triphosphate. Osteoconduction. Osteoinduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura da nanopartícula utilizada no biomaterial Blue Bone....	
Figura 2 -	Estrutura óssea.....	12
Figura 3 -	Corte compacto de osso mostrando o ósteon.....	15
Figura 4 -	Disposição das células ósseas.....	17
Figura 5 -	Biomateriais utilizados no projeto.....	31
Figura 6 -	Sequência de procedimentos cirúrgicos.....	32
Figura 7 -	Peça 30 dias antes da clivagem e esquema de clivagem.....	34
Figura 8 -	Esquema de marcação para histomorfometria com tricrômico de Goldner.....	37
Figura 9 -	Esquema de marcação para histomorfometria com OPN.....	38
Figura 10 -	Esquema de marcação para histomorfometria com VEGF.....	38
Figura 11 -	Coloração com HE.....	40
Figura 12 -	Coloração com tricrômico de Goldner.....	41
Figura 13 -	Gráfico e tabela com dados histomorfométricos com tricrômico de Goldner.....	42
Figura 14 -	Imunohistoquímica para Osteopontina.....	43
Figura 15 -	Gráfico e tabela com dados histomorfométricos para osteopontina.....	44
Figura 16 -	Imunohistoquímica para VEGF.....	45
Figura 17 -	Gráfico e tabela com dados histomorfométricos para VEGF.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaP	Fosfato de cálcio
CDHA	Hidroxiapatita deficiente em cálcio
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina & eosina
MEC	Matriz extracelular
MSC-BM	Células estromais mesenquimais da medula óssea
OC	Osteocalcina
OPN	Osteopontina
PIG-F	Fator de crescimento da placenta
ROG	Regeneração óssea guiada
TGF- β	Fator de crescimento transformador- beta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
β -TCP	β -trifosfato de cálcio
CTR L	Controle
REG	Regener
BO	Bio-Oss

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
n°	Número
Kg	Kilograma
β	Beta
g	Gramma
mM	Milimol
mm	Milímetro
μm	Micrômetro
α	Alfa
mg	Miligrama
mL	Mililitro
\pm	Mais ou menos
<	Menor que
M	Mol
h	Hora
\leq	Menor ou igual que
\geq	Maior ou igual que

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1	O tecido ósseo	13
1.2	Cicatrização do tecido ósseo	18
1.3	Mineralização do tecido ósseo	19
1.4	Biomateriais	21
1.4.1	<u>Biocerâmicas</u>	23
1.5	Enxertos nanométricos na engenharia de tecidos	25
2	OBJETIVO	29
2.1	Objetivos específicos	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Animais	30
3.2	Distribuição dos grupos	30
3.3	Biomateriais utilizados no procedimento	30
3.4	Procedimentos cirúrgicos	31
3.5	Eutanásia	33
3.6	Protocolo de análise morfológica	33
3.7	Protocolo de coloração e de imunohistoquímica	34
3.8	Histomorfometria e aquisição de imagens	37
3.9	Análise estatística	38
4	RESULTADOS	39
5	DISCUSSÃO	47
	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa.....	58
	ANEXO B – Artigo Publicado.....	59

INTRODUÇÃO

Os defeitos ósseos podem ser considerados um achado comum em diversas áreas da saúde, podendo ser encontrados em trauma facial e tumores, em atrofia óssea alveolar pós-exodontia, reabsorção óssea por doença periodontal, além de insucesso do tratamento endodôntico (Coringa *et al.*, 2018), levando a desconforto e alteração da função (Marycz *et al.*, 2020). A reconstrução destes defeitos, usualmente, pode ser tratada por meio de procedimentos de enxertia óssea. O advento da nanotecnologia incluiu vários produtos no mercado como possibilidades terapêuticas revolucionárias, alterando a visão de como tratar os tecidos ósseos.

Dentre as possibilidades e tipos de enxertia, o enxerto ósseo autógeno é considerado o padrão-ouro, particularmente devido ao seu potencial osteogênico. No entanto, a retirada de um enxerto autógeno, frequentemente, representa um risco significativo de morbidade e complicações pós-operatórias, associado a um alto custo financeiro (Nyberg *et al.*, 2017). Torna-se um desafio a procura por biomateriais que, em sua composição biológica e microestrutura, possuam qualidades de osteocondução e osteoindução. Para a Regeneração Óssea Guiada (ROG), na implantodontia e nas cirurgias ortopédicas, utiliza-se, dentre outros, os enxertos xenógenos e alógenos.

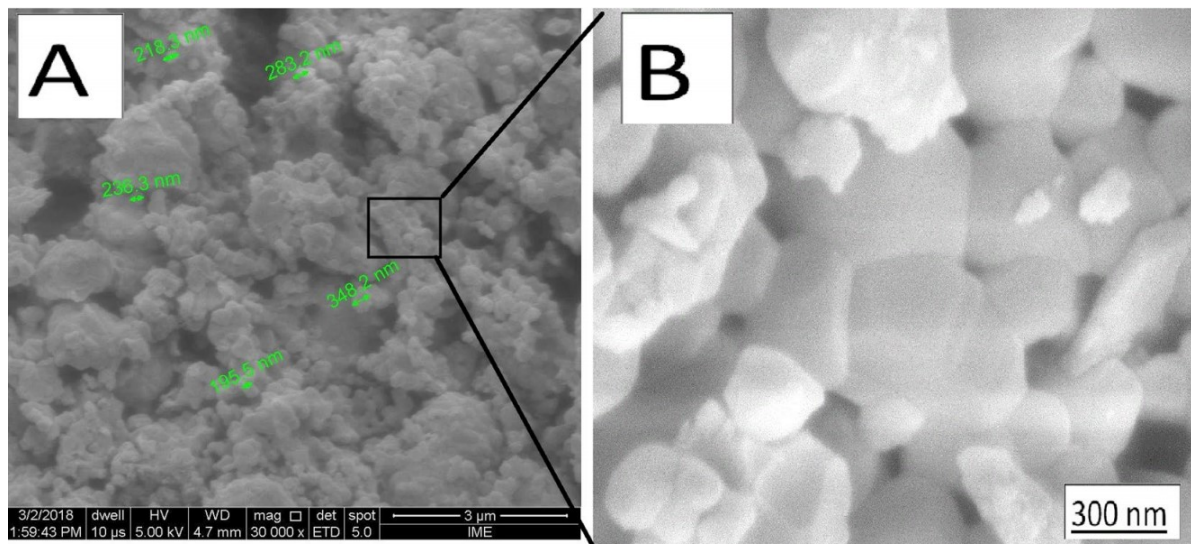
Dentre os enxertos xenógenos mais amplamente aceitos na clínica, encontram-se os enxertos de hidroxiapatita (HA) de origem bovina, que demonstram alta capacidade de osteocondutividade, sendo largamente estudados (Lee *et al.*, 2017). Outra fonte de biomateriais para a ROG, são os compostos à base de fosfato de cálcio, como o β -trifosfato de cálcio (β -TCP), alo gênico, um composto sinterizado em baixa temperatura e que demonstra capacidade de osteocondução, sendo pesquisada por vários autores a sua possível capacidade de osteoindução (Chen *et al.*, 2014; Ge *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Uma característica positiva do β -TCP é a promoção de uma fase estável entre a HA e o tricalciofosfato, que propicia a liberação lenta dos íons de cálcio e de fosfato que influenciam na remodelação óssea (Hivernaud *et al.*, 2019).

A nanotecnologia vem aprimorando as propriedades bioativas da HA em relação aos seus cristais, tendo como resultado uma melhor resposta em associação aos nanocristais do que aos cristais mais grossos, permitindo a construção de um andaime similar à matriz extracelular que favorece a ROG (Wang *et al.*, 2017). A associação de HA com outros elementos, incluindo os elementos químicos da família dos lantanídeos, conhecidos como

terras raras, incrementa as propriedades osteoindutoras dos materiais alo gênicos (Marycz *et al.*, 2020). A cristalinidade tem sido descrita como a característica responsável do biomaterial capaz de persistir por um maior ou menor período no organismo, sendo que os avanços no modo de fabricação dos cristais permitem adequar com eficiência a reabsorção e a substituição dos compósitos em relação ao tempo (Da Silva Brum *et al.*, 2019).

A proporção ideal entre a HA e β -TCP é alvo de contínua pesquisa, necessitando de maiores estudos. A associação de hidroxiapatita (80%) ao β -TCP (20%) tem sido apresentada como uma composição eficiente para favorecer a regeneração óssea guiada, tendo como plataforma inicial o primeiro elemento, e a liberação dos íons de cálcio e fosfato de forma lenta favorecendo o processo de regeneração (De Oliveira Puttini *et al.*, 2019). No presente trabalho, a associação de HA (78,76%) ao β -TCP (21,03%) e Óxido de Cálcio (0,19%) do produto comercial Blue Bone, assim como a estrutura nanoparticulada (Figura 1), encontra-se sendo avaliada como uma eficiente composição para favorecer a ROG (Da Silva Brum *et al.*, 2019), modulando a biorreabsorção do material no organismo. A degradação do β -TCP tem um relevante papel para as características do biomaterial (Ishikawa *et al.*, 2018).

Figura 1 - Estrutura da nanopartícula utilizada no biomaterial Blue Bone



Legenda: A - cluster do biomaterial e B - detalhes da nanopartícula.

Fonte: Brum, 2019.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. O tecido ósseo

Embriologicamente, o tecido ósseo se origina dos tecidos conjuntivos sendo ossificado após diversas interações biológicas e físico-químicas. A mineralização compreende um processo mais amplo de acúmulo de substâncias minerais em tecidos orgânicos, inorgânicos e objetos diversos. O processo de formação óssea pode ser denominado de ossificação ou osteogênese (Ross; Paulina, 2018). A ossificação corresponde ao processo de transformação gradual da cartilagem ou tecido fibroso em osso. No entanto, vários tecidos no organismo podem sofrer este processo, de maneira patológica (Murshed, 2018; Mebarek et al., 2013). A calcificação é a deposição de cristais de cálcio e outros íons em células e tecidos, fazendo parte do processo de ossificação. A ossificação é um processo que se estabelece em estágios com a precipitação de minerais que contribuem para a formação da hidroxiapatita óssea (Eanes, 1965; Murshed, 2018). Independentemente do tipo de ossificação, o processo se inicia nos centros de ossificação. O tecido ósseo se forma por: ossificação intramembranosa, quando se forma de uma região condensada de natureza conjuntiva e ossificação endocondral, quando substitui um modelo cartilaginoso previamente instalado (Mebarek et al., 2013; Murshed, 2018).

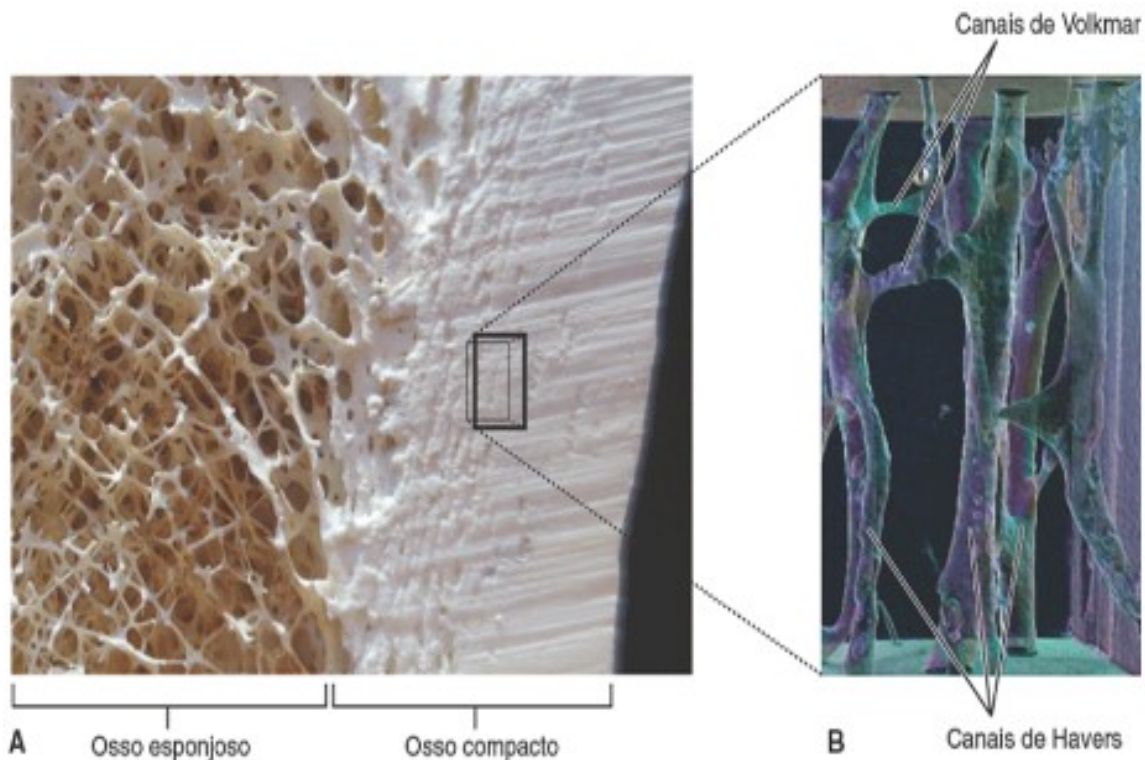
A ossificação intramembranosa inicia-se com a proliferação e diferenciação de células do mesênquima em osteoblastos que produzem a matriz extracelular. Este tecido inicialmente, denomina-se osteoide, sendo composto de fosfato de cálcio amorfo, e não de apatita (Murshed, 2018). A deposição da matriz extracelular no perímetro do osteoblasto, produz o enclausuramento de algumas células que passam a ser denominadas de osteócito. O osteoide ou osso imaturo, apresenta-se inicialmente com espículas interconectadas que aumentam seu volume tridimensionalmente, mimetizando a estrutura do futuro osso maduro. Os espaços trabeculares apresentam vasos sanguíneos e tecido conjuntivo (Ross; Paulina, 2018). A transição para o osso maduro é dependente do tempo para formação da apatita, referido como a hidroxiapatita carbonatada (Murshed, 2018).

A fase inorgânica é um fosfato de cálcio, em geral na forma de hidroxiapatita. A mineralização dos tecidos é dependente dos íons de Ca^{+2} e PO_4 que se encontram disponíveis em todo o organismo, porém mecanismos de controle, como pirofosfatase, nos tecidos inibem

a calcificação geral de tecidos. A supersaturação de íons de Ca^{+2} e PO_4 nos tecidos que requerem mineralização é regulada intrinsecamente, por complexos processos biológicos, ainda não completamente elucidados (Murshed, 2018). O sítio de nucleação é o local inicial de deposição mineral estando associada à presença de vesículas de matriz contendo material calcificado em seu interior. A presença de vesículas da matriz está relacionada aos processos iniciais de mineralização, derivando de células produtoras de matriz orgânica como os osteoblastos. Após a mineralização da vesícula da matriz, este processo se estende para a fibrilas colágenas e regiões interfibrilares (Mebarek et al., 2013).

O tecido ósseo é uma estrutura altamente dinâmica e especializada que, estruturalmente, se divide em osso cortical e osso esponjoso (Figura 2). O tecido ósseo possui como funções: o reservatório de minerais, hematopoese, diferenciação de células osteogênicas, arcabouço e proteção (Valerio; Terçarolli; Gribel, 2012). A estrutura óssea assemelha-se a um cilindro central, o canal de Havers, interligado por vários canais chamados de canais de Volkmann (Ross & Pawlina, 2018).

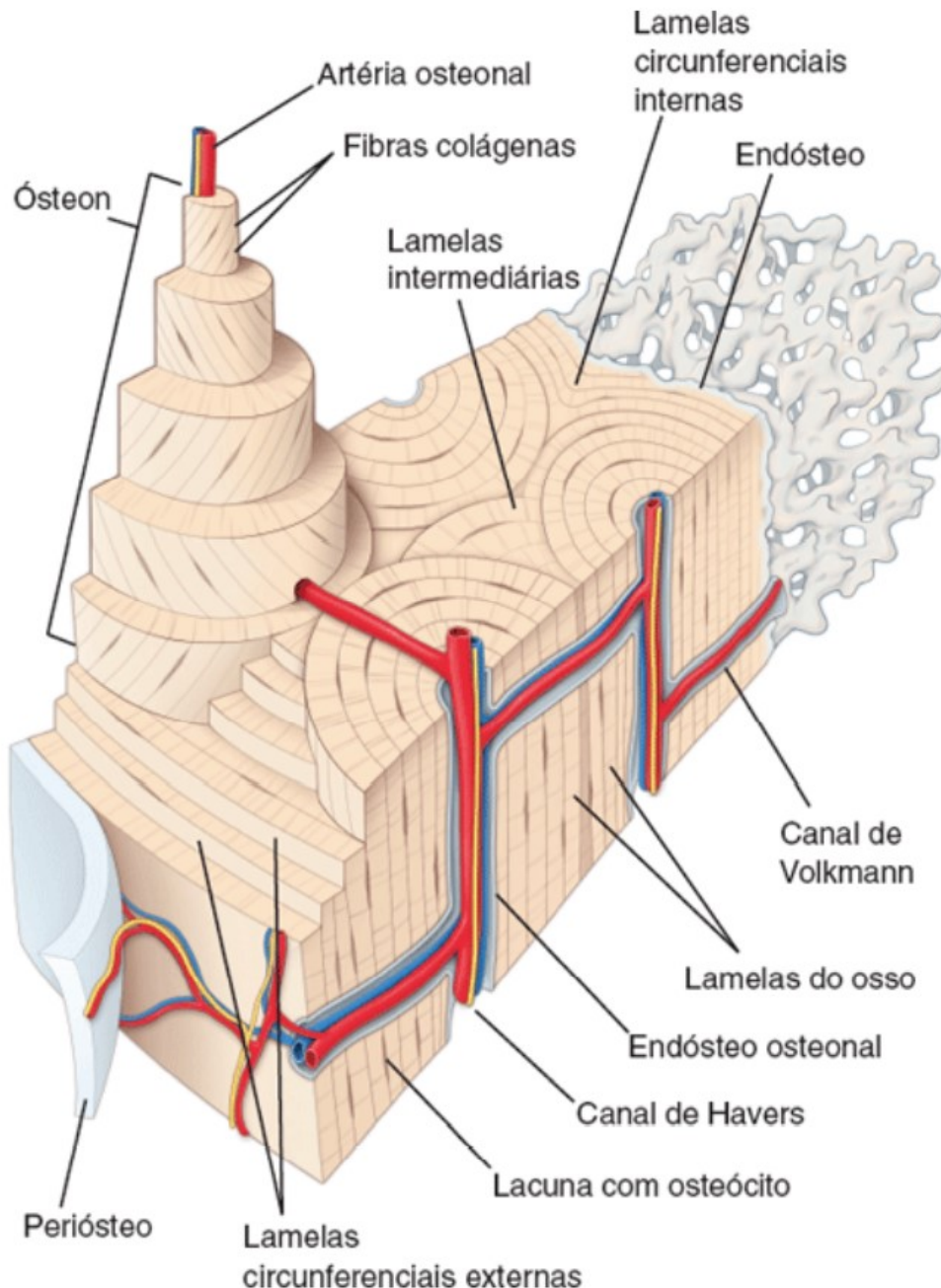
Figura 2 - Osso compacto apresentando a sua estrutura macroanatômica, canais de Havers e Volkman.



Legenda: A - a macroanatomia do tecido ósseo e B - os canais de Havers e de Volkman
 Fonte: Ross & Pawlina, 2018.

As lamelas concêntricas que circundam os canais de Havers denominam-se de ósteons (Figura 3). Estas lamelas são formadas por matriz extracelular (MEC), passíveis de remodelação e nova formação óssea (Zhu; Luo; Liu, 2020).

Figura 3 - Corte compacto do osso mostrando o ósteon



Fonte: Ross & Pawlina, 2018.

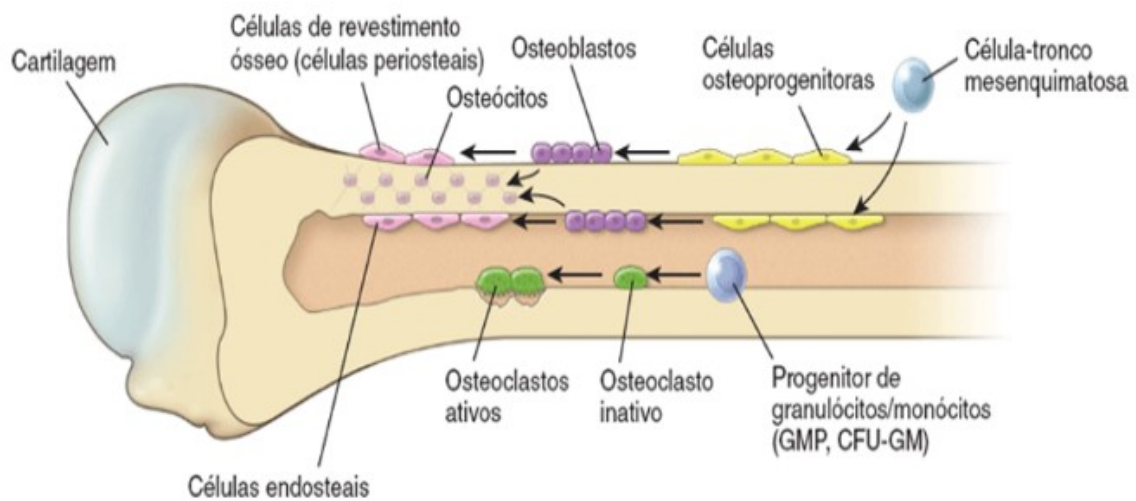
O tecido ósseo é composto por uma complexa estrutura tridimensional, com uma fase orgânica e uma inorgânica. A parte inorgânica do tecido ósseo representa cerca de 65 a 70%,

sendo a maior parte formada por íons de cálcio e fósforo. A hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é o principal componente inorgânico do tecido ósseo, compondo a matriz extracelular juntamente com fibras colágenas e de proteínas não colágenas (Carvalho *et al.*, 2020; Jeong *et al.*, 2019). A hidroxiapatita pode ser indicada como um marcador para avaliar a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais (Tsao *et al.*, 2017). Outros íons fazem parte da composição da fase inorgânica, como o citrato, carbonato e vários íons de flúor (F^-), potássio (K^+), estrôncio (Sr^{2+}), chumbo (Pb^{2+}), zinco (Zn^{2+}), cobre (Cu^{2+}) e ferro (Fe^{2+}) (Jaquinta *et al.*, 2019).

A parte orgânica do tecido ósseo representa 10 a 30%, sendo formada por 90% de fibras colágenas, destas, cerca de 80% são fibras colágenas tipo I. Fazem parte desta matriz orgânica outros tipos de fibras colágenas, como colágeno III, V, XI e XIII. Na MEC, estas fibras funcionam como um arcabouço, sendo os espaços inter e intrafibrilares, locais nos quais se inicia a deposição mineral (Carvalho *et al.*, 2020; Lopes *et al.*, 2019; Murshed, 2018). As proteínas não colágenas representam 10% e constituem a substância fundamental do osso, tornando-se mineralizadas juntamente com o colágeno. Estas proteínas são: macromoléculas de proteoglicanos; fatores de crescimento e as citocinas, como fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator transformador do crescimento- β (TGF- β), fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGF), proteínas morfogenéticas do osso (BMP), esclerotina, interleucinas; glicoproteínas multiadesivas, como: osteonectina, proteína da matriz de dentina e sialoproteínas, tipo osteopontina (OPN); proteínas dependentes de vitamina K específicas do osso, como a osteocalcina (OC); e as proteínas não colagenosas que influenciam em diversas funções dos tecidos ósseos, como a adesão celular (Carvalho *et al.*, 2020; Lopes *et al.*, 2019). Sabe-se que a OPN e a OC desempenham um papel crítico na mineralização, manutenção dos ossos, orientação dos cristais e desempenho frente ao estresse mecânico, além de promover a interação entre as células e a parte inorgânica da matrix (Bailey *et al.*, 2017). Ainda, a OPN e a OC parecem exibir acentuados níveis, mais tardiamente durante a mineralização da matriz extra-celular (MEC) e formação óssea (Kang *et al.*, 2020). A sialoproteína possui estreita relação com as fibras de colágeno, influenciando a mineralização do tecido ósseo, principalmente nos estágios iniciais da calcificação (Bonucci, 2012). A expressão da osteonectina é maior no osso esponjoso que no osso compacto, sendo seus valores inversamente proporcionais ao grau de calcificação. É uma proteína multifatorial que regula o cálcio, as interações entre as células e a matriz extracelular, os sítios de ligação da hidroxiapatita e regula a remodelação óssea (Bonucci, 2012).

As células que formam o tecido ósseo são as células de revestimento ósseo, os osteoblastos, os osteócitos, com origem nas células tronco mesenquimatosas e os osteoclastos, com origem nas células progenitoras hemocitopoéticas. As células da linhagem óssea inativadas encontram-se quiescentes no revestimento ósseo e podem se diferenciar nas células osteoprogenitoras (Figura 4) (Ansari, 2019).

Figura 4 - Disposição das células ósseas



Fonte: Ross & Pawlina, 2018.

Os osteoblastos derivam de uma linhagem de células de origem medular, sendo os responsáveis pela síntese da matriz orgânica e formação e mineralização do tecido ósseo. Cerca de 20% dos osteoblastos ficam aprisionados por sua MEC (Prideaux; Findlay; Atkins, 2016).

Os osteócitos são as células ósseas enclausuradas pela MEC com prolongamentos que se interconectam formando um sincício, similar a uma rede neural, que permite a transmissão de informações para outras células do tecido ósseo (Andrade *et al.*, 2007). Por conta desta característica, os osteócitos têm sido considerados as células responsáveis pelo processo de remodelação óssea, regulando a atividade das outras células através de mediadores bioquímicos (Gusmão & Belangero, 2009).

Os osteoclastos, que representam cerca de 1% das células ósseas, são grandes células de origem sanguínea, medular e do baço (Guo *et al.*, 2015). Apresentam-se multinucleadas, formadas pela união de monócitos hematopoiéticos e macrófagos. São responsáveis pelos processos de reabsorção óssea.

1.2. Cicatrização do tecido ósseo

O processo de cicatrização dos tecidos ósseos pode ser dividido em quatro etapas: hemostasia, inflamação, proliferação e maturação. A primeira etapa se caracteriza pela indução do coágulo através da invasão de plaquetas e de fatores de coagulação nos tecidos adjacentes. Em seguida, então, ocorre a etapa da inflamação, com a liberação de citocinas e recrutamento de células progenitoras através de mediadores (Ho-Shui-Ling *et al.*, 2018). A etapa de proliferação caracteriza-se pelo início da deposição de fibras colágenas que, propiciada pela reconstrução da matriz extracelular, segue a maturação, com a substituição das fibras colágenas tipo III por fibras colágenas tipo I (Diomedea *et al.*, 2020).

Na etapa inflamatória da ossificação intramembranosa, a hipóxia inicial estimula o osteoblasto a liberar o VEGF. Estudos mostram que a administração local de VEGF no enxerto aumenta a densidade mineral óssea e a angiogênese (De Campos Pessoa *et al.*, 2020; Du *et al.*, 2015; Ozturk *et al.*, 2013).

A vasodilatação iniciada durante a fase de edema tecidual proporciona a invasão de diversos componentes pró-angiogênicos que se reduzem com a maturação dos vasos sanguíneos. Em mútua cooperação, estes fatores iniciam a reparação tecidual. Na fase inicial, encontram-se presentes, em altos níveis, o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento transformador- β (TGF- β), triptase dos mastócitos, a proteína anquirina cardíaca, e, particularmente, os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) (Dipietro, 2016). O VEGF-A, conjuntamente com VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e o fator de crescimento da placenta (PIG-F) estruturam uma família de proteínas homodiméricas, sendo o VEGF-A apontado com a capacidade de induzir a migração e a proliferação de células endoteliais (Diomedea *et al.*, 2020).

Há um natural entrelaçamento dos processos de osteogênese e angiogênese (Lopes *et al.*, 2019). Os novos vasos sanguíneos transportam nutrientes, minerais, fatores de crescimento e emissão de sinais parácrinos, que modulam o comportamento celular, além de compor uma base essencial para a estruturação da deposição óssea inicial. As diversas linhagens de células osteogênicas são recrutadas sob a égide destes processos, no intuito de conduzir à reparação óssea. Estudos anteriores relatam a íntima associação entre as células-tronco hematopoéticas e mesenquimais com as arteríolas, possuindo os odontoblastos e osteócitos intrínseca relação com células hematopoéticas quiescentes (Kunisaki *et al.*, 2013).

Em estudo avaliando o padrão comportamental de macrófagos cultivados sobre hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) e β -TCP, foi analisada a liberação de citocinas inflamatórias e fatores osteoclastogênicos, sendo verificado que os dois biomateriais suportaram a adesão e proliferação dos macrófagos. A presença maciça de macrófagos na etapa inflamatória inicial estimula a cicatrização da ferida. Outro ponto a ser considerado é a capacidade do macrófago de interferir na formação e reabsorção óssea por vários mecanismos, inclusive indução da osteogênese por células-tronco mesenquimais. A interação entre células imunes e de linhagens osteogênicas é primordial para finalizar a etapa da inflamação e estimular o início da osteogênese. No estudo, analisou-se o efeito na diferenciação osteogênica de células mesenquimais e osteoblastos, avaliando o efeito entre moléculas secretadas por células RAW (macrófagos de murinos) cultivadas em CaP e o meio iônico produzido pela interação entre o biomaterial e a cultura celular (Sadowska *et al.*, 2019).

Os biomateriais com propriedades osteoindutivas, como fosfatos de cálcio, β -Fosfato Tricálcico e Hidroxiapatita sustentam a neovascularização. Estes biomateriais não induzem efeitos colaterais adversos e atraem células (Diomedea *et al.*, 2020).

1.3. Mineralização do tecido ósseo

Vários tecidos, como osso, cartilagem, dentina, cimento e esmalte dentário, são fisiologicamente mineralizados. A mineralização dos tecidos ósseos ocorre pela deposição de minerais na matriz extracelular dos organismos. O aumento na concentração de íons de cálcio e fosfato desencadeia o processo inicial (Tsao *et al.*, 2017).

A mineralização, através de uma série de processos físico-químicos mediados por fatores biológicos, inicia o arranjo de íons de cálcio e fosfato, que são recrutados do meio, formando o fosfato de cálcio. A deposição de minerais será iniciada se as concentrações iônicas (Ca^{2+} e PO_4) ultrapassarem os limiares previstos na matriz (Orimo, 2010). O plasma e fluidos tissulares apresentam uma supersaturação destes íons, porém suas concentrações iônicas não permitem sua dissolução nos fluidos, impedindo a mineralização generalizada dos tecidos do organismo. Parece haver mecanismos de regulação, como o pirofosfato (Ross & Pawlina, 2018).

Vesículas são formadas no interior da célula, neste caso dos osteoblastos, originadas da própria membrana citoplasmática, e, posteriormente, se tornam independentes na matriz

extracelular. Nelas são visualizados cristais no início de processo de mineralização. As vesículas apresentam moléculas ligadas ao processo de mineralização, como a pirofosfatase e fosfatase alcalina (Murshed, 2018; Orimo, 2010).

O processo de mineralização tem seu início com a elevação local do íon Ca^{2+} extracelular ligado a sialoproteínas e osteocalcina. Estudos avaliando a concentração de Ca^{2+} extracelular em células C3H10T1/2 (fibroblastos de camundongos) e MSCs-BM (células-tronco mesenquimais de medula óssea) demonstraram que a concentração de íons Ca^{2+} extracelular de 6mM, além de agir sobre o osteoblasto, determina o recrutamento do fenótipo de célula-tronco mesenquimal, propiciando sua proliferação e diferenciação (Lee *et al.*, 2018).

Logo, em seguida, os osteoblastos secretam a fosfatase alcalina, que age estimulando a elevação local do íon PO_4 . A elevação dos níveis de PO_4 estimula ainda mais o aumento do Ca^{2+} inicial. Com a elevação dos níveis de Ca^{2+} e PO_4 extracelular, as vesículas são liberadas dos osteoblastos (Orimo, 2010; Ross & Pawlina, 2018). Deve-se levar em consideração que estas vesículas constituem um microambiente que permite alterações na concentração de íons Ca^{2+} e PO_4 intravesicular que permitindo o crescimento de cristais pela adição destes íons; contudo não alteram o meio externo (Orimo, 2010; Ross & Pawlina, 2018. Murshed, 2018).

Tem início o processo de clivagem dos íons PO_4 de outras moléculas da matriz, através da fosfatase alcalina e da pirofosfatase (Murshed, 2018), além do acúmulo de íons Ca^{2+} , que aumenta o ponto isoelétrico local, culminando com a cristalização de CaPO_4 nas vesículas circunvizinhas. A formação e deposição dos cristais de hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] iniciam ao redor dos osteoblastos. Estudos avaliando a concentração de Ca^{2+} extracelular em células C3H10T1/2 e MSCs-BM sugerem que a elevação do Ca^{2+} extracelular incrementa a mineralização da matriz, pois este efeito foi mantido quando as células foram submetidas até 20mM de Ca^{2+} no meio de cultura e diminuiu após 6mM de concentração, mesmo mantidas as condições osteogênicas. Ainda se verificou que, sob estas condições, a osteopontina secretada não influenciava a proliferação celular nem a mineralização da matriz (Lee *et al.*, 2018).

Em um estudo que avaliou a influência da osteopontina (OPN) e osteocalcina sobre células-tronco mesenquimais derivadas da medula de camundongos *wild type* (WT) e *knockout* (sem OPN e OC) se esclarece a cooperação da OPN e OC sobre a biorregulação dos cristais minerais. A ligação OC-OPN é essencial para integrar as fases orgânica e inorgânica do tecido ósseo, que estabelece as propriedades da matriz óssea. A OC produz o crescimento de cristais sobre a fibra colágena e organiza os íons Ca^{2+} e PO_4^{-3} , fixando o íon Ca^{2+} para manter a estrutura do cristal, enquanto a OPN recruta outros íons como Mg^{2+} e controlam os íons negativamente carregados, garantindo a ligação ente cristais (Poundarik *et al.*, 2018).

Em outro estudo, Carvalho (2020) avaliou a influência da osteopontina (OPN) e osteocalcina sobre células-tronco mesenquimais derivadas da medula de camundongos *wild type* (WT) e *knockout* (sem OPN e OC), no qual foi sugerido que a variada capacidade de ligação da OPN influencia diversos processos, tais como: organização do colágeno, adesão celular, viabilidade celular, migração celular, angiogênese e calcificação. Previamente, o mesmo grupo de estudo estabeleceu que a atuação da osteocalcina e OPN estrutura o entrelaçamento entre as fases orgânica e inorgânica do tecido ósseo, e tem atuação fundamental na qualidade da calcificação dos tecidos ósseos (Carvalho *et al.*, 2020).

O controle da deposição inicial do mineral no osteoide deriva das vesículas dos osteoblastos. A precipitação inicial dos cristais de hidroxiapatita desencadeia a adição de novos cristais que se unem aos cristais de vesículas adjacentes liberando um fluxo de mineralização (Orimo, 2010).

1.4. Biomateriais

Biomateriais são compostos por materiais alogênicos que mimetizam a química e topografia dos tecidos ósseos modulando a resposta osteogênica (Jeong *et al.*, 2019; Sadowska *et al.*, 2019; Zhu; Luo; Liu, 2020). Diversos componentes utilizados em reabilitações são provenientes de biomateriais, tais como: próteses, implantes, lentes, enxertos, stents, cateteres, marca-passos, válvulas e arcabouços (*scaffolds*) empregados na engenharia de tecidos, entre outros. Podem ser usados os enxertos sozinhos ou associados a moléculas e células (Ho-Shui-Ling *et al.*, 2018). Os biomateriais podem ser classificados de várias maneiras: por sua escala de dimensões (nanométricos $\leq 100\text{nm}$, submicrômicos $100\text{-}1\mu\text{m}$ e micrométricos $\geq 1\mu\text{m}$), por sua origem (autógeno que tem origem do próprio organismo, alógeno que tem origem em organismo da mesma espécie ou características similares, xenógeno que tem origem em espécies diferentes e aloplástico que tem origem sintética), por sua resposta ao organismo (bioinertes, bioativos e biorreabsorvíveis) (Jeong *et al.*, 2019; Zhu; Luo; Liu, 2020). Os biomateriais recentes destacam os produtos apresentados na forma de pó, como as nano-hidroxiapatitas e os nano- β -fosfato tricálcico, que apresentam maiores áreas superficiais com compatibilidade para interação e adsorção de células e moléculas, favorecendo os processos de osteocondução e osteoindução (Brum *et al.*, 2020). Independentemente do biomaterial escolhido, este deve interagir favoravelmente, procurando

o equilíbrio entre as suas propriedades, as funções biológicas e estruturas dos materiais empregados (Lin *et al.*, 2020). O biomaterial deve possuir propriedades tais como:

- Biocompatibilidade

Pode ser expressa como a capacidade do biomaterial para não apresentar uma resposta adversa em um organismo vivo (Iaquinta *et al.*, 2019). O material deve induzir uma resposta inflamatória mínima. A espessura de tecido fibroso delimitando o biomaterial é uma resposta ao grau de biocompatibilidade deste (Kaluzny; Józwicki; Wisniewska, 2006).

- Biofuncionabilidade

Refere-se à capacidade do biomaterial de suportar cargas físicas e mecânicas ao substituir o tecido lesionado. A porosidade é um fator importante ao avaliar as características do biomaterial. O aumento da porosidade melhora o contato com os fluidos do corpo sobre a área de superfície e a presença de poros na superfície afeta a adsorção das proteínas, que melhora quando os poros possuem entre 20-500 μ m, sendo que o tamanho de 50 μ m ou mais incrementa a angiogênese. No entanto, poros maiores que 100 μ m afetam a força mecânica, fragilizando o biomaterial que pode não resistir aos impactos (Jeong *et al.*, 2019).

- Bioatividade

Refere-se à capacidade do biomaterial de participar das atividades biológicas do organismo, fomentando ligações químicas com os tecidos adjacentes (osteointegração). A bioatividade depende da degradação e da liberação dos íons de cálcio e fosfato, que são de grande importância para a regulação da adesão celular e formação tecidual (Jeong *et al.*, 2019). A similaridade química entre o biomaterial e os tecidos permite a adesão de células e proteínas ao biomaterial, conduzindo ao revestimento do material por células ósseas, como osteoblastos e fibroblastos, propiciando a mineralização dos tecidos (Carolina *et al.*, 2019). Dentre as cerâmicas bioativas, pode-se mencionar a hidroxiapatita, o biovidro, alguns vitro-cerâmicos.

- Biorreabsorção

Refere-se à capacidade do biomaterial sofrer degradação ou ser solubilizado no meio em função do tempo. É uma característica bastante apreciada por evitar um novo tempo cirúrgico para remoção do mesmo. Encontra-se ligada com a porosidade que, ao ampliar a

área superficial, estimula a degradação iônica dos materiais (Ho-Shui-Ling *et al.*, 2018). Os fosfatos tricálcicos e sulfato de cálcio são exemplos de cerâmicas biorreabsorvíveis.

1.4.1. Biocerâmicas

A biocompatibilidade é uma capacidade inerente a grande parte das biocerâmicas por serem formadas essencialmente por hidroxiapatita sintética, similar à hidroxiapatita (HA) que compõe a fase mineral dos tecidos ósseos ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Adams *et al.*, 2013). A hidroxiapatita possui, além da biocompatibilidade, resistência à compressão e corrosão (Iaquinta *et al.*, 2019), além de notável capacidade de adsorção de moléculas. As biocerâmicas apresentam superfície inerte e mínima reação nos tecidos adjacentes, porém apresentam baixa resistência à fratura, fragilidade e rigidez (Baptista *et al.*, 2018).

Em áreas que necessitem de estímulo ao crescimento de tecidos ósseos, as biocerâmicas com capacidade bioativa, em forma do pó, são o material elegível, pois apresentam estabilidade em suas interações químicas com o hospedeiro. O fosfato tricálcico é o material reconhecido como cerâmica biorreabsorvível, biocompatível e com grande capacidade de adsorção de moléculas *in vivo*. Apesar da porosidade baixa inicial, o desenvolvimento de tecido no interior do biomaterial alarga estes poros. Então, no biomaterial, ocorre a deposição de fosfato de cálcio amorfo pela solubilidade do material, que favorece a calcificação dos tecidos (Da Silva Brum *et al.*, 2019).

O fosfato de cálcio (CaP) é uma biocerâmica que apresenta uma composição química similar à fase inorgânica de tecidos ósseos e dentários (íons de fosfato e cálcio). Possibilita, então, o equilíbrio iônico entre o biomaterial e as estruturas biológicas, formando ligações com os tecidos, sem apresentar resposta inflamatória e toxicidade. Desta forma, o CaP consegue fornecer um arcabouço estrutural para crescimento dos tecidos ósseos até sua maturação, sendo, paulatinamente, degradado pelo organismo (Jeong *et al.*, 2019).

Um biomaterial que se apresenta em quatro fases distintas dependendo da temperatura de exposição, é o fosfato tricálcico, ($\text{Ca}^3(\text{PO}_4)^2$): o α -TCP estável entre 1120°C e 1470°C, porém metaestável em temperaturas abaixo de 1120°C; o α' -TCP estável apenas acima de 1470°C; o β -TCP estável abaixo de 1120°C e o β' -TCP estável apenas com elevadas pressões. O β -TCP é fabricado numa temperatura de cerca de 800°C. A temperatura de sinterização altera as propriedades dos materiais modificando a resposta à deposição óssea (Carolina *et al.*, 2019). Os biomateriais obtidos em baixas temperaturas, apresentam características estruturais

similares à fase inorgânica do tecido ósseo e demonstram inerentes propriedades osteoindutoras e osteocondutoras. Os novos processos de fabricação permitem a ingerência durante a síntese para a construção de bioprodutos de tamanhos diferenciados e capazes de induzir a uma resposta celular específica (Sadowska *et al.*, 2019; Zhu; Luo; Liu, 2020).

A modulação de respostas imunes associada às propriedades físico-químicas dos β -TCP foram comprovadas em recentes estudos. A manipulação da topografia da hidroxiapatita deficiente de cálcio (CDHA) para material nanométrico apresenta, como efeito, a estimulação de células de linhagens osteogênicas, e a alteração na porosidade CDHA resulta na modulação positiva de suas características anti-inflamatórias (Sadowska *et al.*, 2019).

A hidroxiapatita representa cerca de 30 a 70% da massa dos tecidos ósseos e dentários. Possui a razão Ca/P igual a 1,67 e cristaliza-se de forma hexagonal (Adams *et al.*, 2013). A hidroxiapatita sintética apresenta grande semelhança química com a fase inorgânica dos tecidos ósseos. Esta semelhança permite a proliferação de células que não diferenciam o material dos tecidos nativos. Além disso, a área superficial propicia a interação para captação de proteínas e outras substâncias, induzindo à formação de tecidos (Levingstone; Herbaj; Dunne, 2019).

A estrutura da hidroxiapatita permite isomórficas transfigurações por meio de cátions e ânions, com relativa facilidade. Estas transfigurações modificam diversos aspectos físico-químicos como a cristalinidade, tamanho dos cristais, solubilidade e estabilidade. O β -TCP e o α -TCP têm a razão de 1,50 de Ca/P, porém a diferença na estrutura de seus cristais modifica o comportamento termodinâmico e reabsorção nos tecidos (Levingstone; Herbaj; Dunne, 2019).

O tecido ósseo possui componentes altamente especializados dotados com intrínseca capacidade de regeneração, porém expressa limitações a esta capacidade quando defeitos de ampla magnitude acometem as estruturas. A perda de substância pode comprometer a funcionalidade. Por meio da Regeneração Óssea Guiada, procura-se recompor a estrutura perdida, utilizando-se procedimentos de enxertia (Carolina *et al.*, 2019).

Os fenômenos que regem a osteogênese são guiados por uma complexa gama de fatores gerais e locais, conduzidos por diversas vias metabólicas e acionados por mensageiros autócrinos e parácrinos (Ho-Shui-Ling *et al.*, 2018). Estes fenômenos que envolvem o processo de reparação dos tecidos ósseos são altamente complexos e têm sido exploradas diversas abordagens com materiais sofisticados que mimetizam as características inerentes ao tecido ósseo (Baptista *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2018).

Para utilização no corpo humano, o material necessita intrínsecas propriedades que permitam sua implantação no organismo. Para tanto, mundialmente, vem-se procurando estabelecer uma classe de materiais com esta finalidade (Liu *et al.*, 2015). São os biomateriais, que podem ser de origem sintética ou natural, mas que permitam a sua utilização em substituição em parte de órgãos ou tecidos. Estes biomateriais não devem causar lesão aos tecidos, contudo devem ser resistentes à corrosão, ao desgaste, às cargas mecânicas e a outros desafios, num meio bastante hostil, que é o organismo (Ansari, 2019).

1.5 Enxertos Nanométricos na Engenharia de Tecidos

Na engenharia de tecidos, diversos biomateriais são testados como plataformas que mimetizem a microestrutura dos tecidos ósseos, permitindo a adsorção de moléculas e fatores bioativos que induzam o recrutamento e diferenciação de células que suportem a mineralização óssea (Baptista *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2014). A regeneração óssea guiada enfrenta grandes desafios na construção de biomateriais que apoie o crescimento ósseo sem reduzir as propriedades mecânicas. O aumento do tamanho do poro reduz as propriedades mecânicas. O equilíbrio entre a porosidade e biofuncionalidade em estruturas nanométricas à base de hidroxiapatita (HA) e quitosana mostrou-se eficiente para nutrição e formação óssea (Kong *et al.*, 2007). A produção de uma matriz óssea consistente é uma resposta especificamente desejada relacionada aos biomateriais nanométricos, suportada pelo trabalho que identificou células relacionadas à produção de fibras colágenas na área de regeneração óssea, além da neoformação de vasos sanguíneos (Brum *et al.*, 2020).

Células de pré-odontoblastos hFOB foram semeadas sobre biomaterial à base de colágeno e glicosaminoglicano para verificar a formação de tecido mineralizado. As células se diferenciaram em odontoblastos, que se fixaram na estrutura com 14 dias e iniciaram calcificação dos tecidos com 35 dias, sob indução com 10ng/ml de TGF- β 1 e manutenção com 0,2ng/ml. A mineralização tecidual ocorreu após degradação nas áreas centrais do biomaterial, demonstrando o potencial deste biomaterial (Keogh; O'Brien; Daly, 2010).

Realizou-se um estudo em 14 coelhos machos New Zeland, divididos em 02 grupos, sendo um grupo eutanasiado com 8 semanas. Os animais tiveram sua calvaria submetida a 03 defeitos críticos de 6mm cada. Nos dois primeiros defeitos, foram inseridos dois xenomateriais denominados Bio-Oss e NuOss, ambos os produtos possuíam partículas de 0,25

a 1mm de tamanho e o terceiro defeito permaneceu sem inserção de material. Foram encontradas áreas com osso lamelar, mesclada de tecido neoformado e áreas com apenas tecido recentemente constituído. A quantidade de tecido ósseo neoformado foi 4 vezes maior no produto Bio Oss (Paknejad *et al.*, 2014).

Outro estudo foi conduzido em 12 coelhos New Zeland, adultos, com peso entre 3,5 e 4,0kg, submetidos à cirurgia em calvaria para inserção de um cilindro de titânio de 6mm de diâmetro e 5mm de altura, de cada lado da calvaria. Os cilindros continham material de origem xenógena como controle, e o mesmo material enriquecido por fração mononuclear de medula óssea, como material em avaliação. Os animais foram mortos 8 semanas após a cirurgia e não apresentaram diferença entre os dois grupos. Na avaliação histomorfométrica, foram analisadas 6 áreas em cada peça que mensuraram a presença de tecido vital mineralizado, tecido não vital mineralizado e tecido não mineralizado (Mello *et al.*, 2014).

Os enxertos possuem várias origens, sendo o padrão-ouro aquele oriundo de um sítio do próprio organismo. Este apresenta como uma severa desvantagem a necessidade de dois sítios cirúrgicos, um doador e um receptor (Iaquinta *et al.*, 2019). Dois sítios cruentos aumentam o risco morbidade, adicionando-se a estas limitações, há o custo financeiro de dois procedimentos cirúrgicos (Aludden *et al.*, 2017; Ho-Shui-Ling *et al.*, 2018). Xenógenos são os enxertos que derivam de componentes orgânicos de seres de espécie diversa. O composto xenógeno à base de HA bovina tem sido amplamente utilizado há muitas décadas, contudo traz, como limitação, a pouca solubilidade, podendo ser encontrado anos depois no local da inserção (Jensen *et al.*, 2012).

Um estudo de aumento de seio maxilar em coelhos após 8 semanas, no xeno-enxerto (Bio Oss), encontrou osso lamelar maduro associado ao osso recém-formado, enquanto o β -TCP apresentou aumento da espessura e da densidade do osso recém-formado. O osso lamelar maduro preenchia quase toda cavidade, apresentando osteoblastos e poucos osteoclastos. Poucas partículas do biomaterial encontravam-se presentes no local (Sohn & Moon, 2018).

Os enxertos são um amálgama de materiais submetidos a altas ou baixas temperaturas, cujas composições e a proporção dos insumos variam, sempre perseguindo um equilíbrio entre as propriedades essenciais de osteocondução, osteoindução, osteogênese que permita o reparo ósseo (Iaquinta *et al.*, 2019). Características como biodegradabilidade e biocompatibilidade também são elencadas como importantes para proporcionar ao meio condições de reparo ósseo. A procura por materiais que reúnam estas qualidades tem sido objeto de atenção das indústrias médica e odontológica, sendo perceptível um incremento de cerca de 9% anual de produtos no mercado (Carolina *et al.*, 2019).

Materiais isolados apresentam percentagem diferenciadas das propriedades como biorreabsorção e compatibilidade tecidual, portanto muitos produtos apostam na mescla de materiais para balancear tais propriedades para alcançar a formação óssea. Material alo gênico contendo apenas β -TCP composto por cristais de aproximadamente 80nm de tamanho com área de superfície de $0,06\text{m}^2/\text{g}$ apresenta alta solubilidade em condições fisiológicas (Ishikawa *et al.*, 2018).

A presença do CaP nos materiais de enxertia funciona como um facilitador para a formação de tecido ósseo *in vivo*, por induzir a diferenciação de células osteoprogenitoras e células-tronco presentes nos sítios ósseos (Shih *et al.*, 2013). Este autor, ainda, relata que propriedades como a osteogenicidade e a osteoindutividade dos materiais contendo CaP são dependentes da capacidade do CaP modular tanto os cátions de cálcio (Ca^{2+}) quanto os íons fosfato (PO_4^{3-}), além da capacidade de adsorção e liberação de fatores de crescimento osteoindutores. A regeneração óssea promovida por compostos contendo biomateriais como o CaP tem sido demonstrada por diversos estudos, indicando que, além das características físicas do composto, a velocidade de dissolução e modulação para estruturar o meio extracelular representam atribuição essencial nas funções osteogênicas do CaP (Shih *et al.*, 2013).

A proporção de cada um dos componentes que formam o material para enxertia impacta diretamente no comportamento das características apresentadas pelo produto. Um estudo com 6 ratos, adultos, *Sprague Dawley*, demonstrou que a proporção entre hidroxiapatita e quitosana de 75/25 de peso com 90% de porosidade melhora as propriedades mecânicas e físicas dos enxertos, sendo que a friabilidade do enxerto aumenta se a proporção de HA ultrapassar os 80% da composição (Chatzipetros *et al.*, 2018). Com base neste achado, o autor e colaboradores realizaram um estudo com um enxerto com a proporção de 75/25 de peso de HA e quitosana com $85 \pm 2\%$ de porosidade e poros variando entre 20/100 μm de tamanho, encontrando uma resposta satisfatória em âmbito clínico, durante a inserção do material nos defeitos de tamanho críticos do sítio cirúrgico. Após 8 semanas, os animais foram eutanasiados. Três áreas de cada analisadas, lateral 1, lateral 2 e central, sendo observada a formação de osso na área central do defeito de tamanho crítico, não sendo encontrado infiltrado inflamatório ou células gigantes multinucleadas (Chatzipetros *et al.*, 2018).

Os biomateriais têm sido amplamente investigados, em relação aos materiais empregados e às fases que vão caracterizar a sua composição (Ge *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017). A combinação entre 80% de HA e 20% de β -TCP mostra um

balanceamento entre a manutenção da bioestrutura pela menor degradação da HA permitindo a condução do processo osteoregenerativo. O β -TCP tem sido relatado como mais osteoindutivo que a HA, conduzindo as pesquisas para os diversos tipos de fosfato de cálcio para agregar as propriedades de osteocondução e osteoindução (Brum; Frigo; Elias, 2021).

2. OBJETIVO

Comparar após 8 semanas de inserção, o potencial osteogênico na reparação óssea, em defeitos ósseos críticos, na área temporoparietal de ratos Wistar, de um material xenogênico à base de hidroxiapatita (HA) micrométrica, Bio Oss[®] da marca Geistlich com um biomaterial alo gênico à base de HA e β -trifosfato de cálcio, nanométricos, Blue Bone[®] da marca Regener.

2.1. Objetivos específicos

- a) Quantificar as áreas ossificadas através da coloração por Tricômico de Goldner e imunomarcação por osteopontina;
- b) Quantificar as áreas imunomarcadas por VEGF;
- c) Avaliar qualitativamente a formação de vasos sanguíneos através da imunomarcação com VEGF;
- d) Avaliar qualitativamente a presença de células pela coloração de HE.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, sendo aprovado sob o protocolo 13/2020. Foram utilizados 24 ratos *Wistar*, adultos com 3 meses de idade, machos, com peso variando entre 300 e 350g, produzidos pelo Biotério do Departamento de Histologia e Embriologia do IBRAG, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em gaiolas com três animais desde o nascimento, com acesso, irrestrito, a alimentos e água. O ciclo claro/escuro de 12h e temperatura de 22°C foram mantidos durante o projeto.

3.2. Distribuição dos grupos

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em 3 grupos com 8 animais cada. No grupo CTRL (controle), foi mantido apenas o coágulo obtido pelo sangue oriundo da remoção do tampão ósseo, sem inserção de material, no grupo BO foi introduzida a hidroxiapatita de origem bovina, Bio Oss[®] da marca Gleistlich e, no grupo REG, o defeito foi preenchido com hidroxiapatita sintética associada ao β -trifosfato de cálcio, Blue Bone[®] da marca Regener Biomateriais. Foi inserido em cada defeito ósseo crítico a quantidade de 0,10g de biomaterial (Da Silva Pires *et al.*, 2021), conforme os grupos estabelecidos.

3.3. Biomateriais utilizados no procedimento

Os biomateriais utilizados (Figura 5) nos procedimentos foram: xenoenxerto à base de hidroxiapatita de origem bovina, Bio Oss[®] – Gleistlich e biomaterial à base de hidroxiapatita de origem sintética associado ao β -trifosfato de cálcio, Blue Bone[®] – Regener, constituído por

uma associação de HA (78,76%) ao β -TCP (21,03%) e Óxido de Cálcio (0,19%) do produto comercial Blue Bone, assim como a estrutura nanoparticulada (Da Silva Brum *et al.*, 2019).

Figura 5 - Biomateriais utilizados no projeto



Legenda: (A) Biomaterial Bio-Oss; (B) Biomaterial Blue Bone.

Fonte: A autora, 2021.

3.4. Procedimentos cirúrgicos

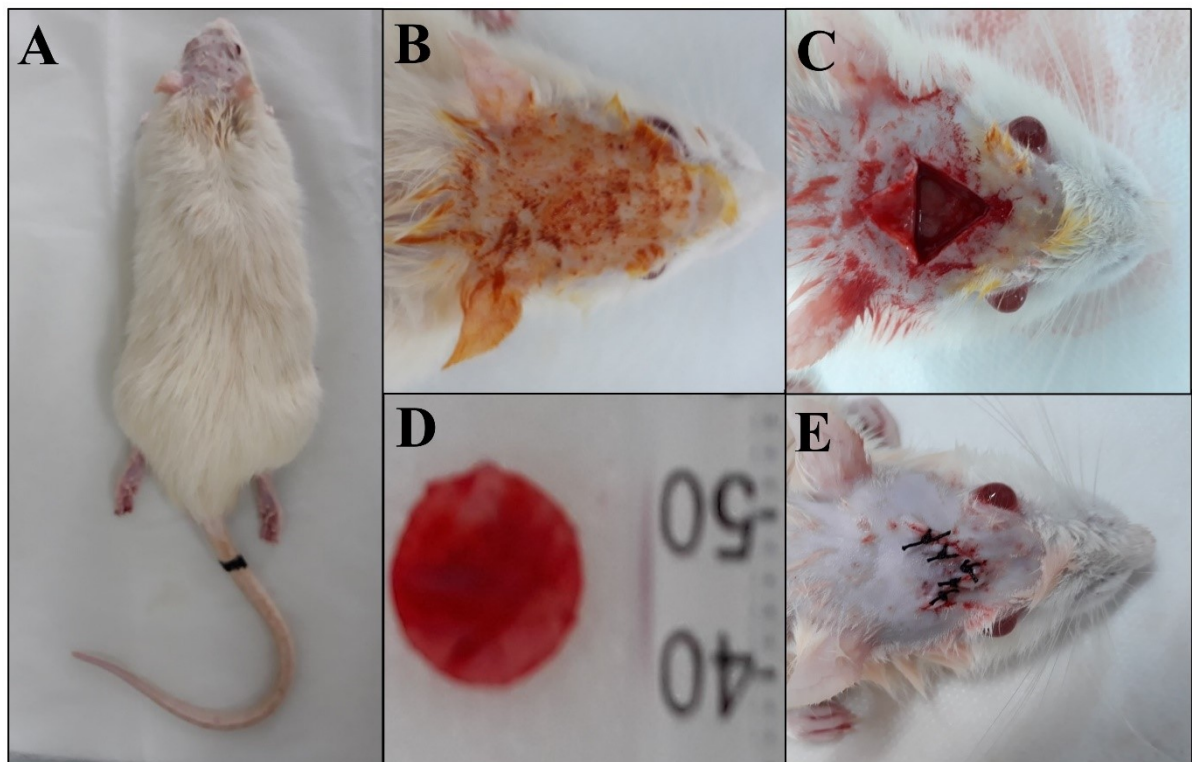
Os procedimentos cirúrgicos foram realizados nas dependências do Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Tecidual do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. A área de escolha para a trefinação foi a calvária dos animais, que sofre pouco estresse mecânico, permitindo avaliar as interações entre os tecidos neoformados e os tecidos circunjacentes (Wang *et al.*, 2017).

A anestesia foi realizada via intraperitoneal, 1mL para cada 100g de uma associação de medicações em 8,5mL de solução salina a 0,9%. As medicações são: 0,2mL de cloridrato de tramadol 5%, correspondente a 2mg/kg, 0,5mL de cloridrato de xilazina 2%, correspondente a 10mg/kg, 1mL de cetamina 10%, correspondente a 100mg/kg, 0,6mL de maleato de midazolam, correspondente a 5mg/kg. Quando necessário, foi repetida 1/3 da solução após 20 minutos.

Após a anestesia de cada espécime, foi realizada a seguinte sequência cirúrgica: tricotomia da região temporoparietal com lâmina de bisturi nº 10 (Figura 6A); antissepsia

com povidine (Figura 6B); incisão triangular com retalho de espessura total com lâmina de bisturi n° 15C; descolamento da pele e periósteo e exposição óssea cirúrgica da região temporoparietal com o descolador de Molt; utilização de trefina de 8 (oito) milímetros de diâmetro (Alpha instrumentos SKU AI6005) com contra-ângulo redutor 20:1 (Driller do Brasil), acoplado ao motor de implante (Driller BLM 600); promoção do defeito ósseo (Figura 6C) crítico de 8 (oito) milímetros até a Dura-máter, tendo sido escolhido este diâmetro para evitar a regeneração óssea espontânea (Dahlin; Alberius; Linde, 2009); descolamento da porção óssea trefinada com espátula de Molt; as peças removidas da calvária dos animais foram descartadas (Figura 6D); inserção do material escolhido ou espera da formação do coágulo, conforme o grupo; reposição do periósteo, pele e sutura do retalho com fio de nylon 3-0 (Figura 6E).

Figura 6 - Sequência de procedimentos cirúrgicos



Legenda: (A) Tricotomia da região temporoparietal; (B) Antissepsia com povidine; (C) Descolamento da pele e periósteo e exposição óssea cirúrgica da região temporoparietal; (D) Peça removida da calvária do animal; (E) Reposição do periósteo, pele e sutura do retalho com fio de nylon 3-0

Fonte: A autora, 2021.

Não foram observados desvios comportamentais provenientes de dor ou distúrbios de alimentação/bebida. A cicatrização ocorreu normalmente, com o crescimento de pelos na

região da cirurgia. Os espécimes não apresentaram sinais de hemorragia, edema ou infecção. Os animais foram eutanasiados 8 semanas após os procedimentos cirúrgicos.

3.5. Eutanásia

Após 8 semanas da inserção dos materiais nos defeitos ósseos, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica, com três vezes o volume aplicado para o procedimento cirúrgico. O crânio dos animais foi processado, realizando-se a divulsão da pele com tesoura e bisturi e separação das vértebras. A mandíbula foi separada por meio de tesoura cirúrgica curva. Cada peça foi colocada em recipiente de plástico contendo o fixador paraformaldeído a 4%, por 1 semana.

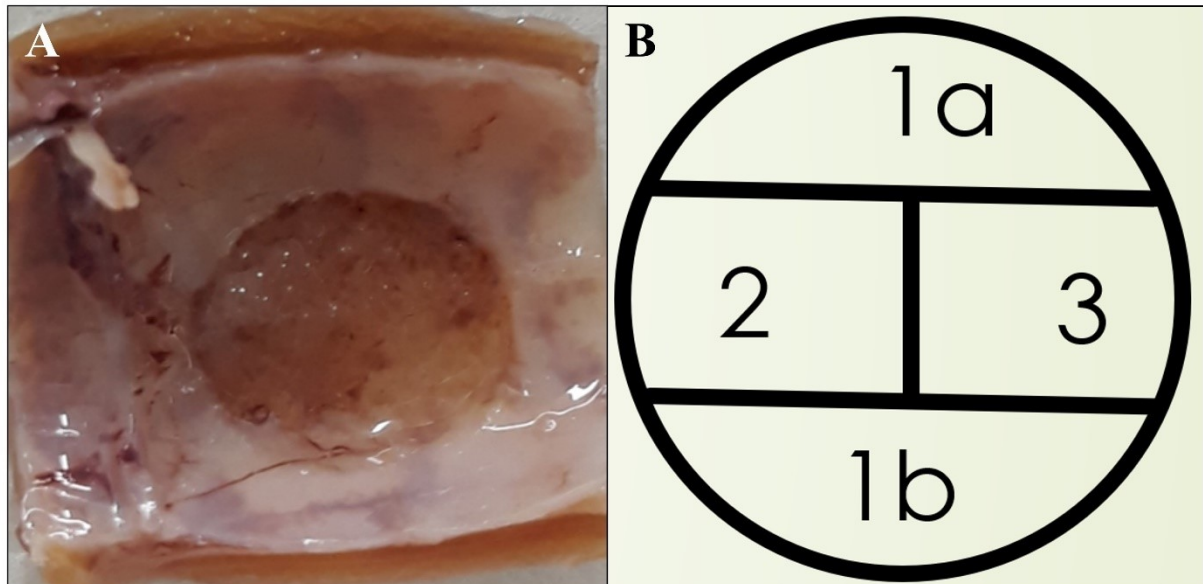
3.6. Protocolo de análise morfológica

Os crânios dos animais foram separados e fixados com paraformaldeído a 4%, por uma semana. Logo, em seguida, descalcificados em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (10,0%), em salina tamponada com fosfato (PBS) (0,1M, pH 7,4), por 50 dias. As trocas do EDTA foram realizadas a cada 03 dias, até se obter uma maleabilidade que possibilitasse a diminuição da peça, para novo recorte, com tesoura cirúrgica. As peças menores continuaram no líquido para descalcificação, com troca a cada três dias, por mais 30 dias, quando, então, estavam adequadas para a clivagem.

A clivagem foi realizada com navalha de aço descartável. A Figura 7A mostra a peça antes da clivagem e um esquema da clivagem da peça. As partes denominadas 1a e 1b (Figura 7B) foram processadas para técnicas histológicas e de imunohistoquímicas, sendo o passo inicial a inserção no cassete, que foi lavado sob água corrente, por duas horas. Em seguida, foram realizados 4 banhos em álcool 70%, 90%, 100% e 100%, por 40 minutos, em cada concentração. Na sequência, ocorreu o banho de álcool e xilol, em iguais proporções, por 10 minutos, e, logo depois, apenas xilol por 10 minutos. O primeiro e segundo banhos de parafina foram de 40 minutos, separados por 24h, em estufa a 60°C. Após o segundo banho, foi realizada a inclusão em Paraplast™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 65°C. Seções

seriadas de 4µm foram cortadas em micrótomo (Americam Optical, modelo Spencer, Estados Unidos). Os cortes foram coletados em lâminas silanizadas, para a realização das técnicas histológicas e de imunohistoquímicas, com montagem em resina de Entellan.

Figura 7 - Peça 30 dias antes da clivagem e esquema de clivagem



Legenda: (A) Defeito produzido na calvária e onde foram colocados os biomateriais de estudo; (B) Esquema da clivagem da peça.

Nota: As partes denominadas 1a e 1b foram processadas para técnicas histológicas e de imunohistoquímicas.

Fonte: A autora, 2021.

3.7. Protocolo de coloração e de imunohistoquímica

As colorações foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Tecidual do IBRAG. As lâminas com os cortes histológicos foram colocadas unidas em uma mola para a realização dos banhos, simultaneamente, diminuindo o risco de alterações.

- Protocolo HE

A coloração com HE permite uma visualização geral dos tecidos. A hematoxilina cora em azul-púrpura as estruturas basófilas e a eosina cora, em vermelho, as estruturas acidófilas. Esta coloração foi realizada pelo método regressivo com corantes Hematoxilina de Harris e eosina. Realizou-se a desparafinização com 2 banhos de xilol (10 minutos, cada) e hidratação sucessiva em álcool (100%, 80%, 70%, por 5 minutos, cada), seguidas de lavagem em água

corrente. Na sequência, coloração com hematoxilina (5 minutos) e com eosina (5 minutos), com lavagem em água corrente logo após cada coloração. Procedeu-se com a desidratação em álcool (70%, 80%, 100%, 100%, por 5 minutos, cada) e clarificação com 2 banhos de xilol (5 minutos e 10 minutos) e montagem.

- Protocolo da coloração do Tricrômico de Goldner

O Tricrômico de Goldner é uma coloração que permite visualizar e caracterizar o tecido osteoide, e as fibras colágenas maduras, dentre outras estruturas. Neste protocolo foram utilizados a hematoxilina férrica de Weigert (10 minutos), lavagem em água corrente e enxágue em água destilada. Logo, a seguir, os cortes foram corados com o corante *Ponceau Acid Fuchsin* por 5 minutos, lavagem com ácido acético a 1%, inseridos em solução de ácido fosfomolibdico *orange G* até que o colágeno fosse descorado e, então, lavados em ácido acético a 1%, por 30 segundos. Em continuação, os cortes foram corados na solução *light-green*, por 5 minutos, lavados em ácido acético a 1%, por 5 minutos, e secagem branda, apenas retirando o excesso. A seguir, os cortes foram mergulhados rapidamente em álcool absoluto, desidratados em álcool a 95% e álcool absoluto, 3 passagens em cada um deles e clarificados em 3 banhos de xilol.

- Protocolo de imunomarcção para Osteopontina (OPN) e Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

A análise imunohistoquímica com marcação para OPN, permite visualizar as áreas marcadas com OPN que é uma proteína não colágena intimamente ligada à hidroxiapatita, realizando a conexão entre os cristais de hidroxiapatita e as células osteoprogenitoras. A marcação apresenta-se como uma coloração acastanhada. A imunomarcção com VEGF permite avaliar o processo de angiogênese, marcando o VEGF ligados a receptores específicos. O VEGF é um modulador celular indutor de mitose em células endoteliais. A marcação apresenta-se na cor acastanhada.

No protocolo para a técnica imunomarcção para OPN e VEGF, inicialmente foram realizadas a desparafinização dos cortes em 3 banhos de xilol (5 minutos), a hidratação em 3 banhos de etanol (100%, 90%, 70% e água destilada – 5 minutos, cada), a incubação dos cortes com peróxido de hidrogênio a 3% diluído em água destilada, por 15 minutos, ao abrigo da luz, para inibir a peroxidase endógena e a lavagem em 3 banhos de tampão PBS pH 7,2 (5 minutos, cada).

- Osteopontina -

Para avaliar a matriz de tecidos ossificados, foi realizada a marcação com OPN em continuação ao processo de marcação descrito acima. No qual foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0 a 60°C, (20 minutos), deixados para esfriar, lavados em 3 banhos de tampão PBS pH 7,2 (5 minutos, cada) e bloqueados os sítios inespecíficos com PBS/BSA a 3%, por 20 minutos. Prosseguiu-se incubando os cortes com o anticorpo primário anti-Osteopontina (Santa Cruz, sc-21742), diluído em PBS/BSA a 1% (1:200), overnight em geladeira (4°C), em câmara úmida e lavados em 3 banhos de tampão PBS pH 7,2 (5 minutos, cada). Na temperatura ambiente, foram incubados com o anticorpo secundário biotilado (VECTASTAIN® Universal Quick HRP Kit) por 1 hora, lavados em 3 banhos de tampão PBS pH 7,2 (5 minutos, cada) e incubados com estreptavidina VECTASTAIN® Universal Quick HRP Kit), por 30 minutos.

- Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) -

No intuito de avaliar qualitativamente a neoformação de vasos sanguíneos, foi utilizado a marcação com VEGF, aferindo-se a quantidade de áreas marcadas e avaliando-se a formação de vasos sanguíneos. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0 a 96°C, (20 minutos), deixados para esfriar, lavados em 3 banhos de tampão PBS pH 7,2 (5 minutos, cada), e depois bloqueados os sítios inespecíficos com PBS/BSA a 3%, por 20 minutos. Prosseguiu-se incubando os cortes com o anticorpo primário anti-VEGF (Santa Cruz, sc-1876), diluído em PBS/BSA a 1% (1:100), overnight em geladeira (4°C), em câmara úmida e lavados em 3 banhos de tampão PBS pH 7,2 (5 minutos, cada). Na temperatura ambiente, incubados com o anticorpo secundário biotilado (VECTASTAIN® Universal Quick HRP Kit) por 1 hora, lavados em 3 banhos de tampão PBS pH 7,2 (5 minutos, cada) e incubados com estreptavidina VECTASTAIN® Universal Quick HRP Kit), por 30 minutos.

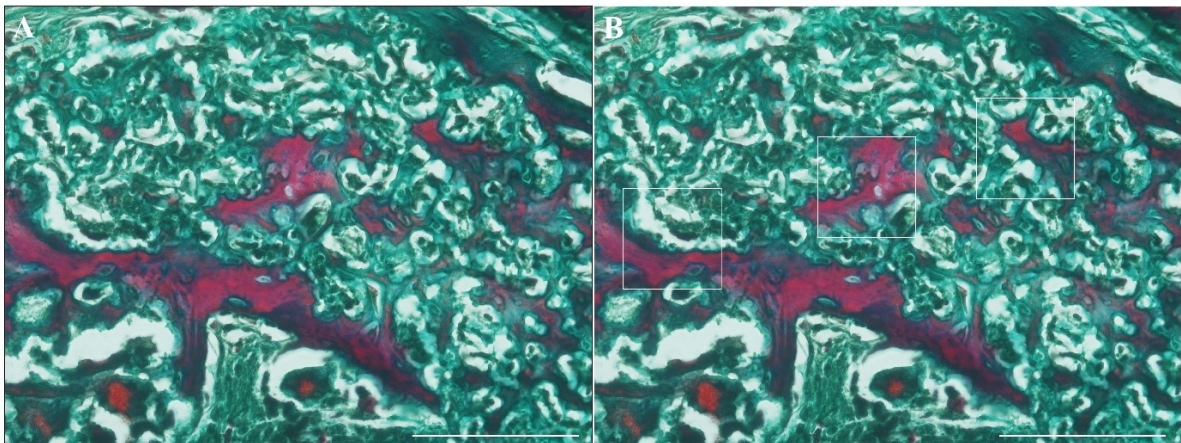
Para finalizar os procedimentos da coloração com Tricômico de Goldner e as marcações da OPN e VEGF nos cortes, realizou-se a lavagem em tampão PBS pH 7,2 e, na sequência, foram revelados com DAB (diaminobenzidina) e corados com hematoxilina. Desidratados (água destilada, etanol 70%, 90% e 100% – 5 minutos, cada), clarificados em 3 banhos de xilol (5 minutos, cada) e montados com Entellan.

3.8 Histomorfometria e aquisição de imagens

Para a histomorfometria foram selecionadas cinco lâminas randomizadas, coradas com Tricrômico de Goldner ou imunomarcadas (Osteopontina e VEGF). Foram fotografadas 3 áreas em cada lâmina, utilizando a lente objetiva de 40x, no microscópio de luz acoplado à câmera digital (Olympus BX53, Olympus DP72 câmera; Olympus). As imagens foram quantificadas usando o software Image Pro Plus versão 7.0; Media Cybernetics.

Foram consideradas áreas coradas em vermelho-acastanhada (representantes de áreas de matriz osteoide) no Tricrômico de Goldner (Figura 8). A coloração acastanhada foi considerada como imunomarcada para OPN (Figura 9) e VEGF (Figura 10).

Figura 8 - Esquema de marcação para histomorfometria com Tricrômico de Goldner

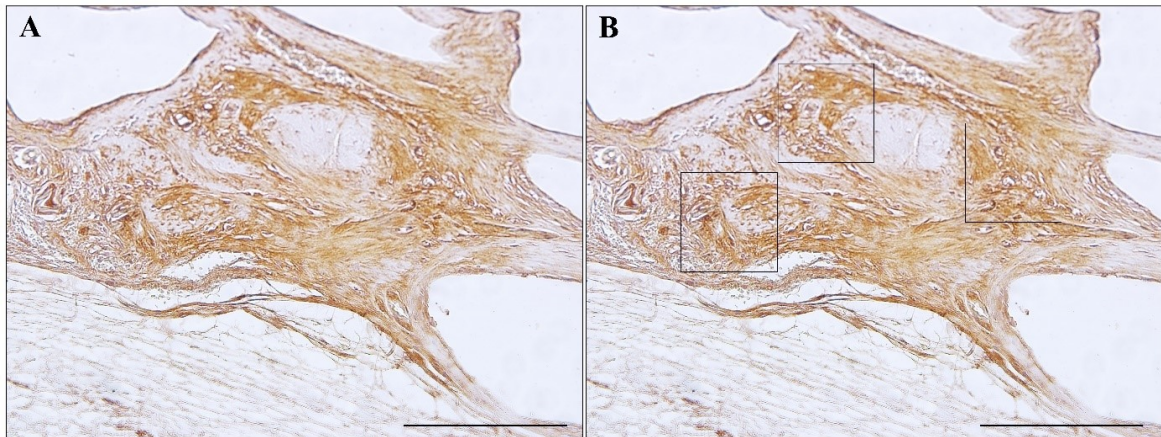


Legenda: (A) Fotomicrografia da coloração por Tricrômico de Goldner; (B) Fotomicrografia com as regiões escolhidas e analisadas.

Nota: Barra de escala 100µm.

Fonte: A autora, 2021.

Figura 9 - Esquema de marcação para histomorfometria com OPN

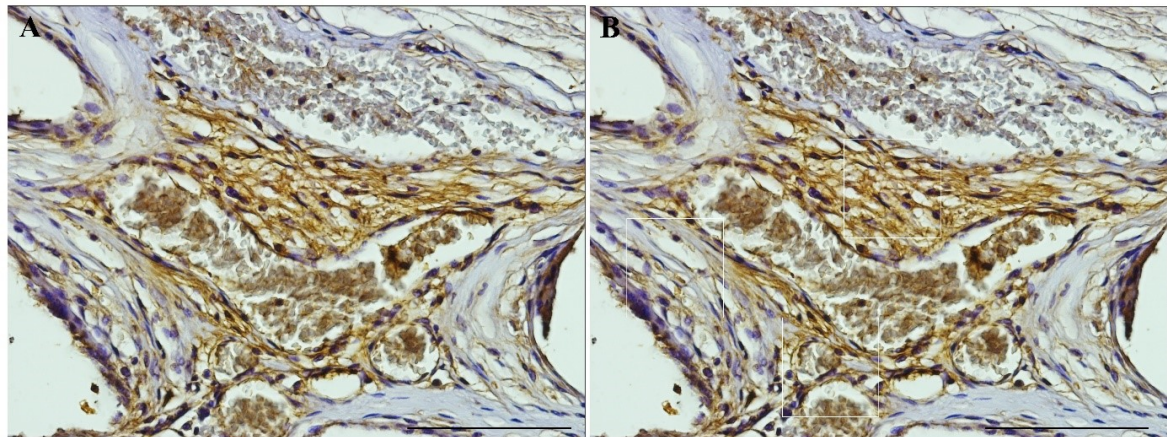


Legenda: (A) Fotomicrografia da imunomarcção com anti-osteopontina; (B) Fotomicrografia com as regiões escolhidas e analisadas.

Nota: Barra de escala 100µm.

Fonte: A autora, 2021.

Figura 10 - Esquema de marcação para histomorfometria com VEGF



Legenda: (A) Fotomicrografia da imunomarcção com anti-VEGF; (B) Fotomicrografia com as regiões escolhidas e analisadas.

Nota: Barra de escala 100µm.

Fonte: A autora, 2021.

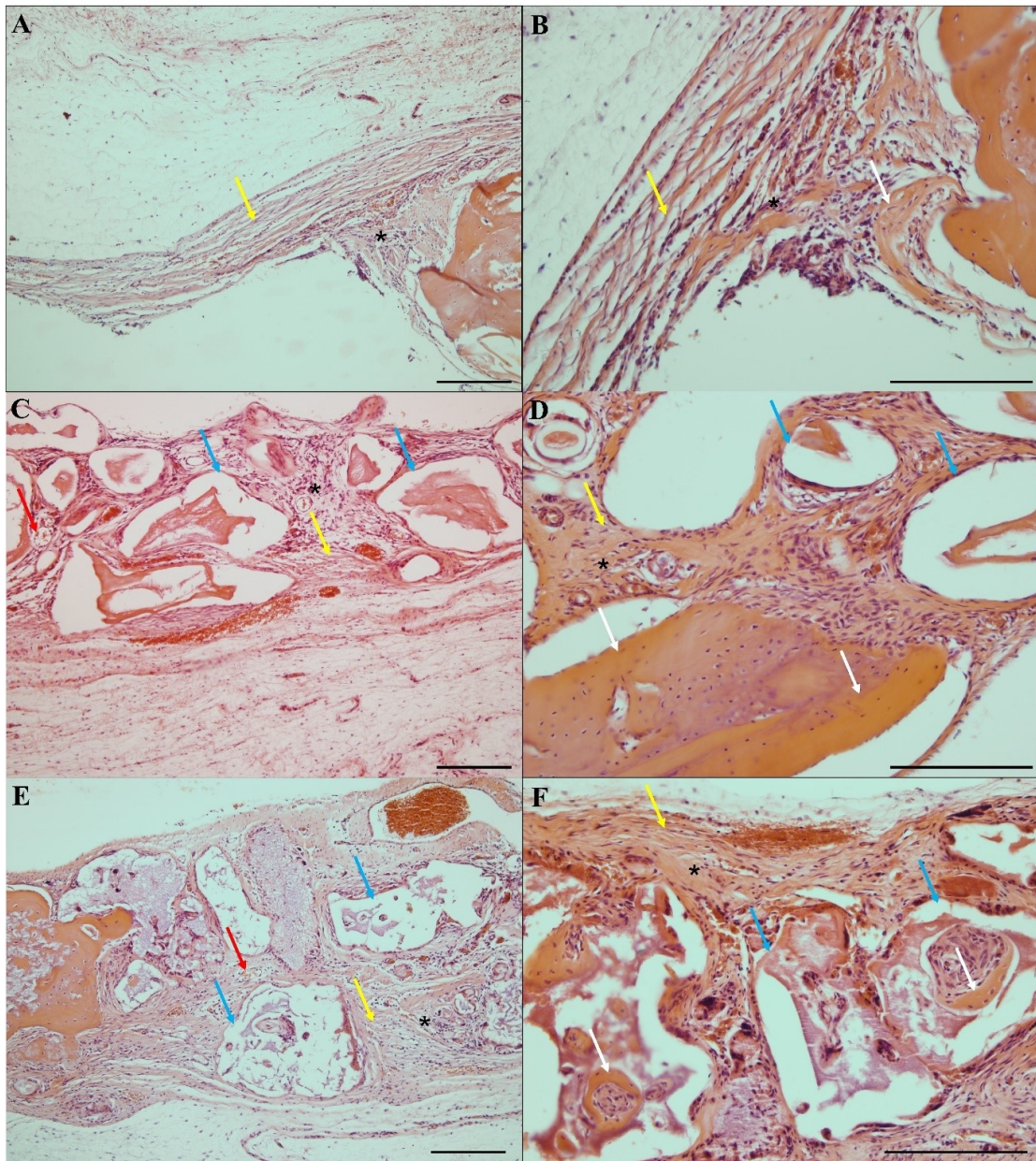
3.9. Análise estatística

Os dados foram analisados usando ANOVA one-way, seguido pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) e pós-teste de Dunn. Todas as análises foram realizadas com software específico (GraphPad Prism Versão 8.0 e BioEstat 5.0). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

4. RESULTADOS

A cor levemente avermelhada registrada na coloração com HE revelou que o Grupo CTRL, no qual não houve inserção de material (Figura 11A e 11B), formou apenas tecido conjuntivo (seta amarela). No Grupo BO, que recebeu a HA microparticulada (Figura 11C e 11D), a marcação mostra a estrutura remanescente do xenomaterial (seta azul), entremeado por tecido conjuntivo (seta amarela), pequenos vasos sanguíneos (seta vermelha) e tecido ossificado (seta branca), apresentou invasão de células dispersas no tecido conjuntivo, indicadas pelos núcleos celulares (asteriscos). O Grupo REG, no qual foi inserido a nano-HA/ β -TCP (Figura 11E e 11F), mostrou o remanescente do material alogênico (seta azul) disperso no tecido conjuntivo (seta amarela) com a presença de vaso sanguíneo (seta vermelha), diversas células dispersas indicadas pelos núcleos celulares (asteriscos) e tecido ossificado (seta branca). Os Grupos BO (Figura 11D) e REG (Figura 11F) apresentaram, associadas às estruturas dos biomateriais, regiões com intensa coloração avermelhada no interior e nas margens. Estas regiões podem ser indicativas de áreas de formação de tecido duro com células correlacionadas a este processo.

Figura 11 - Coloração com HE



Legenda: (A) e (B) grupo CTRL; (C) e (D) grupo BO; (E) e (F) grupo REG.

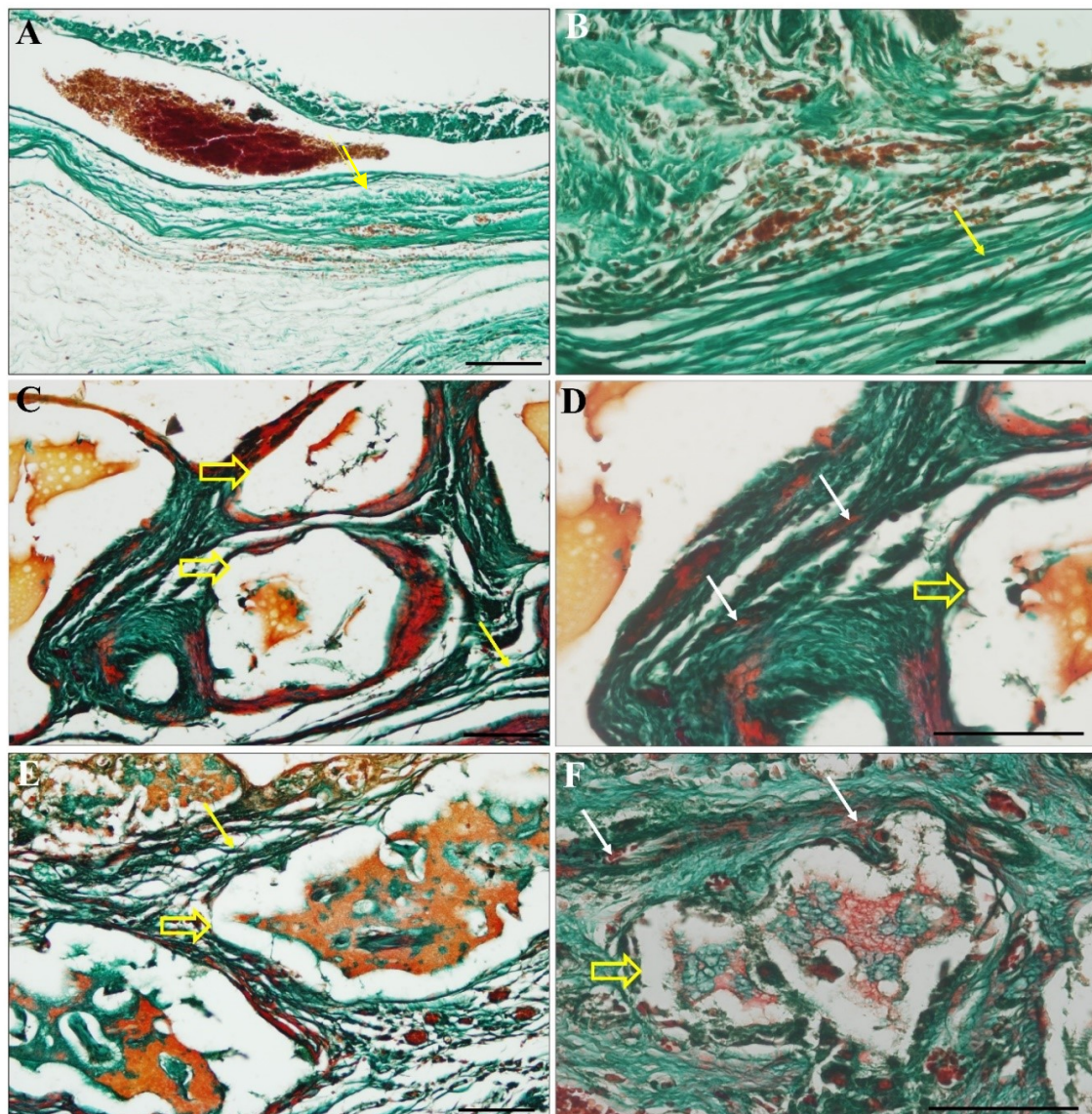
Nota: Fotomicrografias da região da calvária de ratos *Wistar* corados com hematoxilina e eosina. Seta amarela em (A) e (B) representa tecido conjuntivo; Setas azuis em (C) e (D) representam estrutura remanescente do xenomaterial, a seta amarela representa tecido conjuntivo, a seta vermelha representa pequenos vasos sanguíneos e setas brancas representam regiões com áreas ossificadas. Seta azul em (E) e (F) representa material alógeno disperso no tecido conjuntivo (seta amarela), seta vermelha representa vaso sanguíneo e setas brancas representam regiões com áreas ossificadas, * indicam núcleos celulares. Barra de escala 100µm.

Fonte: A autora, 2021.

O Tricrômico de Goldner apresenta as fibras colágenas com a coloração em verde, enquanto as áreas com recente ossificação apresentam a coloração vermelho-acastanhada. A análise histológica da região corada, que sofreu o defeito crítico, revelou que o Grupo CTRL, no qual não houve inserção de material (Figura 12A e 12B), apenas formou tecido conjuntivo

(seta amarela). A coloração de Tricrômico de Goldner revelou, nos Grupos BO com xenomaterial (Figura 12C e 12D) e Grupo REG com material alo gênico (Figura 12E e 12F), a presença do biomaterial (seta amarela vazada) suportado por fibras colágenas coradas (seta amarela). Além de apresentar tecido ossificado em diversas áreas, no interior da trama de fibras colágenas, (seta branca) que representam áreas associadas a material osteoide indicativo de recente neoformação.

Figura 12 - Coloração com Tricrômico de Goldner



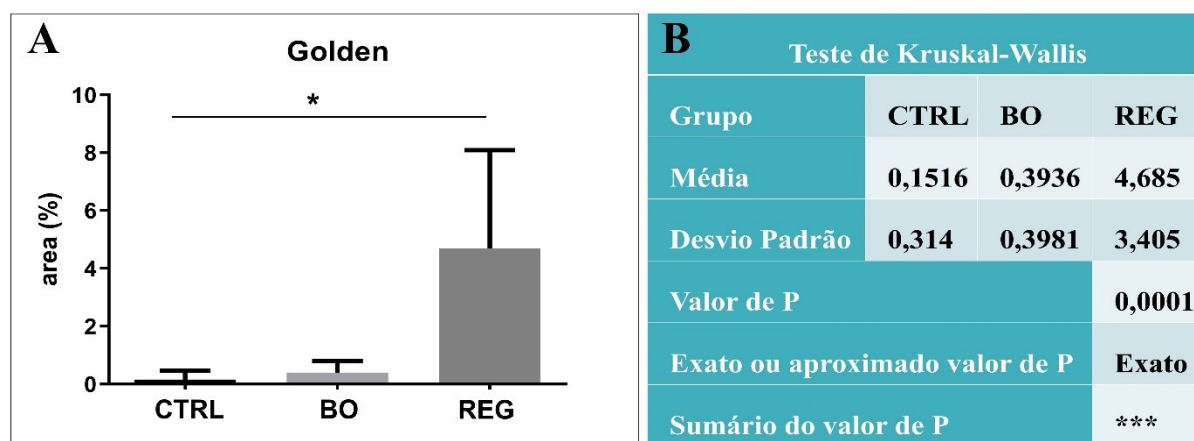
Legenda: (A) e (B) grupo CTRL; (C) e (D) grupo BO; (E) e (F) grupo REG.

Nota: Fotomicrografias da região da calvária de ratos *Wistar* corados com Tricrômico de Goldner. Seta amarela em (B) e (C) representa tecido conjuntivo; Seta amarela vazada em (C), (D), (E) e (F) representa estrutura remanescente do xenomaterial e material alo gênico. A seta branca representa áreas associadas a material osteoide indicativo de recente neoformação. Barra de escala 100µm.

Fonte: A autora, 2021.

Nos resultados apresentados pela histomorfometria em cortes corados com o Tricrômico de Goldner, ao observar-se o gráfico na Figura 13A, visualiza-se que o achado foi estatisticamente significativo entre os Grupos CTRL e REG ($P < 0,0001$). A Figura 13B apresenta a média de áreas coradas com Tricrômico de Goldner: 0,15%, no Grupo CTRL; 0,39%, no Grupo BO; e 4,68%, no Grupo REG. Com estes dados, pode-se constatar que a média da quantidade de áreas coradas pelo Tricrômico de Goldner, que expressa deposição de tecido ósseo neoformado, foi mais de 10 vezes maior no Grupo REG que no Grupo BO. Neste caso, pode-se inferir que houve uma acentuada deposição de osso imaturo no Grupo REG tratado com o biomaterial alogênico.

Figura 13 - Gráfico e tabela com dados histomorfométricos para Tricrômico de Goldner



Legenda: (A) gráfico da quantificação marcação Tricrômico de Goldner e (B) tabela com os valores da quantificação da marcação com Tricrômico de Goldner

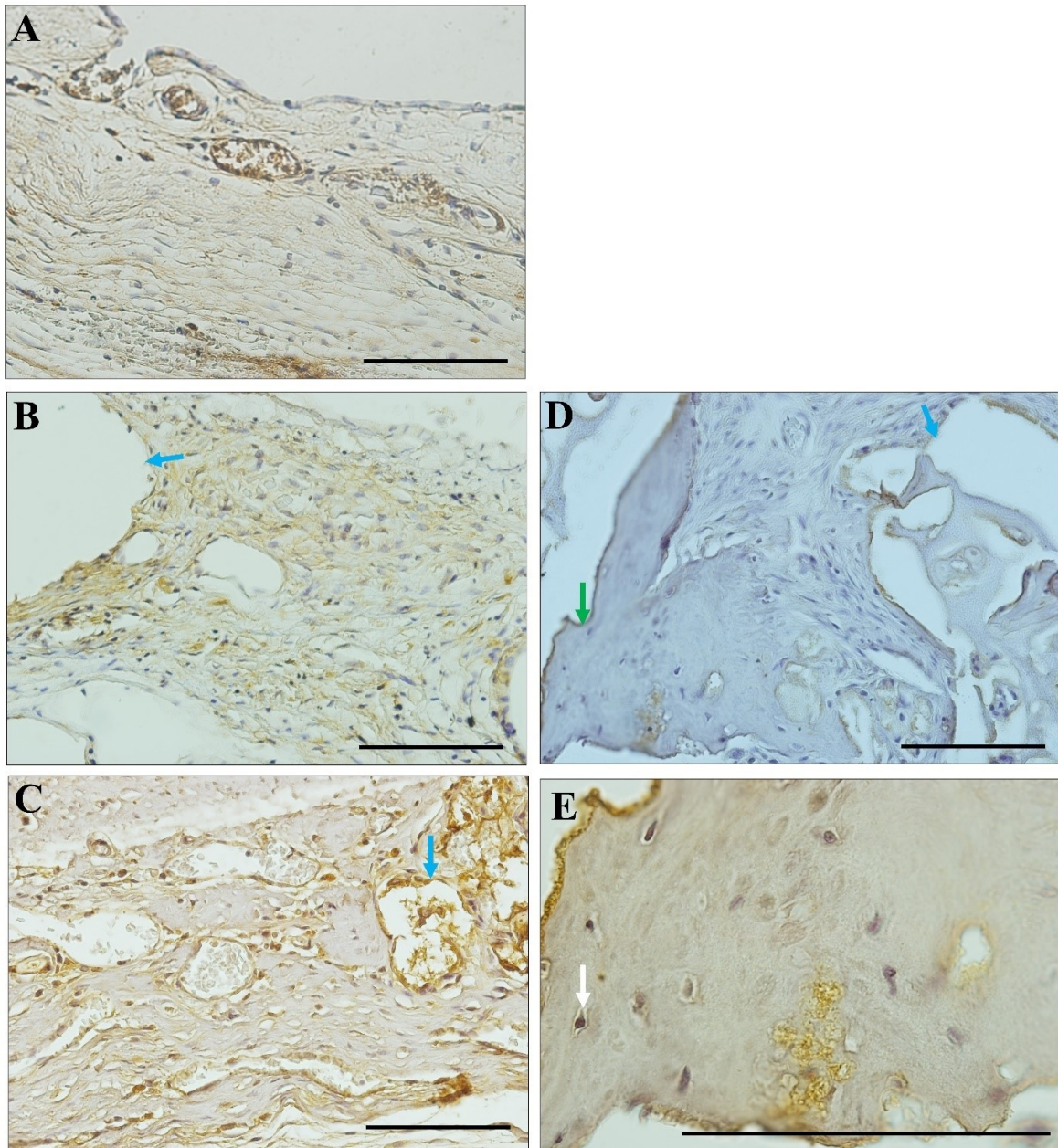
Nota: CTRL= grupo controle, BO= grupo Bio Oss e REG= grupo Blue Bone. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (****) = $P \leq 0,0001$.

Fonte: A autora, 2021.

A análise imunohistoquímica foi realizada com marcação para OPN, que apresentou a coloração acastanhada. Com relação à marcação com OPN, no Grupo CTRL mostrou-se dispersa por toda região, apresentando leve marcação na cor acastanhada (Figura 14A), demonstrando poucos indícios de ossificação na região.

O biomaterial (seta azul) foi encontrado no local, no Grupo BO (Figura 14B) e Grupo REG (Figura 14C). Em ambos os grupos, foram encontradas áreas de marcações pela OPN com coloração acastanhada mais intensa, dispersa por toda região. No Grupo REG (Figura 14D), imunomarcado pela OPN, foi encontrada uma região ossificada (seta verde) e na Figura 14E visualiza-se o enclausuramento de células de linhagem osteogênica (seta branca).

Figura 14 - Imunohistoquímica para Osteopontina



Legenda: (A) grupo CTRL; (B) grupo BO; (C), (D) e (E) grupo REG.

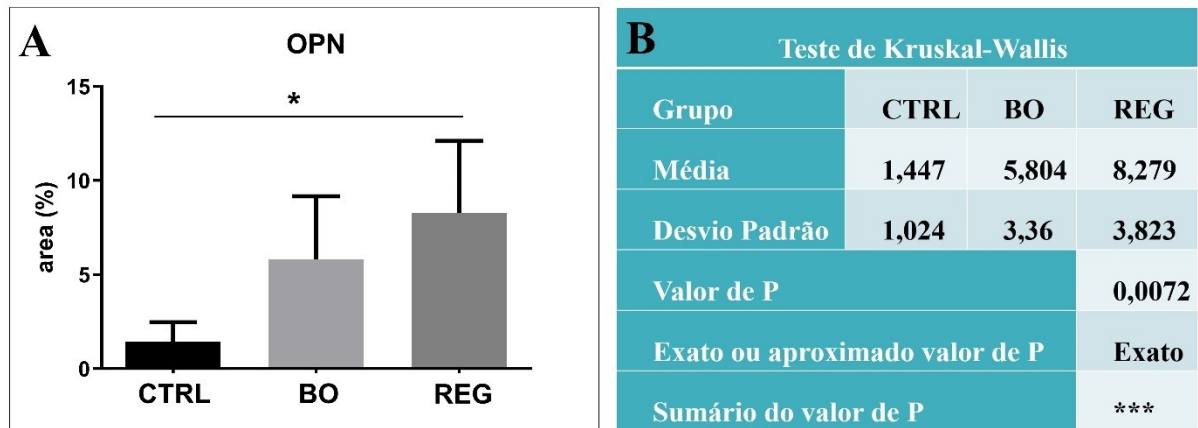
Nota: Fotomicrografias da região da calvária de ratos *Wistar* imunomarcadas para osteopontina. Seta azul representa estrutura remanescente do xenomaterial e material alogênico. A seta verde representa região ossificada no grupo REG e seta branca célula de linhagem osteogênica enclausurada. Barra de escala 100µm.

Fonte: A autora, 2021.

No Gráfico da Figura 15A encontra-se a quantificação dos achados da histomorfometria com a Osteopontina, que demonstram um resultado significativo entre os grupos CTRL e REG ($P < 0,0072$). A tabela na Figura 15B mostra a quantidade de áreas marcadas com OPN: 1,45%; 5,80% e 8,28%, nos grupos CTRL, BO e REG, respectivamente. Com relação aos dados dos Grupos BO e REG, foi encontrada uma quantidade 29,46% maior

de áreas marcadas com Osteopontina no Grupo REG que no Grupo BO. Este achado demonstra uma possível invasão por células de linhagens osteogênicas no Grupo REG.

Figura 15 - Gráfico e tabela com dados histomorfométricos para osteopontina



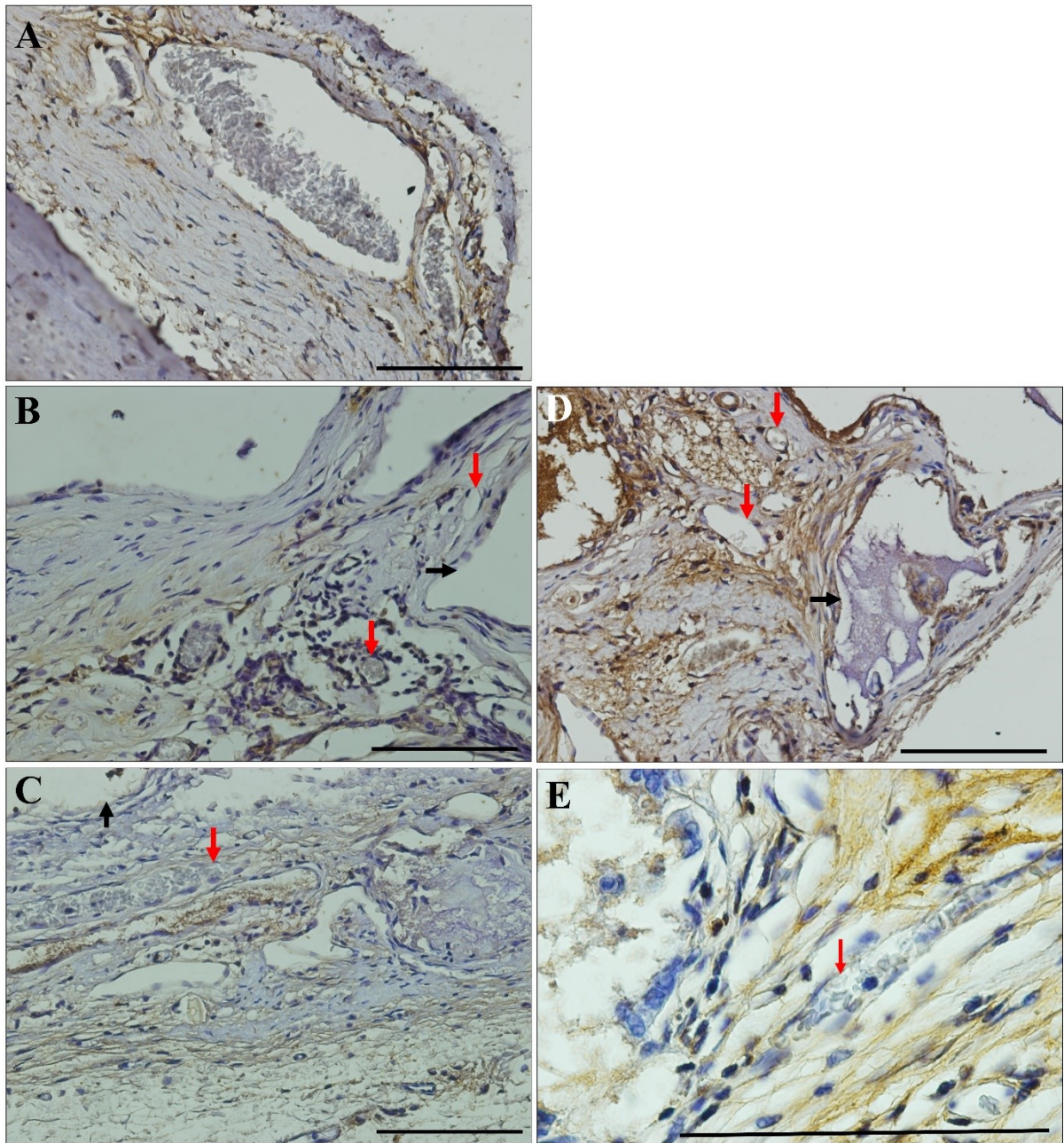
Legenda: (A) gráfico da quantificação da imunomarcagem para osteopontina e (B) tabela com os valores da quantificação da imunomarcagem para osteopontina

Nota: OPN= osteopontina, CTRL= grupo controle, BO= grupo Bio Oss e REG= grupo Blue Bone. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (****) = $P \leq 0,0072$.

Fonte: A autora, 2021

A imunomarcagem com VEGF apresentou regiões com coloração acastanhada associada aos três grupos, sendo menos intensa no Grupo CTRL (Figura 16A). Nos grupos em que foram inseridos o biomaterial (seta preta), este permaneceu no local. Nos Grupos BO (Figura 16B) e REG (Figura 16C), a coloração mais intensamente marcada demonstra uma grande atividade direcionada à angiogênese. No Grupo REG pode ser visualizada a formação ampla de vasos sanguíneos (seta vermelha) com aparente proliferação de células endoteliais (Figura D e E).

Figura 16 - Imunohistoquímica para VEGF



Legenda: (A) grupo CTRL; (B) grupo BO; (C), (D) e (E) grupo REG.

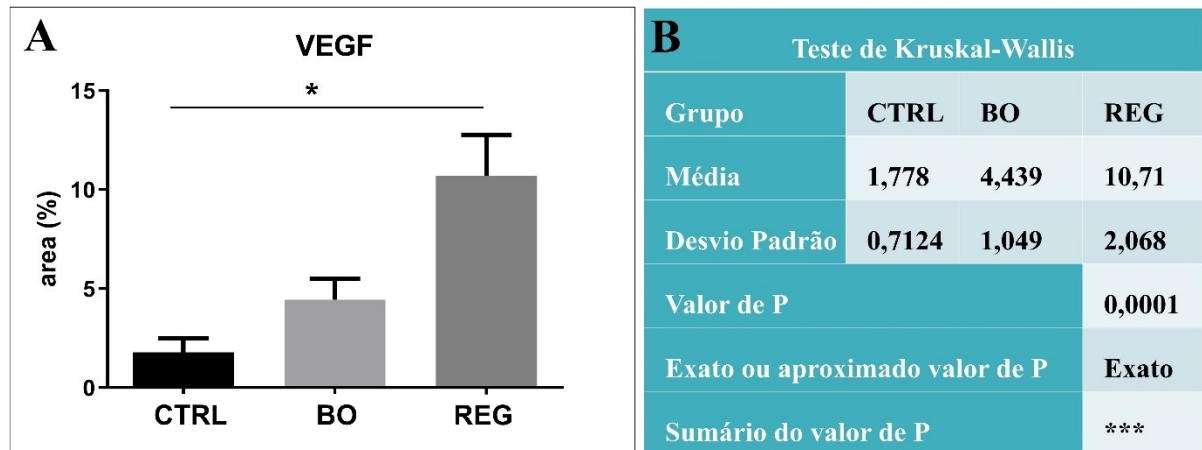
Nota: Fotomicrografias da região da calvária de ratos *Wistar* imunomarcadas para VEGF. Seta preta (B) e (C) demonstra que o biomaterial permaneceu no local de inserção. Seta vermelha em (B), (C), (D) e (E) representa os vasos sanguíneos. Barra de escala 100 μ m.

Fonte: A autora, 2021.

No Gráfico da Figura 17A, os dados histomorfométricos com VEGF demonstraram que foi estatisticamente significativo o resultado entre os grupos CTRL e REG ($P < 0,0001$). A tabela na Figura 17B mostra a quantidade de áreas marcadas com VEGF: 1,78%, no grupo CTRL; 4,44%, no grupo BO e 10,71%, no grupo REG. A Tabela comprova que, no Grupo REG, a média da quantidade de áreas marcadas com o VEGF foi 58,55% maior que no Grupo

BO. Estes dados demonstram um intenso recrutamento de células endoteliais que participam ativamente da angiogênese. No Grupo REG foi encontrado grande número de vasos sanguíneos (Figuras 16D e 16E).

Figura 17 - Gráfico e tabela com dados histomorfométricos para VEGF



Legenda: (A) gráfico da quantificação da imunomarcagem para VEGF e (B) tabela com os valores da quantificação da imunomarcagem para VEGF

Nota: VEGF= Fator de crescimento endotelial vascular, CTRL= grupo controle, BO= grupo Bio Oss e REG= grupo Blue Bone. As barras de erro representam o desvio padrão da média. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (****) = $P \leq 0,0001$.

Fonte: A autora, 2021.

5. DISCUSSÃO

A análise dos dados, histológicos, imunohistoquímicos e histomorfométricos do presente trabalho, mostra a presença de estruturas claramente comprometidas com o processo de osteogênese. O biomaterial nanoparticulado demonstrou uma alta capacidade na indução deste processo, estruturando o ambiente.

A disponibilidade de um fluxo regular dos íons cálcio e fosfato é de extrema importância para a regulação das propriedades da matriz extracelular sobre a superfície do biomaterial com influência direta na regeneração óssea, por afetar o tecido ósseo mineralizado em formação (Jeong *et al.*, 2019; Poundarik *et al.*, 2018). A transferência do Ca^{2+} extracelular, por meio dos canais de cálcio, influencia a diferenciação de células da linhagem osteogênica e promove a ativação de genes que regulam vários fatores de crescimento (Majidinia; Sadeghpour; Yousefi, 2017; Shih *et al.*, 2013). Estudos sugerem a existência de uma regulação intrínseca do comportamento de fatores de crescimento (FGF2, TGF- β 1) e expressão de genes relacionados com OPN, OC e sialoproteínas sob a influência dos íons cálcio (Lee *et al.*, 2018; Majidinia; Sadeghpour; Yousefi, 2017). A avaliação da concentração de Ca^{2+} extracelular, semeada em células C3H10T1/2 e MSCs-BM, constatou uma expressão acentuada de fatores de crescimento e OPN quando ocorre um incremento na concentração de Ca^{2+} extracelular (Lee *et al.*, 2018). A elevação da concentração de íons cálcio é o gatilho para iniciação do processo de mineralização. Em nosso estudo, o biomaterial analisado possui uma das fases composta pelo β -TCP, cuja degradação disponibiliza íons bioativos, como o Ca^{2+} , que desencadeiam os processos fisiológicos, induzindo o reparo ósseo. Uma quantidade de OPN maior (29,46%) foi encontrada no grupo de animais tratados com o biomaterial de duas fases em relação ao biomaterial composto apenas por hidroxiapatita, retratando que a liberação, de forma gradual, de íons de cálcio e de fosfato altera sua concentração no meio, incrementando a mineralização. A comparação da quantidade de tecido ossificado entre o grupo tratado com apenas o coágulo e o tratado com o material à base do HA e β -TCP foi significativa (Figura 15A).

Na avaliação de resposta quimiotática do Ca^{2+} extracelular pode-se concluir que este, induz o recrutamento celular e proporciona a adequada regulação de citocinas nas células progenitoras (Aquino-Martínez; Monroe; Ventura, 2018).

A cascata de sinalização da Wnt, que é um gene que secreta uma glicoproteína modificada por lipídio que regula a polaridade celular, movimentos morfogenéticos, e

desenvolvimento do eixo em vertebrados (De, 2011), também encontra-se associada a expressão de fatores ósseos, como: fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteopontina e osteocalcina que estimula a osteogênese (Kook, 2015), além de influenciar a expressão de genes que codifica fatores específicos do tecido ósseo, dentre eles o gene que codifica a β -catenina, essencial para diferenciação dos osteoblastos (Schlesinger et al., 2019). A via de sinalização Wnt/ Ca^{2+} tem um importante papel no desenvolvimento de vários órgãos (De, 2011), sendo que a via Wnt/ β -catenina influencia a formação e manutenção do tecido ósseo encontrando-se interligado com a apresentação do fenótipo do osso (Duan, 2016). A Conexina43 (Cx43) é uma proteína ligada à vitalidade e função de osteoprogenitoras, essencial para sua diferenciação, sendo encontrada nas lacunas das junções comunicantes, na membrana e nos hemicanais das células do tecido ósseo. A Cx43 é essencial para homeostase e regeneração deste tecido (Wagner *et al.*, 2017). A expressão de Cx43, de sialoproteínas e de fosfatase alcalina é estimulada pelo aumento na concentração do Ca^{2+} extracelular (Wagner *et al.*, 2017). A diminuição da expressão da Cx43 influencia negativamente, a mineralização óssea promovendo alterações na diferenciação e função dos osteoblastos (Lecanda *et al.*, 2000). No nosso estudo, o biomaterial bifásico, propiciou a liberação de Ca^{2+} propiciando a ossificação dos tecidos mostrado na Figura 12D e F, que apresentou núcleos de tecidos ossificado na coloração avermelhada, entremeado por fibras colágenas e mostrou uma quantidade 10 vezes maior de tecido ossificado (Figura 13B) na relação entre o biomaterial com apenas HA e o biomaterial contendo HA e β -TCP.

O biomaterial deve fornecer suporte para a formação inicial microvascular e para a adesão das células ósseas do hospedeiro no defeito ósseo, sendo que, sob a estimulação do biomaterial, as células ósseas são reativas, formando uma região osteogênica ao seu redor, exercendo assim o papel de condução óssea (Ge *et al.*, 2019; Petersen *et al.*, 2018). Biofuncionalmente, as características composicionais do material, incluindo taxa de reabsorção, a porosidade e tamanho de poro, são fatores importantes para biomateriais que necessitam suportar a estrutura óssea. Isto promove o crescimento ósseo e apoia a neovascularização. Ao mesmo tempo, o interior do andaime ósseo precisa ter espaços interligados, proporcionando proteção para a invasão da célula, para a formação do vaso sanguíneo e para o metabolismo dos nutrientes. Um tamanho de poro de pelo menos $40\mu\text{m}$ demonstrou ter o potencial para o desenvolvimento do crescimento ósseo, enquanto um tamanho de poro de $100\text{-}350\mu\text{m}$ é considerado adequado para o crescimento ósseo (Chatzipetros *et al.*, 2018; Ge *et al.*, 2019; Jeong *et al.*, 2019). A estrutura nanoparticulada dos biomateriais deve funcionar como um arcabouço biocompatível associado à migração de

células conciliáveis com o processo de osteogênese, condicionando a estrutura para a adesão celular (Hu *et al.*, 2015). No nosso estudo, a menor taxa de reabsorção da hidroxiapatita em relação ao β -TCP permitiu inferir que o arcabouço organizado pelo material proporcionasse condições estruturais mais adequadas para suportar as cargas fisiológicas, nos estágios iniciais da mineralização, devido à permanência da hidroxiapatita. A característica nanoparticulada da HA em relação ao produto com HA microparticulada permitiu melhores condições biofuncionais, que direcionaram a diferenciação celular e intensa proliferação vascular, como demonstrado no achado imunohistoquímico com VEGF (Figura 16).

A regeneração dos tecidos mineralizados, assim como dos diversos tecidos do organismo, é intimamente dependente da angiogênese. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um modulador celular indutor de mitose relacionado à proliferação de células endoteliais e de vasos sanguíneos, além de aumentar a permeabilidade vascular e contribuir para a formação de edema (Da Silva Pires *et al.*, 2021; Diomedea *et al.*, 2020; Harada *et al.*, 1994). A própria criação do sítio cirúrgico, associada aos substitutos ósseos, pode incrementar a neovascularização, produzindo o suporte necessário, inicialmente requerido, pela osteogênese (Da Silva Pires *et al.*, 2021). A formação de novos vasos é essencial para o aporte nutricional das estruturas em desenvolvimento, encontrando-se esta atividade intimamente relacionada ao VEGF secretado pelos osteoblastos (De Campos Pessoa *et al.*, 2020; Harada *et al.*, 1994; Lopes *et al.*, 2019). Em um estudo analisando as propriedades de uma nano-hidroxiapatita e blocos de coralina recobertos por VEGF encontrou-se uma maciça migração de células endoteliais com a formação de uma rede de vasos não uniformemente distribuída, que aumenta de densidade em relação ao tempo (Du *et al.*, 2015). Biocerâmicas de hidroxiapatita carbonatada modulam a quantidade de VEGF local, além de realizar interações iônicas devido a sua rugosidade superficial (Adams *et al.*, 2013). A biocompatibilidade do material testado em nosso estudo demonstrou que a combinação de diferentes fases do material agrega propriedades que modulam a ação do VEGF. O biomaterial estimula a proliferação de vasos sanguíneos, pois admite a invasão de microvasos através da trama estabelecida pelo material nanométrico e seus poros permitindo o suporte nutricional as estruturas em formação (Figura 16).

Os osteoblastos permanecem em estado quiescente ao longo da medula óssea, juntamente com as demais células osteoprogenitoras. Além disso, deve-se levar em consideração que as células osteoprogenitoras se dispõem no perímetro à volta dos capilares, numa distância de cerca de 20 μ m. Os vasos podem ser do tipo H, que são mais superficiais e responsáveis pela regulação das atividades osteoblásticas e os vasos do tipo L, que são uma

extensão dos capilares tipo H, sinusoidais, penetrando nas concavidades dos tecidos ósseos. Os capilares sinusoidais têm, em geral, uma maior quantidade de células progenitoras à sua volta (Grosso *et al.*, 2017; Kunisaki *et al.*, 2013). Após a inserção do biomaterial, é essencial o recrutamento das células osteoprogenitoras para povoar as camadas mais internas do arcabouço. A sinalização das células circunjacentes leva à produção de fatores que inicializam o processo de osteogênese, e a capacidade do material de adsorver as moléculas e células tem relação direta com a área superficial disponível pelo material. A biocerâmica composta por HA-TCP libera Ca^{2+} mais rapidamente, além de apresentar uma superfície rugosa e irregular que incrementa a adesão celular, conduzindo a síntese e mineralização do MEC (Seol *et al.*, 2014). O material nanométrico tem 50% mais área superficial que o material micrométrico, que permite maior aporte de área para impregnação de líquidos (Da Silva Brum *et al.*, 2019). O material que estudamos, por suas características intrínsecas como maior área e porosidade, influencia positivamente para a maior adsorção de proteínas, contribuindo, favoravelmente, para a celularidade e neoformação óssea, que conduz à regeneração óssea. A coloração com HE (Figura 11) mostra inúmeros núcleos celulares, corados na cor azul. No entanto, não é possível precisar quais as células que invadiram o local, pois isso não fez parte do escopo do estudo. A coloração com Tricrômico de Goldner permitiu aferir a intensa produção de material recentemente ossificado (Figura 13B). Este estudo apresentou, em seus achados imunohistoquímicos com osteopontina (Figura 15B), um aumento na quantidade de áreas marcadas dos grupos BO e REG em relação ao grupo CTRL, suportando a inferência de que a área superficial dos biomateriais permite a adsorção de moléculas que recrutam células da linhagem osteogênica para a produção de material mineralizado. O biomaterial nanométrico apresentou áreas com enclausuramento de células de linhagem osteogênica (Figura 14E)

No nosso estudo, a imunohistoquímica demonstrou uma relevante quantidade de áreas marcadas com VEGF, que induz à neoangiogênese, e, associado a este achado, na coloração com Tricrômico de Goldner, que demonstra a neoformação de tecido ossificado, foi encontrada uma enorme quantidade de áreas coradas. A análise dos dados de forma conjugada nos permite avaliar que, apesar do tempo de observação, o material bifásico e nanoparticulado apresentou resultados promissores.

CONCLUSÕES

O nosso estudo demonstrou as variadas propriedades que o biomaterial alogênico, nanoparticulado, à base de hidroxiapatita e β -TCP apresenta, como bioatividade e biocompatibilidade. Podemos afirmar que o biomaterial mostrou-se perfeitamente adequado para uso em áreas que necessitem de regeneração óssea guiada, pois:

- a) Ostentou maior quantificação de áreas ossificadas coradas por Tricrômico de Goldner e imunomarcadas por osteopontina em relação ao biomaterial microparticulado;
- b) Apresentou um incremento nas áreas imunomarcadas por VEGF, que propicia a migração e a proliferação de células endoteliais, além de fatores de crescimento responsáveis pela formação de vasos sanguíneos;
- c) Induziu a neoangiogênese, segundo a observação de uma extensa proliferação de vasos sanguíneos, conforme dados qualitativos da avaliação imunohistoquímica do VEGF;
- d) Propiciou o recrutamento de diversas células para o local, conforme avaliação qualitativa verificada nos cortes com a coloração por HE, além de apresentar células enclausuradas na matriz recém-formada mostrada na imunomarcção por osteopontina.

O biomaterial alogênico apresentou características que necessitam de futuras e cuidadosas análises, para elucidar os mecanismos subjacentes da osteogênese e compreender os padrões da maturação óssea.

REFERÊNCIAS

- Adams, B. R. *et al.* Osteoblast response to nanocrystalline calcium hydroxyapatite depends on carbonate content. *J Biomed Mater Res*, v. 102, p. 3237–3242, 2013.
- Aludden, H. C. *et al.* Lateral ridge augmentation with Bio-Oss alone or Bio-Oss mixed with particulate autogenous bone graft: a systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 46, n. 8, p. 1030–1038, 2017.
- Andrade, A. D. *et al.* Biologia óssea: uma revisão da literatura. *Revista IMPLANTNEWS*, v. 4, n. 6, p. 659–662, 2007.
- Ansari, M. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Progress in Biomaterials*, v. 8, n. 4, p. 223–237, 2019.
- Antara, D. Wnt/Ca21 signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin.* v. 43, p. 745–756, 2011.
- Aquino-Martínez, R.; Monroe, D.G.; Ventura, F. Calcium mimics the chemotactic effect of conditioned media and is an effective inducer of bone regeneration. *PLOS ONE* | v. 4, p. 1-10, 2019.
- Baptista, L. S. *et al.* Adult Stem Cells Spheroids to Optimize Cell Colonization in Scaffolds for Cartilage and Bone Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 19, p. 1–14, 2018.
- Bailey, S.; Karsenty, G.; Gundberg, C.; Vashishth, D. Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Ann N Y Acad Sci.* v. 1409, n.1, p. 79–84, 2019
- Bonucci, E. Bone mineralization [Frontiers in Bioscience v. 17, p. 100-128, 2012.
- Brum, S. *et al.* Composite and a Bone Xenograft in Sub-Critical Size Bone Defect in Rat Calvaria. *Materials*, v. 13, p. 1–13, 2020.
- Brum, S.; Frigo, L.; Elias, C. N. Performance of Nano-Hydroxyapatite / Beta- Tricalcium Phosphate and Xenogenic Hydroxyapatite on Bone Regeneration in Rat Calvarial Defects: Histomorphometric, Immunohistochemical and Ultrastructural Analysis. *International Journal of Nanomedicine*, v. 16, p. 3473–3485, 2021.
- Carolina, A. *et al.* In vitro and in vivo assessment of CaP materials for bone regenerative therapy. The role of multinucleated giant cells / osteoclasts in bone regeneration. *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH*, v. 000B, n. 0, p. 1–16, 2019.
- Carvalho, M. S. *et al.* Loss and rescue of osteocalcin and osteopontin modulate osteogenic and angiogenic features of mesenchymal stem/stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, v. 235, n. 10, p. 7496–7515, 2020.
- Chatzipetros, E. *et al.* Application of nano-hydroxyapatite/chitosan scaffolds on rat calvarial critical-sized defects: A pilot study. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*, v. 23, n. 5, p. e625–e632, 2018.

- Chen, Z. *et al.* Osteoimmunomodulatory properties of magnesium scaffolds coated with β -tricalcium phosphate. *Biomaterials*, v. 35, n. 30, p. 8553–8565, 2014.
- Coringa, R. *et al.* Bone substitute made from a Brazilian oyster shell functions as a fast stimulator for bone-forming cells in an animal model. *PLoS ONE*, v. 13, n. 6, p. 1–13, 2018.
- Da Silva Brum, I. *et al.* Nanosized hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate composite: Physico-chemical, cytotoxicity, morphological properties and in vivo trial. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.
- Da Silva Pires, J.L. *et al.* Repair of Critical Size Bone Defects Using Synthetic Hydroxyapatite or Xenograft with or without the Bone Marrow Mononuclear Fraction: A Histomorphometric and Immunohistochemical Study in Rat Calvaria. *Materials*, v. 14, n. 2854, p. 1–13, 2021.
- Dahlin, C.; albertus, P.; linde, A. Osteopromotion for cranioplasty. *Journal of Neurosurgery*, v. 74, n. 3, p. 487–491, 2009.
- De Campos Pessoa, A. L. *et al.* Phosphodiesterase-5 inhibition improves bone regeneration at the early stages of ischemic osteonecrosis of the femoral head in rats. *Journal of Orthopaedic Research*, n. October, p. 1–6, 2020.
- De Oliveira Puttini, I. *et al.* Evaluation of osteoconduction of biphasic calcium phosphate ceramic in the calvaria of rats: Microscopic and histometric analysis. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2019.
- Diomedea, F. *et al.* Functional Relationship between Osteogenesis and Angiogenesis in Tissue Regeneration. 2020.
- Dipietro, L. A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 100, n. November, p. 1–6, 2016.
- Du, B. *et al.* Angiogenesis and bone regeneration of porous nano-hydroxyapatite/coralline blocks coated with rhVEGF165 in critical-size alveolar bone defects in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 2555–2565, 2015.
- Duan, P.; Bonewald, L.F. The Role of the Wnt/ β -catenin Signaling Pathway in Formation and Maintenance of Bone and Teeth. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* v.77, Part A, p. 23-29, 2016.
- Ge, R. *et al.* In vivo therapeutic effect of wollastonite and hydroxyapatite on bone defect. *Biomedical Materials (Bristol)*, v. 14, n. 6, p. 1–12, 2019.
- Grosso, A. *et al.* It Takes Two to Tango: Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* |, v. 5, n. November, p. 1–7, 2017.
- Guo, Y. *et al.* Effect of the same mechanical loading on osteogenesis and osteoclastogenesis in vitro. *Chinese Journal of Traumatology - English Edition*, v. 18, n. 3, p. 150–156, 2015.

Gusmão, C. V. B. de & Belangero, W. D. How Do Bone Cells Sense Mechanical Loading? *Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)*, v. 44, n. 4, p. 299–305, 2009.

Harada, S. *et al.* Induction of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by Prostaglandin E2 and E1 in Osteoblasts. *J. Clin. Invest.*, v. 93, n. June, p. 2490–2496, 1994.

Hivernaud, V. *et al.* Comparing “intra operative” tissue engineering strategies for the repair of craniofacial bone defects. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 120, n. 5, p. 432–442, 2019.

Ho-Shui-Ling, A. *et al.* Bone regeneration strategies: engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells Current stage and future perspectives. *Biomaterials*, p. 1–38, 2018.

Hu, J. *et al.* Porous biphasic calcium phosphate ceramics coated with nano-hydroxyapatite and seeded with mesenchymal stem cells for reconstruction of radius segmental defects in rabbits. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 26, n. 11, p. 1–12, 2015.

Iaquinta, M. R. *et al.* Innovative biomaterials for bone regrowth. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 3, p. 1–17, 2019.

Ishikawa, K. *et al.* Physical and Histological Comparison of. *Materials*, v. 11, p. 1–12, 2018.

Jensen, T. *et al.* Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: A systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 41, n. 1, p. 114–120, 2012.

Jeong, J. *et al.* Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomaterials Research*, v. 23, n. 4, p. 1–11, 2019.

Kaluzny, J. J.; Józwicki, W.; Wisniewska, H. Histological Biocompatibility of New, Non-Absorbable Glaucoma Deep Sclerectomy Implant. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, p. 403–409, 2006.

Kang, H.J., *et al.* Comparative study on biodegradation and biocompatibility of multichannel calcium phosphate based bone substitutes. *Materials Science & Engineering C*. v. 110, p. 110694, 2020.

Keogh, M. B.; O’Brien, F. J.; Daly, J. S. A novel collagen scaffold supports human osteogenesis - Applications for bone tissue engineering. *Cell and Tissue Research*, v. 340, n. 1, p. 169–177, 2010.

Kong, L. *et al.* Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 22, n. 3, p. 223–239, 2007.

Kook, S.H.; Heo, J.S.; Lee, J.C. Crucial roles of canonical Runx2-dependent pathway on Wnt1-induced osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Mol Cell Biochem*. v. 402, p. 213–223, 2015.

Kunisaki, Y. *et al.* Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*, v. 0, p. 1–7, 2013.

Lecanda, F., *et al.* Connexin 43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J. Cell Biol.* v. 151, n. 931–944, 2020.

Lee, J. H. *et al.* Physicochemical characterization of porcine bone-derived grafting material and comparison with bovine xenografts for dental applications. *Journal of Periodontal and Implant Science*, v. 47, n. 6, p. 388–401, 2017.

Lee, M. N. *et al.* Elevated extracellular calcium ions promote proliferation and migration of mesenchymal stem cells via increasing osteopontin expression. *Experimental and Molecular Medicine*, v. 50, n. 11, p. 1–16, 2018.

Levingstone, T. J.; Herbaj, S.; Dunne, N. J. Calcium Phosphate Nanoparticles for Therapeutic Applications in Bone Regeneration. *nanomaterials*, v. 9, n. 1, p. 1–22, 2019.

Lin, X. *et al.* The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, n. May, p. 1–15, 2020.

Liu, H. *et al.* Composite scaffolds of nano-hydroxyapatite and silk fibroin enhance mesenchymal stem cell-based bone regeneration via the interleukin 1 alpha autocrine/paracrine signaling loop. *Biomaterials*, v. 49, p. 103–112, 2015.

Lopes, D. *et al.* Europe PMC Funders Group Bone Physiology as Inspiration for Tissue Regenerative Therapies. p. 240–275, 2019.

Majidinia, M.; Sadeghpour, A.; Yousefi, B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *J Cell Physiol.*, v. 233, n. June, p. 2937–2948, 2017.

Marycz, K. *et al.* Materials Science & Engineering C Three dimensional (3D) printed polylactic acid with nano-hydroxyapatite doped with europium (III) ions (nHAp / PLLA @ Eu 3 +) composite for osteochondral defect regeneration and theranostics. *Materials Science & Engineering C*, v. 110, n. December 2019, p. 110634, 2020.

Mebarek, S. *et al.* Phospholipases of Mineralization Competent Cells and Matrix Vesicles: Roles in Physiological and Pathological Mineralizations. *Int. J. Mol. Sci.* v.14, p. 5036-5129, 2013.

Mello, R. DE *et al.* Xenograft Impregnated with Bone Marrow Mononuclear Fraction for Appositional Bone Regeneration in Rabbit Calvaria : A Clinical and Histomorphometric Study. v. 29, n. 4, 2014.

Murshed, M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harb Perspect Med.* v. 8, p. a031229, 2018.

Nyberg, E. *et al.* Comparison of 3D-Printed Poly-ε-Caprolactone Scaffolds Functionalized with Tricalcium Phosphate, Hydroxyapatite, Bio-Oss, or Decellularized Bone Matrix. *Tissue Engineering - Part A*, v. 23, n. 11–12, p. 503–514, 2017.

Orimo, H. The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *J Nippon Med Sch*, v. 77, p. 4–12, 2010.

- Ozturk, B. Y. *et al.* The treatment of segmental bone defects in rabbit tibiae with vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded gelatin/hydroxyapatite “cryogel” scaffold. *European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology*, v. 23, n. 7, p. 767–774, 2013.
- Paknejad, M. *et al.* Effects of Two Types of Anorganic Bovine Bone on Bone Regeneration: A Histological and Histomorphometric Study of Rabbit Calvaria. *Journal of Dentistry*, Tehran University of Medical Sciences, v. 11, n. 6, p. 1–9, 2014.
- Petersen, A. *et al.* A biomaterial with a channel-like pore architecture induces endochondral healing of bone defects. *Nature Communications*, p. 1–16, 2018.
- Poundarik, A. A. *et al.* Biomolecular regulation, composition and nanoarchitecture of bone mineral. *Scientific Reports*, p. 1–8, 2018.
- Prideaux, M.; Findlay, D. M.; Atkins, G. J. Osteocytes: The master cells in bone remodelling. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 28, p. 24–30, 2016.
- Ross, M. H. & Pawlina, W. *Histologia - Texto e Atlas*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 2018.
- Sadowska, J. M. *et al.* The effect of biomimetic calcium deficient hydroxyapatite and sintered β -tricalcium phosphate on osteoimmune reaction and osteogenesis. *Acta Biomaterialia*, v. 96, p. 605–618, 2019.
- Schlesinger, P.H., *et al.* Cellular and Extracellular Matrix of bone, with Principals of Synthesis and Dependency of Mineral Deposition on Cell Membrane Transport. v. 318, n.1, p. C111-C124, 2020.
- Seol, Y.J., *et al.* Improvement of Bone Regeneration Capability of Ceramic Scaffolds by Accelerated Release of Their Calcium Ions. *TISSUE ENGINEERING: Part A*, v. 20, n. 21, p. 2840-9, 2014.
- Shih, Y. V *et al.* Calcium phosphate-bearing matrices induce osteogenic differentiation of stem cells through adenosine signaling. *Cell Biology*, 2013.
- Sohn, D.-S. & Moon, Y.-S. Histomorphometric study of rabbit’s maxillary sinus augmentation with various graft materials. *Anatomy & Cell Biology*, v. 51, n. Suppl 1, p. S1, 2018.
- Song, J. E. *et al.* Quercetin Inlaid Silk Fibroin/Hydroxyapatite Scaffold Promotes Enhanced Osteogenesis. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 10, n. 39, p. 32955–32964, 2018.
- Tsao, Y. T. *et al.* Osteocalcin mediates biomineralization during osteogenic maturation in human mesenchymal stromal cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2017.
- Valério, P.; Terçarolli, S. P.; Gribel, M. N. A Ortopedia Funcional na Prevenção de Oclusopatias - As Bases Fisiológicas da Resposta Óssea à Estimulação Funcional. In:
- Sakai, E.; Cotrim-Ferreira, F. A.; Martins, N. DOS S. (Eds.). *Nova Visão em Ortodontia e*

Ortopedia Funcional dos Maxilares. 18. ed. São Paulo: Santos, 2012. p. 392.

Wagner, A.S. *et al.* Osteogenic differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells in response to extracellular calcium with special regard to connexin 43. *Annals of Anatomy* v. 209, p. 18–24, 2017.

Wang, X. I. *et al.* Hybrid composites of mesenchymal stem cell sheets, hydroxyapatite, and platelet - rich fibrin granules for bone regeneration in a rabbit calvarial critical - size defect model. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 13, p. 1891–1899, 2017.

Wang, J. *et al.* Nano-hydroxyapatite coating promotes porous calcium phosphate ceramic-induced osteogenesis via BMP/SMAD signaling pathway. *International Journal of Nanomedicine*, v. 14, p. 7987–8000, 2019.

Zhu, L.; Luo, D.; Liu, Y. Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration. *International Journal of Oral Science*, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2020.

ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "**PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS OSTEOPROGENITORAS E DA MATRIZ EXTRACELULAR NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS COM APLICAÇÃO DE ENXERTOS XENÓGENO E ALÓGENO**", registrada com o nº 013/2020, sob a responsabilidade de **Jorge José de Carvalho** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 01/12/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/12/2024
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	48
Peso/Idade	350 gramas / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 01 de Dezembro de 2020.


Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patrícia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ



Article

Osteopontin and Vascular Endothelial Growth Factor-Immunoreactivity in Critical Bone Defects Matrix Production: A Nano-Hydroxyapatite/Beta-Tricalcium Phosphate and Xenogeneic Hydroxyapatite Comparison

Ivonete Sena dos Santos ¹, Igor da Silva Brum ^{2,*}, Victor Hugo Vieira de Oliveira ¹, Ana Lucia Rosa Nascimento ¹, Lucio Frigo ³ , Mario José dos Santos Pereira ¹ and Jorge José de Carvalho ¹



Citation: dos Santos, I.S.; da Silva Brum, I.; Vieira de Oliveira, V.H.; Rosa Nascimento, A.L.; Frigo, L.; dos Santos Pereira, M.J.; de Carvalho, J.J. Osteopontin and Vascular Endothelial Growth Factor-Immunoreactivity in Critical Bone Defects Matrix Production: A Nano-Hydroxyapatite/Beta-Tricalcium Phosphate and Xenogeneic Hydroxyapatite Comparison. *Minerals* **2021**, *11*, 1048. <https://doi.org/10.3390/min11101048>

Academic Editors: Josy A. Osajima, Edison Cavalcanti da Silva Filho, Maria Gardennia Fonseca and Denis Gebauer

Received: 2 September 2021
Accepted: 23 September 2021
Published: 27 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Laboratory of Ultrastructure and Tissue Biology, Department of Histology and Embryology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 20550-900, Brazil; ivonetesena@gmail.com (I.S.d.S.); victorhvoabio@gmail.com (V.H.V.d.O.); ana.nascimento@uerj.br (A.L.R.N.); mariojps@gmail.com (M.J.d.S.P.); jicarv@gmail.com (J.J.d.C.)
² Implantology Department, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 20550-900, Brazil
³ Periodontology Department, Universidade Guarulhos, Guarulhos 07023-070, Brazil; luciofrigo@uol.com.br
* Correspondence: Carvalho@uerj.br; Tel.: +55-21-988-244-976

Abstract: The development of new bone substitutes has become an area of great interest in materials science. In fact, hydroxyapatite is the most commonly used biomaterial in defects that require bone reconstruction, and that is certainly why the discovery of new products with its formulation has been increasing continuously. The aim of this study was to analyze the biological behavior of a xenogeneic hydroxyapatite widely disclosed in the literature and a synthetic nano-hydroxyapatite/Beta tricalcium phosphate in critical defects in the calvaria of Wistar rats. For this, the groups were divided as follows: 24 adult male Wistar rats were used, weighing between 300 and 350 g, in three groups with eight animals each. In the CTRL group (control), only the clot was kept, without material insertion; in the Bioss group (bovine hydroxyapatite), Bio Oss[®]—Gleitsch[®] was introduced; and in the Blue Bone group (REG), the defect was filled in with synthetic nano-hydroxyapatite associated with betatrichophosphate of calcium, Blue Bone[®]—Regener[®]. According to the results in Goldner's Trichromics, we can observe a higher percentage of newly formed bone matrix in the REG group than in the CTRL and Bioss groups; in the VEGF, we had a more adequate cell modulation for blood vessel formation in the Blue Bone group (REG) compared to the Bioss and CTRL groups, while in osteopontin, a higher percentage of bone formation was observed in the Blue Bone group (REG) and Bioss group when compared to the CTRL group. We conclude that bone formation, mitosis-inducing cell modulation and main osteoblast activity were higher in the Blue Bone group (REG) than in the CTRL and Bioss groups.

Keywords: alloplastic; graft; nanohydroxyapatite; btcp

1. Introduction

Hydroxyapatite, an inorganic compound that constitutes 70% of the weight of bones and dental enamel, has been widely used for bone reconstruction surgeries [1], the development of new dental implant surfaces, and more recently in 3D technology for area replacement totally compromised by lesions caused by tumors or cancers of bone origin [2]. However, even though hydroxyapatite is already an established material in the literature, many studies seek to understand more deeply how the physicochemical behavior related to the cells involved in the ossification process occurs [3–5].

Recently, nanotechnology has been improving the bioactive properties of hydroxyapatite in relation to its crystals, resulting in a better response in association with nanocrystals