

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Potencial osteogênico *in vivo* de uma nova  
vitrocerâmica bioativa (Biosilicato<sup>®</sup>)

Renata Neves Granito

São Carlos

2009

Renata Neves Granito

Potencial osteogênico *in vivo* de uma nova  
vitrocerâmica bioativa (Biosilicato<sup>®</sup>)

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Fisioterapia da Universidade Federal  
de São Carlos, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Oishi

São Carlos

2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

G759po

Granito, Renata Neves.

Potencial osteogênico in vivo de uma nova vitrocerâmica bioativa (Biosilicato®) / Renata Neves Granito. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

127 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Fisioterapia. 2. Biomateriais. 3. Tecido ósseo. 4. Bioatividade. 5. Vitrocerâmica. 6. Propriedades mecânicas. I. Título.

CDD: 615.82 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE TESE DE  
Renata Neves Granito, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO CARLOS, EM 03 DE ABRIL DE 2009.

BANCA EXAMINADORA:



**Prof. Dr. Jorge Oishi**  
(UFSCar)



**Prof.ª Dr.ª Stela Márcia Mattiello G. Rosa**  
(UFSCar)



**Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan**  
(EESC-USP)



**Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira**  
(FORP/USP)



**Prof.ª Dr.ª Daniela Cristina Carvalho de Abreu**  
(FMRP/USP)

# Renata Neves Granito

## Estudo 1

**“Desempenho biológico *in vivo* de uma nova vitrocerâmica altamente bioativa (Biosilicato<sup>®</sup>): um estudo biomecânico e histomorfométrico em defeitos ósseos de ratos”**

**Co-orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto**

## Estudo 2

**“Cinética comparativa das respostas ósseas a diferentes faixas granulométricas de Biosilicato<sup>®</sup> particulado”**

**Co-orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto**

## Estudo 3

**“Análise preliminar qualitativa da interação celular *in vitro* com matrizes porosas de novos materiais bioativos”**

**Co-orientador: Prof. Dr. Vincent Everts**

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Oishi**

**Apoio Financeiro: CAPES**

Investigações conduzidas com auxílio dos seguintes laboratórios de pesquisa:

- Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV), Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Prof. Dr. Oscar Peitl Filho e Prof. Dr. Edgar Dutra Zanotto

- Laboratório de Eletrotermofototerapia, Departamento de Fisioterapia (DFisio), UFSCar.

Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto

- Laboratório de Fisiopatologia Renal, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP).

Profa Dra Vanda Jorgetti

- Laboratório de Neuroendocrinologia, Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), UFSCar.

Profa Dra Keico Okino Nonaka

- Laboratório de Avaliação e Intervenção Fisioterapêutica sobre a Saúde da Mulher (LAMU), DFisio, UFSCar.

Profa Dra Patrícia Driusso

- Laboratório de Tribologia e Compósitos, Departamento de Engenharia Mecânica, Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), USP.

Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan

- Academic Centre of Dentistry Amsterdam (ACTA), Department of Oral Cell Biology, Universiteit van Amsterdam and Vrije Universiteit, The Netherlands.

Prof. Dr. Vincent Everts

“ Amor é estado de graça  
e com amor não se paga.

Amor é dado de graça,  
é semeado no vento,  
na cachoeira, no eclipse.

Amor foge a dicionários  
e a regulamentos vários.”

Carlos Drummond de Andrade  
*In: As sem-razões do amor*

*Dedico este trabalho aos que me fizeram  
entender o sentido destas palavras...*

*... meus pais Odair e Janete,*

*... meu noivo Benoit,*

*... meus irmãos, meus primos e meu CLÃ de amigos.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao Prof. Dr. Jorge Oishi, pessoa de inigualável sabedoria. Muito obrigada por todos esses anos e pela sua tão especial amizade.

Ao Prof. Dr. Nivaldo Parizotto, por ter me acolhido no seu laboratório, pela ajuda, pelos conselhos e, sobretudo, pela amizade.



# AGRADECIMENTOS

## **Minha sincera e profunda gratidão:**

A todos os professores, alunos e funcionários do Laboratório de Materiais Vítreos (LAMAV) da UFSCar, pela ajuda fundamental neste estudo. Muito obrigada especialmente aos professores Oscar e Zanotto, ao Christian e ao Murilo.

À amiga Ana Claudia Muniz Rennó, pelo fundamental auxílio neste trabalho, pelo incentivo e pela amizade tão singular.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanda Jorgetti, pelo paciente auxílio com as análises histomorfométricas. Estar em sua companhia é sinônimo de aprendizado constante.

Ao Prof. Dr. Vincent Everts. Agradeço, sobretudo, o respeito e a dedicação com que me recebeu durante o estágio no exterior.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan, por estar sempre disposto em colaborar. Muito obrigada por todo o seu precioso auxílio durante estes anos.

Ao Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, pelo exemplo de competência. Agradeço muito a sua ajuda e a sua disponibilidade.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Stela M. Matiello Gonçalves Rosa, pelo conhecimento compartilhado durante estes anos, pelo carinho e pelos conselhos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Driusso, por sempre me acompanhar em todos os meus passos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela C. C. de Abreu, pela disposição em contribuir com este estudo.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Keico Okino Nonaka, por ter disponibilizado o uso de equipamentos locados em seu laboratório e ao aluno Daniel Mochiutti pelo auxílio na realização do ensaio mecânico.

Ao amigo Paulo Bossini, pela fundamental e competente ajuda nos experimentos. Você traz alegria aos meus dias de trabalho.

À minha madrinha Mariana Chaves Aveiro, companheira desde os primórdios da iniciação científica. Obrigada pela ajuda constante.

Aos meus amigos, que preenchem e dão um sentido mais bonito à minha vida, em especial a Karina G, Tatiane, Patrícia, Karina N, Bruno, Mariana, Marê, Camila, Jean, Kelly, Ana Claudia, Paulo, Michel, Fernanda, Luciana, Natália, Paula, Moacir, Melissa e prima Marília. Vocês são muito mais especiais do que imaginam. Obrigada demais!

À Veerle e ao Ton, pelo auxílio nos experimentos em Amsterdam e, principalmente, pelo carinho e por todos os momentos vivenciados.

À família Martin, em especial Monique, Dominique, Michèle, Nico e Camille. Muito obrigada pelo apoio e pela torcida.

À minha família, meus maiores exemplos. Muito obrigada pelo apoio sem limites e pelo amor incondicional. Meu querido Benoit, fico feliz por te incluir entre os familiares, meu eterno agradecimento pela sua ajuda e compreensão.

Aos meus queridos amigos companheiros de república, com quem repartir uma morada significou muito mais que uma mera divisão de espaço físico. Nunca me esquecerei da minha família da Laje; do trio Gramani, Berabinha e Kelly, que carinhosamente me acolheram diversas vezes; da indescritível companhia da Natália em São Paulo; e do Pascal em Amsterdam.

À Rosimeire, técnica do laboratório de fisiopatologia renal da USP, pela ajuda, paciência e amizade.

Ao Renan e ao Sama, pelas discussões, companhia e apoio no laboratório de eletrotermofototerapia.

Aos professores e alunos do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, pela experiência compartilhada.

Aos funcionários Ana Paula, Kelly e Heitor, pelo trabalho competente.

À CAPES, pelas bolsas de doutorado e doutorado-sanduíche concedidas.

# RESUMO

Materiais bioativos possuem a capacidade de se ligar ao tecido ósseo por meio da formação de uma interface apatítica que apresenta similaridade química e estrutural com a fase mineral dos ossos. Esse processo ocorre devido a uma série de reações químicas, cujos produtos também influenciam a adesão, a proliferação, a diferenciação e a capacidade de mineralização da matriz pelas células ósseas. As respostas celulares contribuem para o comportamento bioativo, que é conhecido por ter maiores índices em materiais vítreos. No entanto, como baixas propriedades mecânicas também são características inerentes aos vidros, pesquisadores da Universidade Federal de São Carlos foram estimulados a empregarem nucleação e tratamentos térmicos especiais para o desenvolvimento do Biosilicato<sup>®</sup>, uma vitrocerâmica biotiva, totalmente cristalina, pertencente ao sistema quaternário  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ . Embora um elevado potencial osteogênico *in vitro* tenha sido demonstrado para esta vitrocerâmica, seus efeitos *in vivo* ainda não são conhecidos. Para auxiliar este entendimento, foram desenvolvidos dois estudos. O primeiro teve como objetivo investigar o desempenho biológico *in vivo* do Biosilicato<sup>®</sup> particulado em defeitos ósseos em tíbias de ratos, por meio de análises histomorfométricas e biomecânicas 20 dias após o procedimento cirúrgico. Este estudo evidenciou que o Biosilicato<sup>®</sup> parece favorecer a formação óssea *in vivo* e o estabelecimento de fortes ligações com o tecido neoformado. Com isso, o objetivo do segundo estudo foi comparar a cinética das reações ósseas frente a duas diferentes distribuições granulométricas desta nova vitrocerâmica. Embora ambas tenham sido eficientes para a formação óssea, as partículas de Biosilicato<sup>®</sup> com menores diâmetros demonstraram reabsorção parcial no período estudado, que foi acompanhada de uma maior atividade osteogênica. Com os resultados positivos obtidos nestas investigações, iniciou-se uma busca para o desenvolvimento de matrizes porosas que pudessem servir de suporte para a regeneração guiada do tecido ósseo. Um terceiro estudo preliminarmente avaliou monoculturas e coculturas celulares em matrizes porosas de Biosilicato<sup>®</sup> e de outras novas composições químicas desenvolvidas especificamente para este propósito. Os achados sugerem que, quando em condições adequadas, as matrizes avaliadas podem produzir respostas celulares favoráveis ao seu emprego na engenharia do tecido ósseo. Estes estudos, de maneira conjunta, apontam para um potencial promissor e fornecem diretrizes para o emprego do Biosilicato<sup>®</sup> no favorecimento de processos regenerativos ósseos.

**Palavras-chave:** Bioatividade, vitrocerâmica, biomaterial particulado, granulometria, reatividade, tecido ósseo, histomorfometria óssea, propriedades mecânicas, matrizes porosas.

# ABSTRACT

Bioactive materials have the ability to bond and to integrate with bone tissue by forming a biologically active bonelike apatite layer, which has chemical and structural properties equivalent to the mineral phase of living bone. This process is determined by chemical reactions, whose products also influence the attachment, the proliferation, the differentiation and the mineralizing capacity of bone cells. Cellular responses contribute to the bioactive behavior, which is known for being higher in glass materials. However, as low mechanical properties are also inherent characteristics of glasses, researchers from Federal University of Sao Carlos were stimulated to develop nucleation and growth thermal treatments for the obtainment of the Biosilicate<sup>®</sup>, a fully-crystallized bioactive glass-ceramic of the quaternary system  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ . Although a high *in vitro* osteogenic potential of this novel glass-ceramic has been previously demonstrated, its *in vivo* effects have not been investigated yet. To contribute to this knowledge, two studies were developed. The first one aimed to investigate the *in vivo* biological performance of Biosilicate<sup>®</sup> in bone defects of rat tibias, by means of histomorphometric and biomechanical analyses 20 days after the surgical procedure. This study revealed that the fully-crystallized Biosilicate<sup>®</sup> has good bone-forming and bone-bonding properties. Hence, the second study aimed to compare the kinetics of the bone reactions to two different granulometric distributions of this novel glass-ceramic. Although they were both efficient for bone formation, smaller-sized particles of Biosilicate<sup>®</sup> showed partial reabsorption, which was accompanied by a more pronounced osteogenic activity within the period of time studied. Since positive results were obtained, the search for scaffolds that could serve as supports for the guided bone regeneration had started. A third study preliminarily evaluated cell culture and cocultures in porous structures made of Biosilicate<sup>®</sup> and of other chemical compositions that were specifically developed for this purpose. The findings suggest that, when in adjusted conditions, the scaffolds can create favorable cellular responses for bone tissue engineering purposes. Taken together, these studies point to a promising potential and provide directives for the use of Biosilicate<sup>®</sup> in bone regenerative processes.

**Key-words:** Bioactivity, glass-ceramic, particulate biomaterial, granulometry, reactivity, bone tissue, bone histomorphometry, mechanical properties, scaffolds.

# ESTUDO 1

**Desempenho biológico *in vivo* de uma nova vitrocerâmica bioativa (Biosilicato<sup>®</sup>): um estudo biomecânico e histomorfométrico em defeitos ósseos de ratos.**

## RESUMO

**Objetivo:** Este estudo objetivou investigar as respostas ósseas a uma nova vitrocerâmica bioativa e totalmente cristalina (Biosilicato<sup>®</sup>), pertencente ao sistema quartenário P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub>. **Justificativa:** Embora um estudo prévio tenha demonstrado que o Biosilicato<sup>®</sup> promoveu elevada formação óssea *in vitro*, seus efeitos *in vivo* ainda não foram estudados. **Métodos:** Foram utilizados ratos machos *Wistar* (n = 40) com defeitos ósseos bilaterais nas tíbias. Grupos experimentais foram delineados para a comparação deste novo biomaterial com o material bioativo considerado padrão-ouro (Bioglass<sup>®</sup> 45S5) e também com defeitos ósseos não-preenchidos e com tíbias intactas (defeitos e intactos controles). Um ensaio mecânico de flexão de três pontos foi realizado 20 dias após o procedimento cirúrgico, assim como a análise histomorfométrica em duas regiões de interesse: osso cortical e canal medular onde o biomaterial particulado foi implantado. **Resultados:** O ensaio mecânico revelou um aumento significativo na carga máxima e rigidez no grupo Biosilicato<sup>®</sup> (*vs.* defeito-controle), atingindo valores similares a ossos intactos. Não existiram diferenças significativas nos parâmetros histomorfométricos de osso cortical em grupos com defeitos ósseos, porém verificou-se uma grande quantidade de tecido ósseo imaturo circundando as partículas dos biomateriais avaliados. Apesar de ambos exibirem um aumento significativo da formação óssea, Biosilicato<sup>®</sup> foi superior ao Bioglass<sup>®</sup> 45S5 em alguns parâmetros histomorfométricos (volume ósseo e número de osteoblastos). Com relação à reabsorção óssea, o grupo Biosilicato<sup>®</sup> demonstrou um aumento significativo do número de osteoclastos por área de tecido quando comparado a defeitos e intactos controle, apesar de não existirem diferenças na superfície de osteoclástica como porcentagem da superfície óssea. **Conclusão:** Este estudo revela que o Biosilicato<sup>®</sup> parece favorecer a formação óssea *in vivo* e o estabelecimento de fortes ligações com o tecido neoformado.

## ESTUDO 2

**Cinética comparativa das respostas ósseas a diferentes faixas granulométricas de Biosilicato<sup>®</sup> particulado.**

### RESUMO

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi comparar as reações ósseas a duas diferentes distribuições granulométricas de uma nova vitrocerâmica bioativa (Biosilicato<sup>®</sup>). **Justificativa:** As respostas do tecido ósseo podem variar dependendo dos fatores que influenciam a cinética das reações químicas em um material bioativo. Apesar dos efeitos positivos da cristalização de vidros bioativos pertencentes ao sistema  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$  no estímulo à osteogênese, a influência do tamanho das partículas ainda não foi estudada. **Métodos:** Defeitos ósseos cirurgicamente criados em tíbias de ratos ( $n = 80$ ) foram preenchidos com partículas de 180- a 210- $\mu m$  ou de 300- a 355- $\mu m$  de Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5 (material bioativo padrão-ouro). Defeitos ósseos não-preenchidos também foram utilizados como controles ( $n=20$ ). Uma análise histomorfométrica foi realizada 10 e 20 dias após o procedimento cirúrgico. **Resultados:** Uma dissolução mais pronunciada das partículas de Biosilicato<sup>®</sup> com 180- a 210- $\mu m$  foi acompanhada por um volume ósseo significativamente maior neste grupo experimental ( $p<0,05$ ). A vantagem do Biosilicato<sup>®</sup> sobre Bioglass<sup>®</sup> 45S5 foi apenas revelada na faixa granulométrica de menor diâmetro. A velocidade das reações de superfície também parece ter influenciado o recrutamento de osteoblastos, embora não existiram diferenças significativas quanto ao número de osteoclastos. Apenas defeitos ósseos preenchidos com Biosilicato<sup>®</sup> na faixa granulométrica de 300- a 355- $\mu m$  apresentaram comportamento similar a defeitos controle (não-preenchidos) com relação à fibrose transitória observada na medula óssea. **Conclusão:** Partículas de Biosilicato<sup>®</sup> com menores diâmetros demonstraram reabsorção parcial no período estudado, que foi acompanhada de uma maior atividade osteogênica. Apesar de também eficientes na formação óssea, partículas maiores deste material bioativo exibiram um comportamento mais estável nas respostas induzidas.

## ESTUDO 3

**Análise preliminar qualitativa da interação celular *in vitro* com matrizes porosas de novos materiais bioativos.**

### RESUMO

**Objetivo:** O objetivo deste estudo preliminar foi verificar qualitativamente os efeitos de três diferentes composições químicas de novos materiais bioativos em monoculturas e coculturas celulares. **Justificativa:** O estágio crítico para a regeneração óssea é relacionado com a interação das células e a superfície dos biomateriais. Os fatores que podem influenciar as respostas celulares devem, portanto, ser investigados na busca por melhores condições para o emprego de matrizes porosas na regeneração guiada do tecido ósseo. **Métodos:** Células do ligamento periodontal (CLPD) e células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram plaqueadas, de maneira isolada ou em cocultura, sobre matrizes porosas de novas vitrocerâmicas bioativas (Biosilicato, C000 e C050). Antes do plaqueamento, as matrizes foram pré-tratadas por 1 ou 10 dias em meio de cultura. As culturas foram mantidas por períodos de até 14 dias. Nos dias 1, 7 e 14, as matrizes porosas foram analisadas em microscópio confocal quanto à morfologia, espriamento e quantidade de células aderidas. **Resultados:** Quando pré-tratadas por 1 dia, todas as matrizes não demonstraram ser favoráveis à cultura de células. No entanto, no caso do pré-tratamento por 10 dias, as CLPD encontravam-se espriadas e aumentaram-se em número com a progressão do tempo de cultura. Com relação às CMSP, parte das células aumentam-se de tamanho e passaram a exibir prolongamentos citoplasmáticos. Houve evidente fusão de algumas delas, originando células com mais de um núcleo, que é um fato sugestivo de um processo de diferenciação. As matrizes de C000 demonstraram uma aparente desvantagem com relação às demais e as condições de cocultura celular demonstraram efeitos benéficos mais pronunciados. **Conclusão:** De maneira preliminar, os achados do presente estudo sugerem que, quando em condições adequadas, as matrizes avaliadas podem produzir respostas celulares favoráveis ao seu emprego na engenharia do tecido ósseo.

# SUMÁRIO

<b>CONTEXTUALIZAÇÃO</b>	<b>16</b>
-------------------------	-----------

---

<b>ESTUDO 1</b>	<b>20</b>
-----------------	-----------

---

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
-------------------	-----------

<b>METODOLOGIA</b>	<b>23</b>
--------------------	-----------

BIOMATERIAIS	23
--------------	----

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	24
---------------------------	----

PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	25
--------------------------	----

ENSAIO MECÂNICO	25
-----------------	----

ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	26
---------------------------	----

ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
---------------------	----

<b>RESULTADOS</b>	<b>27</b>
-------------------	-----------

PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS	28
---------------------------	----

HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA	28
------------------------	----

<b>DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
------------------	-----------

<b>ESTUDO 2</b>	<b>42</b>
-----------------	-----------

---

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>43</b>
-------------------	-----------

<b>METODOLOGIA</b>	<b>45</b>
--------------------	-----------

BIOMATERIAIS	45
--------------	----

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	46
--	----

HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA	48
------------------------	----

ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
---------------------	----

<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
-------------------	-----------

<b>DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
------------------	-----------



<b>ESTUDO 3</b>	<b>62</b>
<hr/>	
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>63</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>64</b>
PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	64
ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS	66
CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL (CLPD)	66
CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP)	67
PLAQUEAMENTO CELULAR	67
CÉLULAS EM COCULTURA	68
MICROSCOPIA CONFOCAL	68
<b>RESULTADOS</b>	<b>69</b>
CLPD EM MONOCULTURA NAS MATRIZES	69
CMSP EM MONOCULTURA NAS MATRIZES	72
COCULTURAS CELULARES (CLPD E CMSP)	75
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>77</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>81</b>
<hr/>	
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>83</b>
<hr/>	
<b>ANEXOS</b>	<b>92</b>
<hr/>	
<b>ANEXO A – VERSÃO EM INGLÊS DO ESTUDO 1</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO B – VERSÃO EM INGLÊS DO ESTUDO 2</b>	<b>111</b>

# **CONTEXTUALIZAÇÃO**

Os avanços tecnológicos na área da saúde visam gerar estratégias eficazes para melhoria da qualidade de vida dos indivíduos. Com este propósito, a busca por novos materiais que atuem no favorecimento de processos regenerativos teciduais deve ser enfatizada para a solução de problemas relativos aos métodos comumente empregados na prática clínica. No tratamento de defeitos com perda de massa óssea, por exemplo, a disponibilidade em quantidade limitada e a morbidade da área doadora no caso dos enxertos ósseos autógenos (Yoneda et al., 2005) e o risco potencial de transmissão de doenças infecciosas ou de rejeição no caso dos aloenxertos (Bauman et al., 2009) caracterizam-se como desafios nas clínicas médica e odontológica.

Neste contexto, materiais bioativos tem sido sinteticamente desenvolvidos pois, além de serem vantajosos quanto a estes quesitos, outras características peculiares os tornam promissores frente a necessidade crescente por substitutos ósseos eficazes. A bioatividade refere-se à propriedade destes biomateriais de se ligarem ao tecido ósseo por meio da formação de uma camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA) que é química e estruturalmente similar à fase mineral do osso (Hench, 2003). Além disso, efeitos benéficos para regeneração óssea ocorrem por meio de uma influência dos produtos da dissolução iônica destes materiais na expressão de genes relacionados aos processos de diferenciação e proliferação de células da linhagem osteoblástica (Hench et al., 2000; Gao et al., 2001; Xynos et al., 2001).

O vidro Bioglass<sup>®</sup> 45S5 é mundialmente conhecido há anos por apresentar o maior índice de bioatividade entre os materiais disponíveis, sendo considerado como padrão-ouro para aplicação em procedimentos nos quais um estímulo à osteogênese é necessário (Hench, 2003).

No entanto, as características micro-estruturais inerentes aos materiais vítreos que favorecem a bioatividade também determinam uma diminuição das propriedades mecânicas de suas estruturas monolíticas, o que tem limitado o uso de biovidros na engenharia do tecido ósseo (Hench, 1996; Vallet-Regi, 2001).

Frente a este obstáculo, o Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) desenvolveu uma vitrocerâmica bioativa, totalmente cristalina, pertencente ao sistema quaternário  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ , denominada Biosilicato<sup>®</sup> (patente WO 2004/074199; Zanotto et al., 2004). Os processos de cristalização desenvolvidos para a melhoria das propriedades mecânicas também possibilitaram que o Biosilicato<sup>®</sup> mantivesse um nível de bioatividade comparável aos dos vidros bioativos de classe A, evidenciado pela formação de uma camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA) sobre a sua superfície em contato com SBF-K9 em 24 horas (Moura et al. 2007). Experimentos *in vitro* também demonstraram que o Biosilicato<sup>®</sup> promoveu a formação de áreas mais extensas de matriz óssea calcificada em comparação com o Biosilicato<sup>®</sup> vítreo e com o Bioglass<sup>®</sup> 45S5 em meio de cultura osteogênico (Moura et al. 2007).

Estes relevantes achados nos estimularam a investigar os até então desconhecidos efeitos osteogênicos *in vivo* desta vitrocerâmica totalmente cristalina. O primeiro estudo desta tese foi desenvolvido com o objetivo de comparar, por meio de análises histomorfométricas e biomecânicas, o desempenho biológico *in vivo* do Biosilicato<sup>®</sup> e do Bioglass<sup>®</sup> 45S5 (biomaterial padrão-ouro) particulados em defeitos ósseos em tíbias de ratos.

Como esta primeira investigação incluiu um único estágio do processo de regeneração óssea induzido por uma faixa granulométrica específica do Biosilicato<sup>®</sup> e do

Bioglass<sup>®</sup> 45S5 particulado, a cinética da dissolução de duas granulometrias deste materiais e seus os efeitos teciduais foram comparados em um segundo estudo.

Com os resultados positivos obtidos nestas investigações, iniciou-se uma busca para o desenvolvimento de matrizes porosas que pudessem servir de suporte para a regeneração guiada do tecido ósseo. Diversos pesquisadores foram envolvidos na procura por melhores condições, inclusive abrangendo o desenvolvimento de novas composições químicas que pudessem ser mais eficientes para tal propósito. Apesar das pesquisas ainda em andamento, resultados qualitativos preliminares da interação celular com estas matrizes estão apresentados no terceiro estudo desta tese, que foi desenvolvido por meio de um programa de doutorado-sanduíche da CAPES (Universiteit van Amsterdam, orientação do Prof. Dr. Vincent Everts).

De maneira conjunta, estes estudos apontam para um potencial promissor e fornecem diretrizes para o emprego do Biosilicato<sup>®</sup> no favorecimento de processos regenerativos ósseos.

# **ESTUDO 1**

**“Desempenho biológico *in vivo* de uma nova  
vitrocerâmica bioativa (Biosilicato<sup>®</sup>): um estudo  
biomecânico e histomorfométrico em  
defeitos ósseos de ratos”**

## INTRODUÇÃO

Milhões de fraturas ósseas ocorrem anualmente no mundo todo. Embora a regeneração do tecido ósseo seja um processo biológico organizado e eficiente, o retardo na consolidação e não-uniões podem resultar de respostas regenerativas insuficientes em alguns casos (Zimmermann et al., 2007). Além disso, prejuízos no crescimento e no remodelamento ósseo também podem ser decorrentes de outras situações clínicas, como várias em doenças e na resecção de tumores (Gautier et al., 2005).

Neste contexto, verifica-se uma necessidade crítica por tecnologias capazes de estimular a regeneração óssea (Gautier et al., 2005). Um tratamento promissor constitui-se no uso de vidros bioativos como substitutos ósseos, devido a capacidade destes materiais de se ligarem e se integrarem com o tecido ósseo vivo por meio do desenvolvimento de uma camada de hidroxicarbonatoapatita biologicamente ativa na interface osso-material (Hench & Polak, 2002; Hench, 2003). A osteoprodução, i.e. proliferação induzida de tecido ósseo em uma região de defeito (Hench, 2003), ocorre como consequência de rápidas reações na superfície de vidros bioativos. Ainda mais, a superfície reativa promove a liberação de íons sódio, cálcio, silanóis e fósforo que estimulam a adesão, a proliferação e a diferenciação de células osteoprogenitoras (Hench et al., 2000; Xynos et al. 2000a; Xynos et al., 2000b; Xynos et al., 2001; Hench, 2003).

O Bioglass<sup>®</sup> 45S5, um vidro silicatado (45% SiO<sub>2</sub>, 24.5% Na<sub>2</sub>O, 24.5% CaO, 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), tem sua composição conhecida há anos como a mais bioativa entre inúmeros vidros que se ligam ao tecido ósseo por meio da interface apatítica (Hench, 2003). Este vidro foi pioneiramente introduzido por Hench no início dos anos 70 e, desde então, tem sido utilizado em diversas

situações clínicas, incluindo o reparo de defeitos periodontais, reconstrução maxilo-facial, cirurgias na coluna vertebral e preenchimento de defeitos ósseos (Hench, 2003).

Muitos trabalhos vem provando que o Bioglass<sup>®</sup> 45S5 possui efeito estimulador na osteogênese (Reilly et al., 2007; Nandi et al., 2009; Vargas et al., 2009). Culturas de células ósseas humanas sobre a superfície de discos de Bioglass<sup>®</sup> 45S5 demonstraram um aumento da formação de nódulos ósseos, que são estruturas tri-dimensionais compostas por matriz extracelular calcificada e agregados celulares, com complexidade organizacional similar à evolução natural do crescimento ósseo *in vivo* (Xynus et al., 2000). Somando-se a isso, os produtos iônicos do Bioglass<sup>®</sup> 45S5 induziram um aumento na proliferação de osteoblastos humanos e na expressão gênica do fator de crescimento semelhante à insulina tipo II (IGF-II), um potente agente mitógeno para as células da linhagem osteoblástica (Xynus et al., 2000b). De fato, o mecanismo para regeneração tecidual *in-situ* envolve a ativação de sete famílias de genes que controlam o ciclo celular, a mitose e a diferenciação de osteoblastos (Hench et al., 2004).

Apesar dos conhecidos efeitos estimulatórios na osteogênese, a aplicação de biovidros na engenharia do tecido ósseo tem sido limitada principalmente devido às baixas propriedades mecânicas destes materiais (Vallet-Regi, 2001; Dieudonne et al., 2002). Considerando esta importante questão, pesquisadores do Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos desenvolveram tratamentos térmicos para nucleação e crescimento de cristais, visando a obtenção de uma vitrocerâmica bioativa totalmente cristalina, pertencente ao sistema quaternário  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$  (Biosilicato<sup>®</sup>, patente WO 2004/074199). A cristalização altera significativamente as características de fratura dos vidros, levando à obtenção de vitrocerâmicas com propriedades mecânicas superiores. Por outro lado, a introdução de fases cristalinas pode, em princípio, diminuir a bioatividade (Hench, 1996; Vallet-Regi, 2001). Porém,



interessantemente, experimentos *in vitro* demonstraram que o Biosilicato<sup>®</sup> promoveu a formação de áreas mais extensas de matriz óssea em comparação com o Biosilicato<sup>®</sup> vítreo e com o Bioglass<sup>®</sup> 45S5 em meio de cultura osteogênico (Moura et al. 2007).

Estes relevantes achados nos estimularam a progredir o conhecimento sobre os efeitos desta vitrocerâmica totalmente cristalina na osteogênese. Apesar do Biosilicato<sup>®</sup> ter favorecido a formação de matriz óssea-símile *in vitro*, seus efeitos sobre a formação óssea *in vivo* ainda não são conhecidos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar e comparar o desempenho biológico *in vivo* do Biosilicato<sup>®</sup> e do Bioglass<sup>®</sup> 45S5 (biomaterial padrão-ouro) em defeitos ósseos em tíbias de ratos.

## **METODOLOGIA**

### **Biomateriais**

Sílica de alta pureza, carbonato de cálcio, carbonato de sódio e fosfato de sódio foram usados para obtenção da composição genérica do Bioglass<sup>®</sup> 45S5 e do Biosilicato<sup>®</sup> vítreo. As matérias-primas foram pesadas e misturadas nas devidas proporções durante 30 minutos. Em seguida, as composições eram deixadas homogeneizar por cerca de 3 horas a temperatura entre 1250 e 1380°C em forno elétrico de fusão (Rapid Temp 1710 BL, CM Furnaces Inc., Bloomfield, NJ, EUA) no Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos, SP, Brasil). Imediatamente depois, o líquido era vertido em moldes aço inox para proporcionar um rápido resfriamento do material, possibilitando a obtenção de placas vítreas.

Para obtenção da vitrocerâmica totalmente cristalizada (Biosilicato<sup>®</sup>), as placas de Biosilicato<sup>®</sup> vítreo passaram por ciclos de tratamento térmico para promover sua cristalização. Os primeiros ciclos térmicos foram executados em baixas temperaturas para favorecer a nucleação volumétrica dos cristais. Posteriormente, as amostras nucleadas foram submetidas a tratamentos térmicos a uma temperatura superior à de transição do vidro para ocasionar a total cristalização do material. A composição e o protocolo de tratamentos térmicos para obtenção do Biosilicato<sup>®</sup> estão descritos detalhadamente na patente WO 2004/074199 (Zanotto et al., 2004).

Finalmente, as placas de Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5 foram moídas e os materiais particulados obtidos foram peneirados para a seleção da faixa granulométrica 180-210 µm, que foi empregada no preenchimento dos defeitos ósseos no presente estudo.

### **Delineamento Experimental**

Quarenta ratos *Wistar* machos (idade média de 12 semanas e peso corporal entre 250-300 g) foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos em condições naturais de temperatura e umidade, ciclos claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração comercial. Todos os procedimentos foram estritamente conduzidos de acordo com os princípios internacionais para o uso de animais em laboratórios. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos.

Os ratos foram randomicamente distribuídos em 4 grupos de 10 animais cada:

- Grupo intacto controle (tíbias intactas, isentas de defeitos ósseos cirurgicamente criados);
- Grupo defeito controle (defeitos ósseos não-preenchidos com biomateriais);
- Grupo Bioglass<sup>®</sup> 45S5 (defeitos ósseos preenchidos com o biomaterial padrão-ouro);
- Grupo Biosilicato<sup>®</sup> (defeitos ósseos preenchidos com o biomaterial a ser testado).

## **Procedimentos Cirúrgicos**

Defeitos ósseos de tamanho não crítico foram bilateralmente criados no terço superior das tíbias (10 mm distais da articulação do joelho). As cirurgias foram realizadas em condições estéreis e anestesia geral induzida por injeção intra-peritoneal de Ketamina/ Xylazina (80/10 mg/Kg). Inicialmente, a face medial da tíbia foi exposta por meio de uma incisão longitudinal na pele tricomicizada. Um defeito ósseo padronizado com 2,5 mm de diâmetro foi confeccionado em cada osso por meio de broca esférica motorizada e irrigação com soro fisiológico. Os defeitos foram comprimidos com gaze durante 5 minutos. Imediatamente em seguida, as cavidades ósseas foram totalmente preenchidas com o biomaterial particulado correspondente ao grupo experimental no caso dos animais tratados. Após a implantação, foram realizadas suturas internas e externas com fio cirúrgico (Catgut 4.0). O estado de saúde dos ratos foi monitorado diariamente.

Vinte dias após o procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados com uma overdose de anestésico e as tíbias foram bilateralmente extraídas para análise.

## **Ensaio Mecânico**

As propriedades biomecânicas da tíbia esquerda foram determinadas por meio do teste de flexão de três pontos em um equipamento Instron<sup>®</sup> (USA, modelo 4444, célula de carga de 1 KN).

Para a realização do teste, as tíbias foram posicionadas em um dispositivo especial que proporcionou um duplo apoio no osso, distanciados entre si em 21,7 mm. A célula de carga foi posicionada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso e contralateralmente ao local exato onde foi realizado o defeito ósseo, visando submeter a face medial (área de reparo) do osso à tração. Em seguida, uma pré-carga de 5N foi imposta para evitar o deslizamento do corpo de

prova durante o ensaio. Finalmente, a carga foi aplicada em uma velocidade de 5 mm/mim até que a fratura do osso ocorresse. A partir da curva de carga-deformidade, foram obtidas a carga máxima (N) no momento da fratura, a rigidez (N/mm) e a energia de absorção (J).

### **Análise Histomorfométrica**

Após a remoção das tíbias direitas, o segmento proximal das mesmas foi fixado em etanol a 70%, desidratado, incluído em metilmetacrilato e transversalmente seccionado por meio de micrótomo de impacto com navalha de tungstênio (Modelo JUNG Polycut S, Leica, Alemanha). Cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidos do centro do defeito ósseo, sendo corados com azul de tolúidina a 0,1%. Pelo menos dois cortes não-consecutivos foram examinados para cada amostra. As análises foram realizadas por meio de microscópio (Labophot 2<sup>a</sup>, Nikon) acoplado a placa digitalizadora e programa semi-automático Osteomeasure<sup>®</sup> (Osteometrics, Atlanta, GA, USA).

As medidas foram inicialmente realizadas nos contornos internos e externos em toda a extensão da cortical. Parâmetros estáticos de volume (Ct.V/TV, %) e espessura (Ct.Th,  $\mu\text{m}$ ) corticais foram obtidos. Posteriormente, as medidas foram realizadas em dois campos padronizados no canal medular onde o biomaterial particulado foi implantado. A área total de tecido analisado (T.Ar) foi  $0.3392 \pm 0.0004 \text{ mm}^2$ . Os índices estáticos obtidos nesta região foram: volume ósseo como porcentagem do volume tecidual (BV/TV, %), volume osteóide como porcentagem do volume tecidual (OV/TV, %), espessura osteóide (O.Th,  $\mu\text{m}$ ), número de osteoblastos por área de tecido (N.Ob/T.Ar, / $\text{mm}^2$ ), superfície osteoblástica como porcentagem da superfície óssea (Ob.S/BS,%), número de osteoclastos por área de tecido (N.Oc/T.Ar, / $\text{mm}^2$ ) e superfície osteoclástica como porcentagem da superfície óssea (Oc.S/BS, %). Os índices

histomorfométricos seguiram a nomenclatura padronizada pela American *Society of Bone and Mineral Research*” (PARFITT et al., 1987). As análises foram realizadas às cegas por um único observador.

### **Análise Estatística**

A homogeneidade dos dados foi verificada por meio do teste Shapiro–Wilk’s W. Para as variáveis exibindo distribuição normal (BV/TV, OV/TV, O.Th, N.Ob/T.Ar, Ob.S/BS, N.Oc/T.Ar, absorção de energia), as comparações entre grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via, complementada pelo teste *post-hoc* de Tukey HSD nos casos significantes. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para análise das variáveis que não exibiram distribuição normal (Ct.V/TV, Ct.Th, Oc.S/BS, carga máxima, rigidez). O programa STATISTICA versão 7.0 (data analysis software system - StatSoft Inc.) foi utilizado para conduzir as análises estatísticas. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## **RESULTADOS**

Não foram observadas complicações pós-cirúrgicas, nem alterações no comportamento dos animais. Todos se recuperaram da cirurgia, com retorno rápido aos padrões normais de alimentação e movimentação. O tempo de sacrifício foi atingido sem a ocorrência de eventos adversos.

## Propriedades Biomecânicas

Na Tabela 1 encontram-se expressos os dados obtidos no ensaio mecânico. Os ossos que tiveram os defeitos preenchidos com Biosilicato<sup>®</sup> exibiram propriedades biomecânicas similares aos controles intactos. Somando-se a isso, eles suportaram uma carga significativamente maior antes da ocorrência da fratura e apresentaram maior rigidez que ossos com defeitos controles. Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas comparações entre os grupos Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5, apesar da ausência de diferenças significativas entre este último grupo com defeitos controles.

Tabela 1. Propriedades biomecânicas de tíbias de ratos (grupo intacto controle) após defeitos ósseos cirurgicamente criados (grupo defeito controle) terem sido preenchidos com materiais bioativos particulados (Bioglass<sup>®</sup> 45S5 e Biosilicato<sup>®</sup>).

Índices	Intacto Controle	Defeito Controle	Bioglass <sup>®</sup> 45S5	Biosilicato <sup>®</sup>
Carga Máxima (KN)	0.072 ± 0.003	0.05 ± 0.002*	0.054 ± 0.005*	0.076 ± 0.009**
Absorção de Energia (J)	0.049 ± 0.004	0.023 ± 0.003*	0.034 ± 0.004	0.042 ± 0.006
Rigidez (N/m)	151 ± 12	107 ± 9*	122 ± 11	168 ± 16**

Os dados encontram-se expressos como média ± EPM

\* p < 0.05 vs. intacto controle; \*\* p < 0.05 vs. defeito controle

## Histomorfometria Óssea

O volume cortical (Ct.V/TV) encontrou-se significativamente reduzido nos grupos experimentais submetidos à criação cirúrgica de defeitos ósseos (grupos Defeito Controle, Bioglass<sup>®</sup> 45S5 and Biosilicato<sup>®</sup>) (Fig.1). A espessura cortical também foi significativamente

maior em controles intactos do que nos grupos Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5. Nenhuma diferença significativa foi constatada na comparação entre os grupos Defeito Controle, Bioglass<sup>®</sup> 45S5 e Biosilicato<sup>®</sup>.

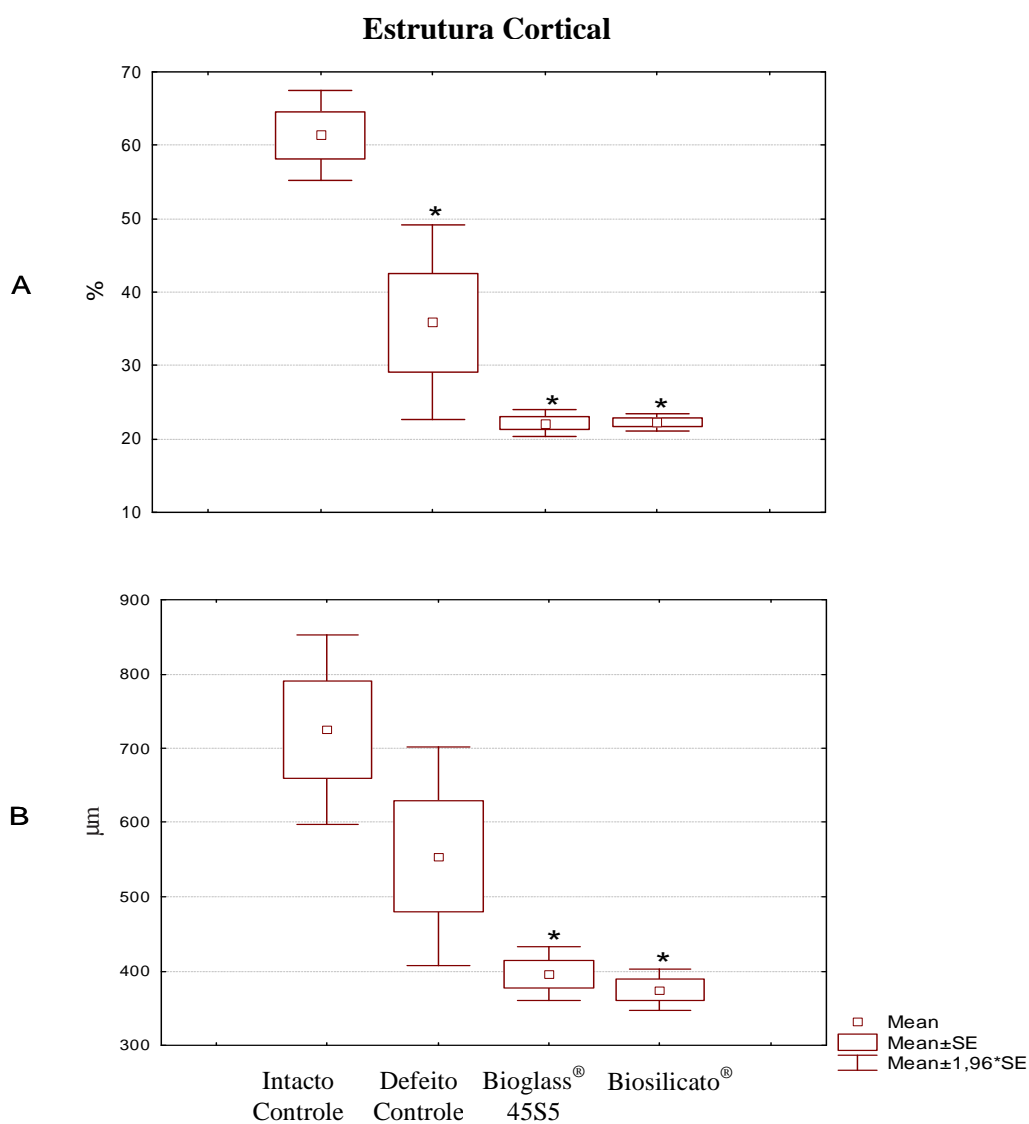


Fig. 1 – A) Volume Cortical (Ct.V/TV, %) e B) Espessura Cortical (Ct.Th,  $\mu\text{m}$ ) em tíbias de ratos (grupo intacto controle) 20 dias após defeitos ósseos cirurgicamente criados (grupo defeito controle) terem sido preenchidos com materiais bioativos (Bioglass<sup>®</sup> 45S5 e Biosilicato<sup>®</sup>).

\*  $p < 0.05$  vs. intacto controle

No entanto, uma grande quantidade de osso imaturo altamente celularizado estava presente circundando os biomateriais particulados e a análise quantitativa demonstrou que o volume ósseo (BV/TV) foi significativamente maior nos grupos Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5 em comparação com ambos os grupos controles (Fig.2), com defeitos não-preenchidos também exibindo atividade osteogênica na região medular. A comparação do Biosilicato<sup>®</sup> com o biomaterial padrão-ouro (Bioglass<sup>®</sup> 45S5) revelou um volume ósseo significativamente maior no grupo Biosilicato<sup>®</sup> (Fig.2).

O osso neoformado foi observado circundando as partículas de Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5, em contato direto com a superfície dos materiais (Fig.3). Ainda mais, os espaços entre as partículas também se encontravam preenchidos com trabéculas recém formadas, originando pontes de ligação entre algumas partículas.

Depósitos de tecido ósseo não-mineralizado (osteóide) foram verificados na superfície do osso imaturo (Fig.3). O volume osteóide foi significativamente maior no grupo Biosilicato<sup>®</sup> do que em ambos os grupos controles (Fig.4), e a espessura osteóide maior do que em intactos controles (Fig.5). Os grupos Bioglass<sup>®</sup> 45S5 e defeito controle também exibiram volume osteóide significativamente maior do que o grupo intacto controle, porém sem diferenças na espessura osteóide.

Osteoblastos cubóides ativos encontravam-se presentes enfileirando áreas de tecido osteóide. Defeitos ósseos preenchidos com Biosilicato<sup>®</sup> demonstraram um número significativamente maior de osteoblastos por área de tecido (N.Ob/T.Ar) do que os defeitos preenchidos com Bioglass<sup>®</sup> 45S5, defeitos não-preenchidos e intactos controles (Fig.6). O número de osteoblastos também foi significativamente maior no grupo Bioglass<sup>®</sup> 45S5 do que em ambos os grupos controles, embora a superfície osteoblástica como porcentagem da



superfície óssea (Ob.S/BS) tenha sido significativamente maior nos grupos controles do que em ambos os grupos tratados (Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5) (Fig.7).

Considerando os parâmetros de reabsorção óssea, verificou-se um número significativamente maior de osteoclastos por área de tecido no grupo Biosilicato<sup>®</sup> em comparação com os grupos defeito e intacto controles (Fig.8), apesar da inexistência de diferenças significativas na superfície osteoclástica como porcentagem da superfície óssea (Fig.9).

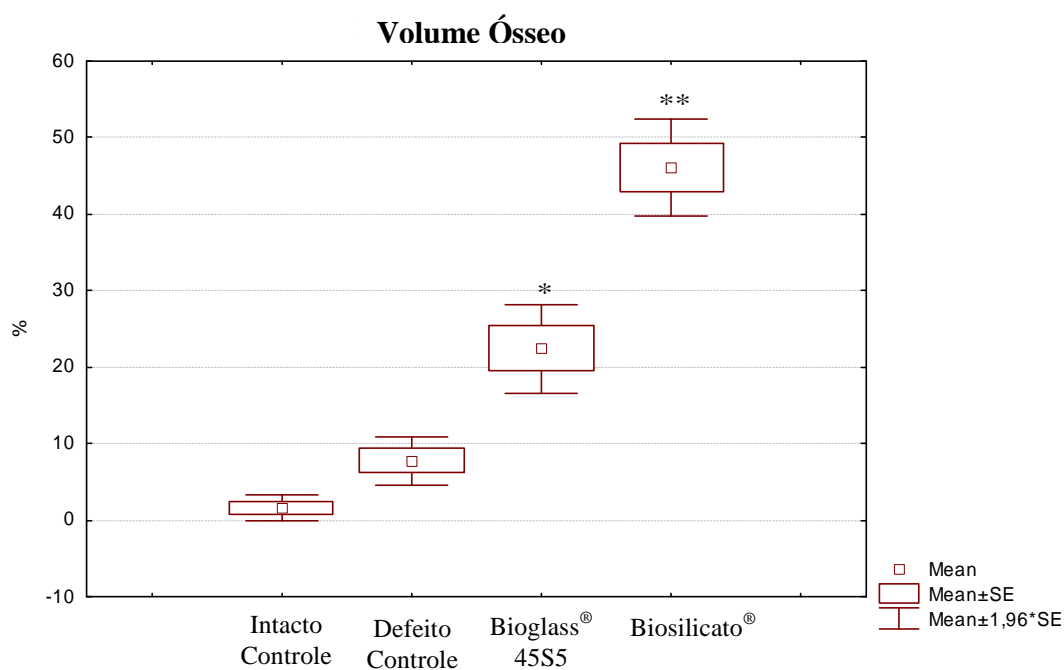


Fig. 2 – Volume ósseo como porcentagem do volume tecidual (BV/TV, %) em tíbias de ratos (grupo intacto controle) 20 dias após defeitos ósseos cirurgicamente criados (grupo defeito controle) terem sido preenchidos com materiais bioativos (Bioglass<sup>®</sup> 45S5 e Biosilicato<sup>®</sup>).

\*  $p < 0.05$  vs. intacto controle e defeito controle

\*\*  $p < 0.05$  vs. intacto controle, defeito controle e Bioglass<sup>®</sup> 45S5

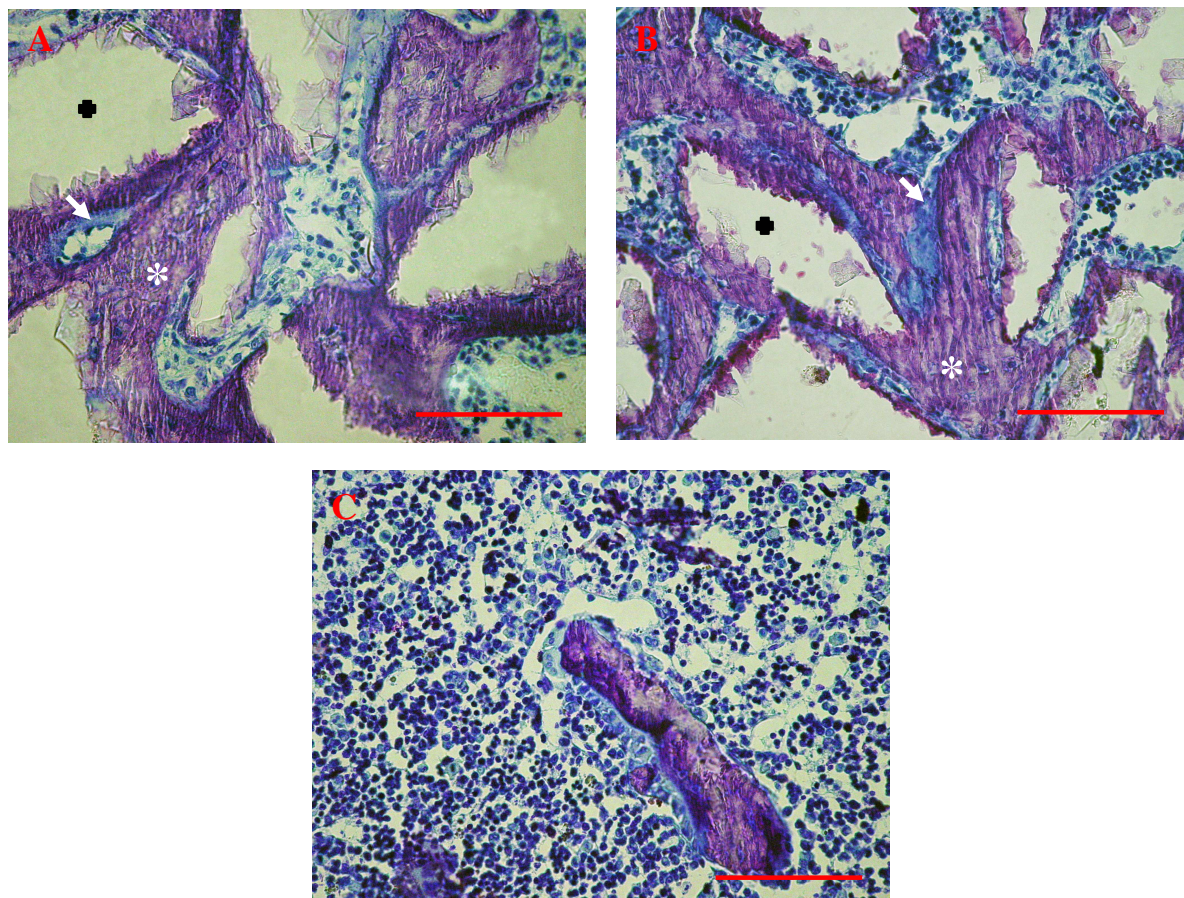


Fig.3 – Partículas (■) de Biosilicato<sup>®</sup> (A) e Bioglass<sup>®</sup> 45S5 (B) envoltas por tecido ósseo imaturo celularizado (\*) coberto parcialmente com depósitos de ósteóide (↑) e fileiras de osteoblastos ativos. Em C, atividade osteogênica também verificada no grupo defeito controle. Coloração com azul de toluidina a 0,1%, barra = 100µm.

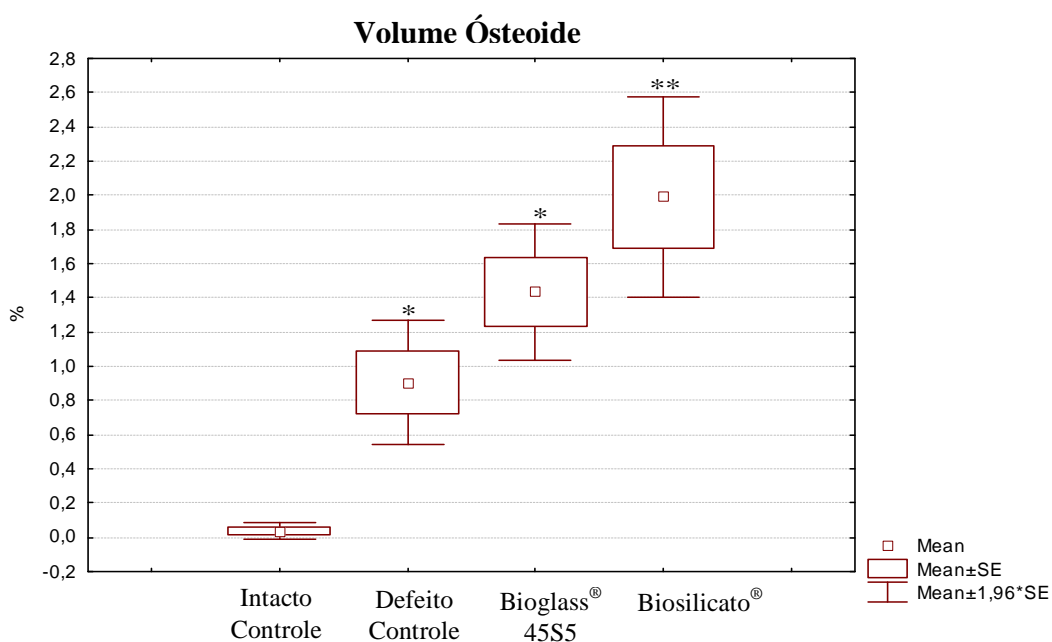


Fig. 4 - Volume ósteoide como porcentagem do volume tecidual (OV/TV, %) em tíbias de ratos (grupo intacto controle) 20 dias após defeitos ósseos cirurgicamente criados (grupo defeito controle) terem sido preenchidos com materiais bioativos (Bioglass® 45S5 e Biosilicato®).

\*  $p < 0.05$  vs. intacto controle

\*\*  $p < 0.05$  vs. intacto controle e defeito controle

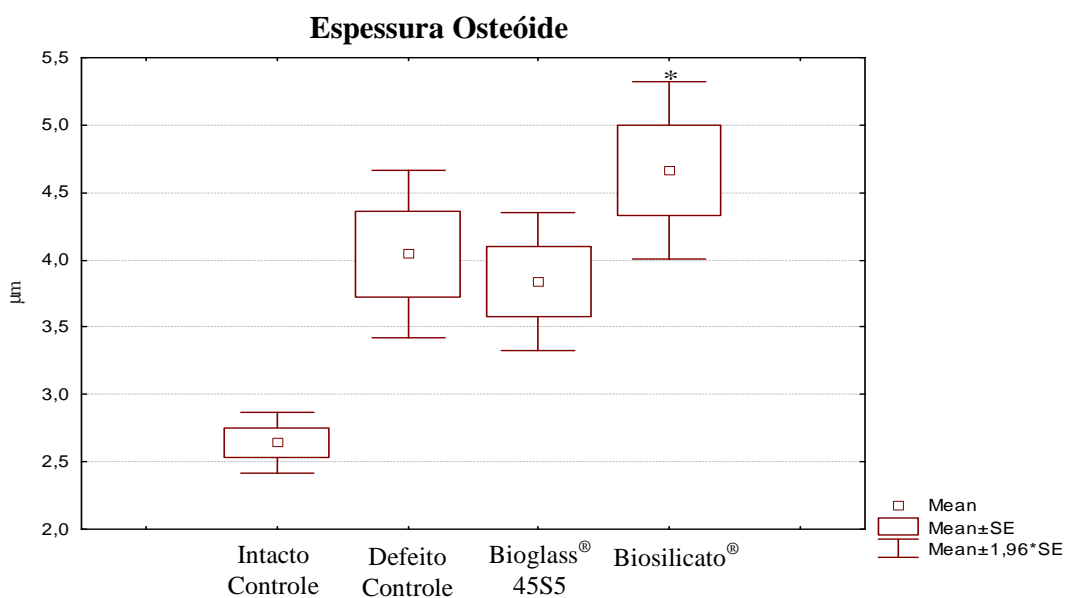


Fig. 5 - Espessura Ósteoide (O.Th,  $\mu\text{m}$ ) em tíbias de ratos (grupo intacto controle) 20 dias após defeitos ósseos cirurgicamente criados (grupo defeito controle) terem sido preenchidos com materiais bioativos (Bioglass® 45S5 e Biosilicato®).

\*  $p < 0.05$  vs. intacto controle

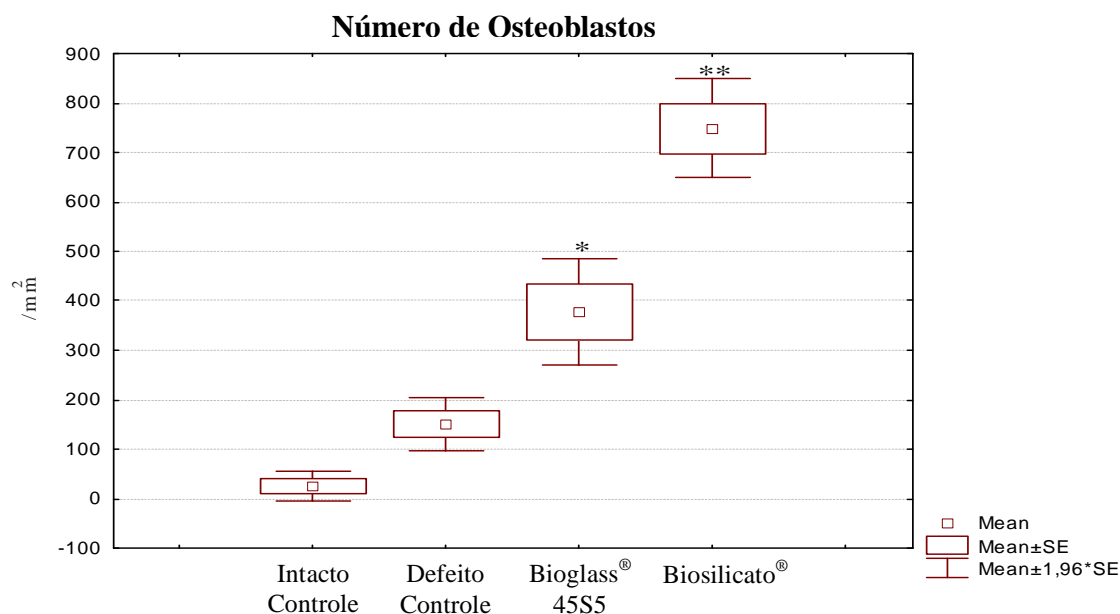


Fig. 6 – Número de osteoblastos por área de tecido (N.Ob/T.Ar, /mm<sup>2</sup>) em tíbias de ratos (grupo intacto controle) 20 dias após defeitos ósseos cirurgicamente criados (grupo defeito controle) terem sido preenchidos com materiais bioativos (Bioglass® 45S5 e Biosilicato®).

\*  $p < 0.05$  vs. controle intacto e controle defeito

\*\*  $p < 0.05$  vs. intacto controle, defeito controle e Bioglass® 45S5

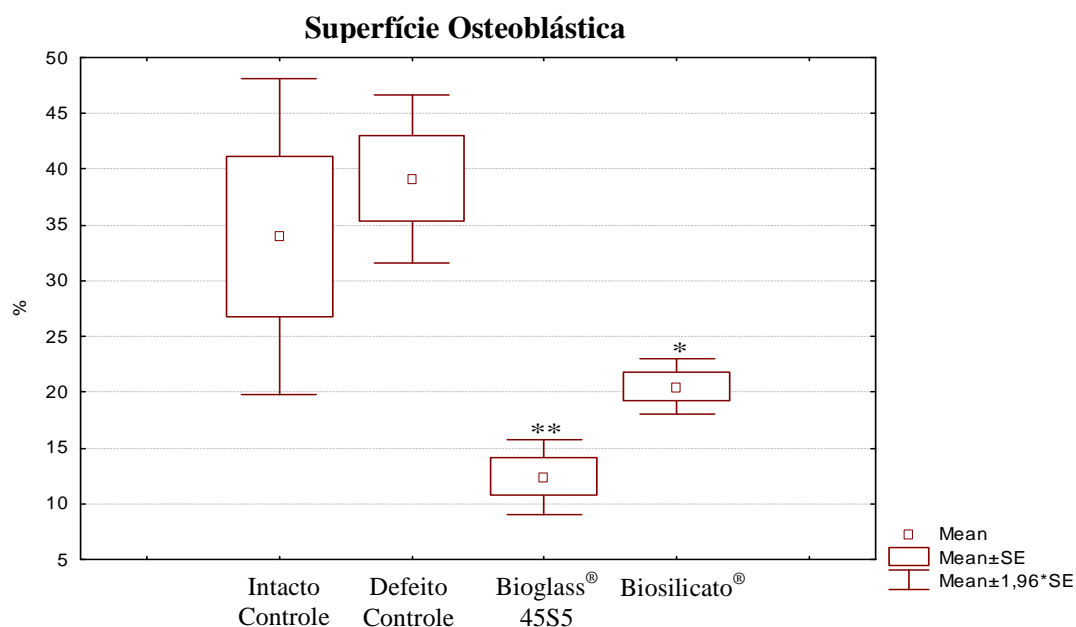


Fig. 7 – Superfície osteoblástica como porcentagem da superfície óssea (Ob.S/BS, %) em tíbias de ratos (grupo intacto controle) 20 dias após defeitos ósseos cirurgicamente criados (grupo defeito controle) terem sido preenchidos com materiais bioativos (Bioglass® 45S5 e Biosilicato®).

\*  $p < 0.05$  vs. defeito controle

\*\*  $p < 0.05$  vs. intacto controle e defeito controle

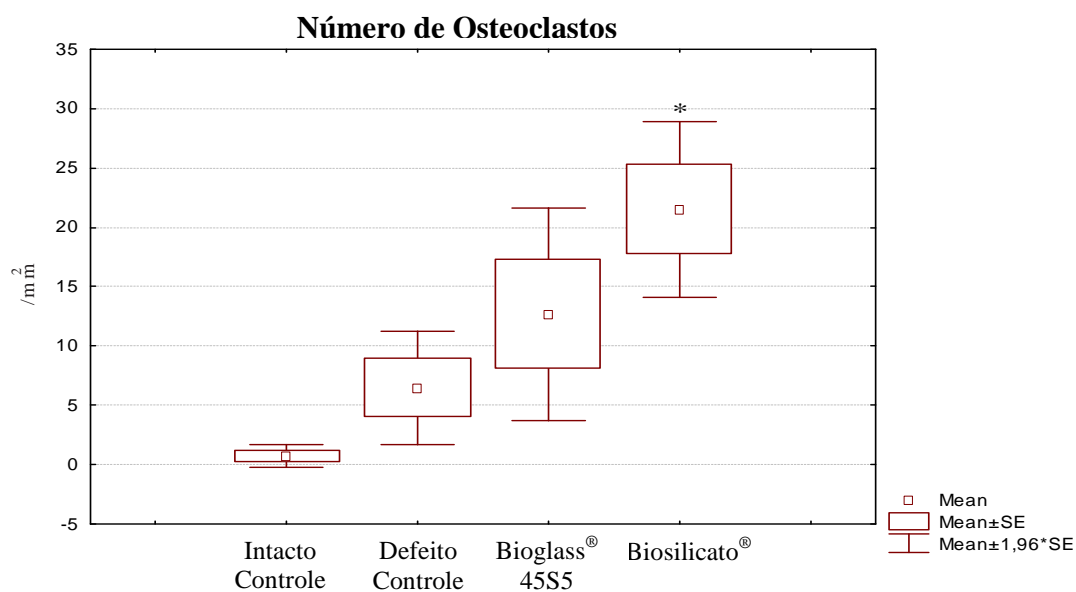


Fig. 8 - Número de osteoclastos por área de tecido (N.Oc/T.Ar, /mm<sup>2</sup>) em tíbias de ratos (grupo intacto controle) 20 dias após defeitos ósseos cirurgicamente criados (grupo defeito controle) terem sido preenchidos com materiais bioativos (Bioglass® 45S5 e Biosilicato®).

\*  $p < 0.05$  vs intacto controle e defeito controle

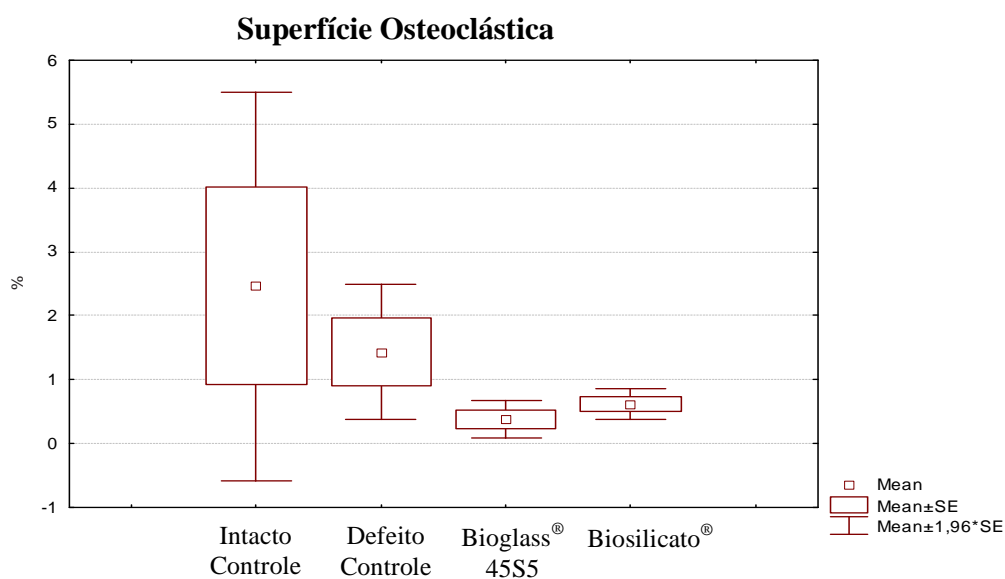


Fig. 9 - Superfície osteoclástica como porcentagem da superfície óssea (Oc.S/BS,%) em tíbias de ratos (grupo intacto controle) 20 dias após defeitos ósseos cirurgicamente criados (grupo defeito controle) terem sido preenchidos com materiais bioativos (Bioglass® 45S5 e Biosilicato®).

## DISCUSSÃO

Tendo em vista que um estudo *in vitro* previamente demonstrou um grande potencial osteogênico do Biosilicato<sup>®</sup> (Moura et al., 2007), hipotetizou-se que esta vitrocerâmica também poderia induzir uma elevada formação óssea *in vivo*. Os resultados do presente estudo demonstraram que, apesar da ausência de diferenças significativas quanto ao reparo cortical, defeitos ósseos que foram preenchidos com Biosilicato<sup>®</sup> particulado exibiram maiores áreas de tecido ósseo neoformado e melhores propriedades biomecânicas.

A massa óssea, bem como a qualidade e o arranjo dos seus elementos microestruturais, influenciam as propriedades mecânicas do osso (Olivera et al., 2008). Portanto, a maior capacidade de suportar cargas e a maior rigidez óssea estimulada pelo Biosilicato<sup>®</sup> provavelmente espelham a ampla quantidade e/ou a distribuição espacial do osso formado ao redor do biomaterial particulado, bem como a existência de fortes ligações formadas entre o tecido e o material, o que pode ser muito útil durante o processo de regeneração óssea.

O osso recém formado encontrava-se em contato direto com as partículas de Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5, envolvendo as mesmas e formando pontes de ligação entre algumas delas. Oonishi et al. (1997) demonstrou uma formação óssea progressiva na superfície de partículas de Bioglass<sup>®</sup> 45S5 preenchendo defeitos ósseos em coelhos. Segundo os autores, o osso recém formado possuía uma arquitetura trabecular incorporando o biomaterial particulado na estrutura óssea.

No presente estudo, a implantação de Biosilicato<sup>®</sup> particulado resultou em formação de grandes áreas tanto de matrizes mineralizadas como não-mineralizadas (osteóide) de tecido ósseo. Apesar de ter sido comparado com um material bioativo mundialmente considerado

padrão-ouro (Bioglass<sup>®</sup> 45S5), este estudo não incluiu defeitos ósseos preenchidos com materiais bioinertes como a alumina, por exemplo, constituindo um grupo controle adicional. No entanto, como um estudo prévio demonstrou que o Biosilicato<sup>®</sup> é comparável com vidros bioativos de classe A (Moura et al., 2007), os achados do presente estudo podem ser explicados por meio da rápida deposição de uma camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA) na superfície de sílica gel como resultado de trocas iônicas entre o material e o ambiente fisiológico. Reações totalmente inorgânicas, previamente descritas por Hench (2003), levam à formação desta fase apatítica e à rápida proliferação de tecido ósseo em um sítio de defeito, um processo denominado osteoprodução.

A composição química e a estrutura cristalina da HCA formada se equivalem à fase mineral do tecido ósseo, constituindo um local propício para a adesão, proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras. Desta forma, a função celular é favorecida e matrizes osteóides são produzidas (Hench, 2003). De fato, fibras colágenas são incorporadas na camada mineralizada de osso neoformado, como demonstrado por microscopia eletrônica na interface do material ligado ao osso (Davies & Baldan, 1997).

Todavia, a cinética das reações que ocorrem na superfície dos materiais bioativos é altamente dependente da composição química dos mesmos (Hench, 2003). No presente estudo, comparações entre os defeitos ósseos preenchidos com Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5, ambos pertencentes ao sistema quarternário  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ , demonstraram áreas de formação de matriz mineralizada significativamente maiores no grupo Biosilicato<sup>®</sup> 20 dias após a implantação. Portanto, a composição específica do Biosilicato<sup>®</sup> no sistema quarternário e/ou sua estrutura cristalina parece ser mais favorável para a osteogênese.

Estes achados *in vivo* corroboram resultados prévios *in vitro* (Moura et al., 2007), que demonstraram osteogênese induzida por discos de Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5, com maiores áreas de matriz calcificada detectadas na vitrocerâmica totalmente cristalina (Biosilicato<sup>®</sup>) após 17 dias em um sistema de cultura osteogênico.

Sendo assim, os tratamentos térmicos para nucleação e crescimento de cristais, desenvolvidos para melhoria das propriedades mecânicas dos vidros, foram também eficientes para que a vitrocerâmica totalmente cristalina (Biosilicato<sup>®</sup>) obtida preservasse os elevados níveis de bioatividade e propriedades osteoprodutoras comumente verificados em materiais vítreos.

Considerou-se que o preenchimento de defeitos ósseos não-críticos foi um modelo eficiente para avaliar o desempenho biológico *in vivo* dos materiais particulados. A implantação intramedular tem sido amplamente utilizada para verificação das respostas ósseas a diversos biomateriais (Nishimura et al., 1991; Oonishi et al., 1997; Kobayashi et al., 1999; Gorustovich et al., 2006). Além disso, a dificuldade em coibir da migração das partículas para além da cavidade óssea foi atenuada pela massa coesiva formada quando o Biosilicato<sup>®</sup> e o Bioglass<sup>®</sup> 45S5 foram implantados nos defeitos em sangramento. Conseqüentemente, um efeito hemostático foi suficientemente obtido, com a manutenção das partículas no sítio cirúrgico. O mesmo fenômeno foi reportado por Oonishi et al. (1997) ao empregar Bioglass<sup>®</sup> 45S5 particulado no preenchimento de defeitos não-críticos em côndilos femorais de coelhos. Segundo estes autores, a massa coesiva é formada devido às rápidas reações na superfície do material que levam ao desenvolvimento da camada de sílica gel, contribuindo para a hemostasia.

Benefícios do Biosilicato<sup>®</sup> para a prática clínica tem sido sugeridos pela sua propriedade de ser facilmente manipulável, hemostático e favorecer a formação óssea. No entanto, pesquisas



recentes indicam que o estágio crítico nas reações para a regeneração óssea está relacionado com a adesão e proliferação de células na superfície dos biomateriais (Xynos et al., 2001; Hench & Polak, 2002; Hench, 2003), mecanismos ainda não completamente elucidados. Acredita-se que as respostas celulares constituem-se em um requisito fundamental para o comportamento bioativo dos materiais (Gao et al., 2001).

Múltiplos estudos vem demonstrando que a exposição de osteoblastos humanos primários aos produtos químicos solúveis do Bioglass<sup>®</sup> 45S5 é responsável pela ativação de diversas famílias de genes em poucas horas, incluindo genes que codificam fatores de transcrição nucleares e potentes fatores de crescimento (Hench et al., 2000; Xynos et al., 2000b; Xynos et al., 2001). Estes achados indicam que vidros bioativos classe A promovem a osteogênese por meio de um controle direto sobre genes que regulam a progressão do ciclo celular, o que poderia explicar o elevado número de osteoblastos por área de tecido (N.Ob/T.Ar) nos grupos Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5 do presente estudo.

Por outro lado, a superfície osteoblástica como porcentagem da superfície óssea foi maior no grupo controle. Portanto, apesar do elevado número de osteoblastos observados em defeitos ósseos preenchidos com Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5, a magnitude de formação óssea parece ter sido superior ao incremento no número de células. De fato, nenhuma célula ou molécula orgânica é necessária para o rápido crescimento de HCA na superfície de vidros e vitrocerâmicas bioativos (Hench, 2003). Todavia, isolar o fenômeno físico-químico das reações influenciadas pela atividade celular parece ser uma explicação mecanicista para as múltiplas e paralelas interações que ocorrem na interface material-tecido (Ducheyne e Qiu, 1999). Considerando esta importante questão, outra hipótese pode envolver uma melhoria da atividade e função celular induzida pelo microambiente criado pela dissolução do Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5. Neste

caso, estes materiais bioativos podem ter sido responsáveis por uma influência não apenas na proliferação de osteoblastos, como também no potencial osteogênico destas células.

Motivados pelo notável número de osteoblastos envolvendo as partículas de Biosilicato<sup>®</sup> verificado no presente estudo, trabalhos adicionais devem ser conduzidos para investigar a influência dos produtos iônicos liberados por esta nova vitrocerâmica no controle genético do ciclo e atividade celulares.

Além disso, uma vez que a matriz óssea tenha sido formada pelos osteoblastos, um esforço adicional deve ser despendido na investigação da sua degradação pelos osteoclastos. O processo de remodelamento, incluindo as atividades de formação e bioreabsorção, é um importante pré-requisito para a obtenção da completa reorganização do biomaterial implantado em tecido ósseo (Nakagawa et al., 2004; Domaschke et al., 2006).

Enquanto muitos estudos focalizam a formação óssea em biomateriais a partir de osteoblastos maduros ou de seus progenitores da medula óssea, poucas investigações enfatizam o papel dos osteoclastos na engenharia do tecido ósseo (Nakagawa et al., 2004). Hamadouche et al. (2001) averiguou, em longo-prazo, a bioatividade e degradabilidade de vidros obtidos por método sol-gel (58S and 77S Bioglass<sup>®</sup>), utilizando o Bioglass<sup>®</sup> 45S5 como controle. Foi observada a reabsorção de ambos os vidros derivados de processos sol-gel, começando em 12 semanas após a implantação e atingindo 40% na 52<sup>a</sup> semana. Os autores assumiram que a degradação foi parcialmente relacionada com a atividade reabsortiva de osteoclastos, uma vez que células viáveis foram observadas em contato direto com a superfície dos materiais. Por outro lado, nenhuma reabsorção pôde ser medida no Bioglass<sup>®</sup> 45S5 após 1 ano de implantação.

No presente estudo, verificou-se um número significativamente maior de osteoclastos por unidade de tecido no grupo Biosilicato<sup>®</sup>, apesar de inexistência de diferenças significativas na superfície osteoclástica como porcentagem da superfície óssea.

Não obstante, este estudo investigou um único estágio do processo de regeneração óssea induzido por uma faixa granulométrica específica do biomaterial particulado. Portanto, outros estudos devem ser desenvolvidos para a promoção de informações adicionais abrangendo a dinâmica da influência do Biosilicato<sup>®</sup> no remodelamento ósseo e as mudanças estruturais ocorrendo neste biomaterial. Esta investigação suplementar deve focar o objetivo final da regeneração induzida, que consiste na capacidade de restaurar a arquitetura óssea com propriedades mecânicas e biológicas similares às dos tecidos naturais.

Embora investigações adicionais sejam necessárias, os achados do presente estudo apontam para a aplicação promissora do Biosilicato<sup>®</sup> na engenharia do tecido ósseo, uma vez que esta vitrocerâmica parece favorecer a formação óssea *in vivo* e o estabelecimento de fortes ligações com o tecido neoformado.

## **ESTUDO 2**

**“Cinética comparativa das respostas  
ósseas a diferentes faixas granulométricas do  
Biosilicato<sup>®</sup> particulado”**

## INTRODUÇÃO

A capacidade de se ligar ao tecido ósseo é uma característica peculiar dos materiais bioativos (Hench e Polak, 2002; Hench, 2003). Esta propriedade exclusiva tem atraído um vasto interesse para o tratamento de diversas situações clínicas (Oonishi et al. 1997), especialmente se consideradas as demandas por terapêuticas ósseas e articulares de alta qualidade exigidas pela crescente população idosa no mundo todo (Laurencin et al., 1999; Hench, 2005).

Os mecanismos que tornam os materiais bioativos elegíveis para a regeneração óssea envolvem uma sequência de reações inorgânicas, previamente descritas por Hench (2003), que levam ao rápido crescimento de uma camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA) na superfície do material imerso em ambientes fisiológicos. Esta fase apatítica apresenta composição química e estrutura cristalina equivalente à fase mineral dos tecidos ósseos vivos, constituindo um local propício para a adesão, proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras (Hench, 2003).

Uma atenção inicial foi despendida nestas alterações ocorrendo na superfície dos materiais bioativos, porém achados adicionais favoreceram o conceito de que o mecanismo para regeneração tecidual *in-situ* está envolvido com o controle genético das respostas celulares pelos produtos da dissociação iônica destes materiais (Gao, 2001; Hench, 2003; Hench, 2005). De fato, a exposição de osteoblastos humanos aos íons liberados pelo Bioglass<sup>®</sup> 45S5, amplamente conhecido como o material com o maior índice de bioatividade (Hench, 2003), é responsável pela ativação de pelo menos sete famílias de genes que codificam proteínas conhecidas por influenciar todos os aspectos

que envolvem a proliferação e a diferenciação celular (Hench et al., 2000; Xynos et al., 2001).

Estes achados indicam que os materiais bioativos podem favorecer a regeneração óssea através de métodos mais biológicos do que a mera substituição de tecidos. No entanto, uma maior vantagem desta propriedade pode ser obtida por meio da investigação da taxa na qual os materiais bioativos sofrem as reações sequenciais na direção da formação óssea e da estimulação celular (Oonish et al., 1999; Ducheyne and Qiu, 1999). Os fatores cinéticos que influenciam a reatividade dos materiais, como a composição química, cristalinidade e tamanho das partículas, afetam profundamente as respostas ósseas (Ducheyne and Qiu, 1999; Vallet-Regi, 2001; Cruz et al.; 2006). Portanto, estes fatores podem ser controlados para diferentes propósitos na prática clínica, uma vez que alguns efeitos podem ser preteridos a outros dependendo da situação específica.

Considerando a cristalização, sabe-se que a introdução de fases cristalinas em um material pode, em princípio, diminuir a cinética da formação da camada de HCA em fluido corporal simulado (SBF) K9 (Peitl-Filho et al., 1996; Vallet-Regi, 2001). No entanto, experimentos *in vitro* demonstraram que uma nova vitrocerâmica totalmente cristalina do sistema quaternário  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$  (Biosilicato<sup>®</sup>, patente WO 2004/074199) exibiu em 24 horas uma camada de apatita formada sobre sua superfície em SBF, o que a torna comparável aos vidros bioativos classe A (Moura et al., 2007). Ainda mais, discos de Biosilicato<sup>®</sup> demonstraram maiores áreas de matriz calcificada após 17 dias em um sistema de cultura osteogênico, em comparação com o Bioglass<sup>®</sup> 45S5 e com o próprio Biosilicato<sup>®</sup> vítreo (Moura et al., 2007).

Apesar destes efeitos positivos obtidos pela cristalização de vidros bioativos no sistema  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ , diferentes faixas granulométricas desta vitrocerâmica ainda não foram estudadas. O tamanho das partículas afeta a taxa de dissolução de um biomaterial, influenciando na cinética das reações subsequentes e, como consequência, na modulação da atividade osteoprodutora (Oonish et al., 1999; Cruz et al. 2006). Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi comparar a cinética das respostas do tecido ósseo frente a duas diferentes granulometrias do Biosilicato<sup>®</sup> e do Bioglass<sup>®</sup> 45S5 (biomaterial padrão-ouro) implantados em defeitos ósseos em ratos.

## **METODOLOGIA**

### **Biomateriais**

Sílica de alta pureza, carbonato de cálcio, carbonato de sódio e fosfato de sódio foram usados para obtenção da composição genérica do Bioglass<sup>®</sup> 45S5 e do Biosilicato<sup>®</sup> vítreo. As matérias-primas foram pesadas e misturadas nas devidas proporções durante 30 minutos. Em seguida, as composições eram deixadas homogeneizar por cerca de 3 horas a temperatura entre 1250 e 1380°C em forno elétrico de fusão (Rapid Temp 1710 BL, CM Furnaces Inc., Bloomfield, NJ, EUA) no Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos, SP, Brasil). Imediatamente depois, o líquido era vertido em moldes aço inox para proporcionar um rápido resfriamento do material, possibilitando a obtenção de placas vítreas.

Para obtenção da vitrocerâmica totalmente cristalizada (Biosilicato<sup>®</sup>), as placas de Biosilicato<sup>®</sup> vítreo passaram por ciclos de tratamento térmico para promover sua cristalização. Os primeiros ciclos térmicos foram executados em baixas temperaturas para favorecer a nucleação volumétrica dos cristais. Posteriormente, as amostras nucleadas foram submetidas a tratamentos térmicos a uma temperatura superior à de transição do vidro para ocasionar a total cristalização do material. A composição e o protocolo de tratamentos térmicos para obtenção do Biosilicato<sup>®</sup> estão descritos detalhadamente na patente WO 2004/074199 (Zanotto et al., 2004).

Finalmente, as placas de Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5 foram moídas e os materiais particulados obtidos foram peneirados para a seleção das faixas granulométricas 180-210  $\mu\text{m}$  e 300-355  $\mu\text{m}$ , que foi empregada no preenchimento dos defeitos ósseos no presente estudo.

### **Delineamento Experimental e Procedimentos Cirúrgicos**

Cem ratos *Wistar* machos (idade média de 12 semanas e peso corporal entre 250-300 g) foram randomicamente distribuídos em 5 grupos de 20 animais cada. Os grupos diferem quanto ao material bioativo utilizado no preenchimento dos defeitos ósseos e quanto a granulometria destes biomateriais particulados:

- Grupo controle (defeitos ósseos sem preenchimento)
- Grupo Bioglass<sup>®</sup> 45S5 (180 a 210  $\mu\text{m}$ )
- Grupo Bioglass<sup>®</sup> 45S5 (300 a 355  $\mu\text{m}$ )
- Grupo Biosilicato<sup>®</sup> (180 a 210  $\mu\text{m}$ )
- Grupo Biosilicato<sup>®</sup> (300 a 355  $\mu\text{m}$ )



Todos os grupos foram divididos em 2 sub-grupos, considerando diferentes tempos para a análise das amostras (10 e 20 dias após o procedimento cirúrgico).

Os procedimentos cirúrgicos envolveram a confecção bilateral de defeitos ósseos de tamanho não crítico no terço superior das tíbias (10 mm distais da articulação do joelho). As cirurgias foram realizadas em condições estéreis e anestesia geral induzida por injeção intra-peritoneal de Ketamina/ Xylazina (80/10 mg/Kg). Inicialmente, a face medial da tíbia foi exposta por meio de uma incisão longitudinal na pele tricomizada. Um defeito ósseo padronizado com 2,5 mm de diâmetro foi confeccionado em cada osso por meio de broca esférica motorizada e irrigação com soro fisiológico. Os defeitos foram comprimidos com gaze durante 5 minutos. Imediatamente em seguida, as cavidades ósseas foram totalmente preenchidas com o biomaterial particulado correspondente ao grupo experimental no caso dos animais tratados. Após a implantação, foram realizadas suturas internas e externas com fio cirúrgico (Catgut 4.0). O estado de saúde dos ratos foi monitorado diariamente. Os animais foram mantidos em condições naturais de temperatura e umidade, ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração comercial.

Decorridos 10 e 20 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados com uma overdose de anestésico e as tíbias foram bilateralmente extraídas para análise.

Todos os procedimentos foram estritamente conduzidos de acordo com os princípios internacionais para o uso de animais em laboratórios. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos.

### **Histomorfometria Óssea**

Após a remoção das tíbias direitas, o segmento proximal das mesmas foi fixado em etanol a 70%, desidratado, incluído em metilmetacrilato e transversalmente seccionado por meio de micrótomo de impacto com navalha de tungstênio (Modelo JUNG Polycut S, Leica, Alemanha). Cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidos do centro do defeito ósseo, sendo corados com azul de toluidina a 0,1%. Pelo menos dois cortes não-consecutivos foram examinados para cada amostra. As análises foram realizadas por meio de microscópio (Labophot 2ª, Nikon) acoplado a placa digitalizadora e programa semi-automático Osteomeasure<sup>®</sup> (Osteometrics, Atlanta, GA, USA). As medidas foram realizadas em um campo padronizado e representativo na região externa do canal medular. A área total de tecido analisado (T.Ar) foi  $0,1697 \pm 0,0002 \text{ mm}^2$ . Os índices estáticos obtidos foram: volume ósseo como porcentagem do volume tecidual (BV/TV, %), volume osteóide como porcentagem do volume tecidual (OV/TV, %), volume de fibrose medular como porcentagem do volume tecidual (Fb.V/TV, %), número de osteoblastos por área de tecido (N.Ob/T.Ar, / $\text{mm}^2$ ), superfície osteoblástica como porcentagem da superfície óssea (Ob.S/BS, %), número de osteoclastos por área de tecido (N.Oc/T.Ar, / $\text{mm}^2$ ) e superfície osteoclástica como porcentagem da superfície óssea (Oc.S/BS, %).

O espaço ocupado pelas partículas dos biomateriais foi também mensurado para a determinação do volume (BGV, %) e da espessura (BG.Th,  $\mu\text{m}$ ) das partículas no local. Estas medidas foram realizadas na mesma área tecidual onde os índices histomorfométricos ósseos foram obtidos, portanto permitindo o cálculo dos volumes

ósseo e osteóide como porcentagem do volume tecidual livre de partículas (volume ósseo e osteóide normalizados, %).

### **Análise Estatística**

O teste de Kruskal-Wallis foi empregado na comparação entre os grupos experimentais. O teste de Wilcoxon pareado foi utilizado para comparação entre os sub-grupos. As análises estatísticas foram conduzidas por meio do programa STATISTICA versão 7.0 (data analysis software system - StatSoft Inc.). Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## **RESULTADOS**

As partículas de Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5 encontravam-se envoltas por tecido ósseo imaturo, sem diferenças na qualidade do osso neoformado no período avaliado neste estudo. No entanto, os defeitos ósseos preenchidos com Biosilicato<sup>®</sup> na granulometria 180-210 $\mu$ m exibiram volumes ósseos significativamente maiores no dia 20 do que os defeitos preenchidos com o mesmo biomaterial na granulometria 300-355 $\mu$ m (Fig.1). Além disso, apenas as menores partículas do Biosilicato<sup>®</sup> promoveram formação óssea significativamente superior ao Bioglass<sup>®</sup> 45S5 após 20 dias (Fig.1). Nenhuma diferença foi verificada no dia 10. Resultados semelhantes foram obtidos para o volume ósseo como uma porcentagem do volume tecidual (BV/TV) e como uma porcentagem do

espaço livre de partículas (volume ósseo normalizado), nos grupos cujos defeitos foram preenchidos com biomateriais.

Defeitos não-preenchidos (controles) demonstraram menor volume ósseo que todas as granulometrias do Biosilicato<sup>®</sup> e do Bioglass<sup>®</sup> 45S5 nos dois tempos de análise das amostras (Fig.1), exceto o grupo Bioglass<sup>®</sup> 45S5, 300-355  $\mu\text{m}$ , no dia 10.

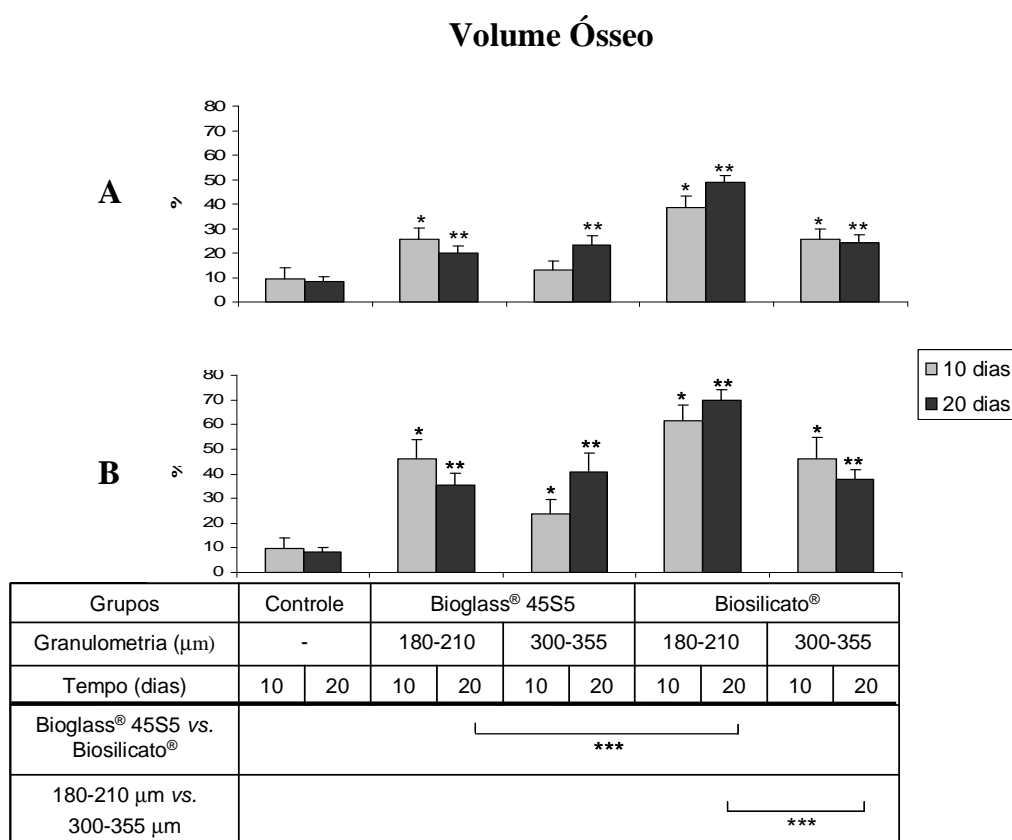


Fig. 1 – Volume ósseo como porcentagem do volume tecidual (A) e Volume Ósseo Normalizado (B) 10 e 20 dias após defeitos ósseos (Grupo Controle) terem sido preenchidos com biomateriais (Bioglass<sup>®</sup> 45S5 e Biosilicato<sup>®</sup>) particulados em duas faixas granulométricas. Dados expressos como média  $\pm$  EPM.

\*  $p < 0,05$  vs. controle 10 dias / \*\*  $p < 0,05$  vs. controle 20 dias / \*\*\*  $p < 0,05$

Não existiram diferenças significativas no volume osteóide entre os grupos com biomateriais (Fig.2). No entanto, apenas os grupos com Biosilicato<sup>®</sup> apresentaram

volume ósteóide como porcentagem do volume tecidual significativamente maior que o grupo controle no dia 10 (Fig. 2).

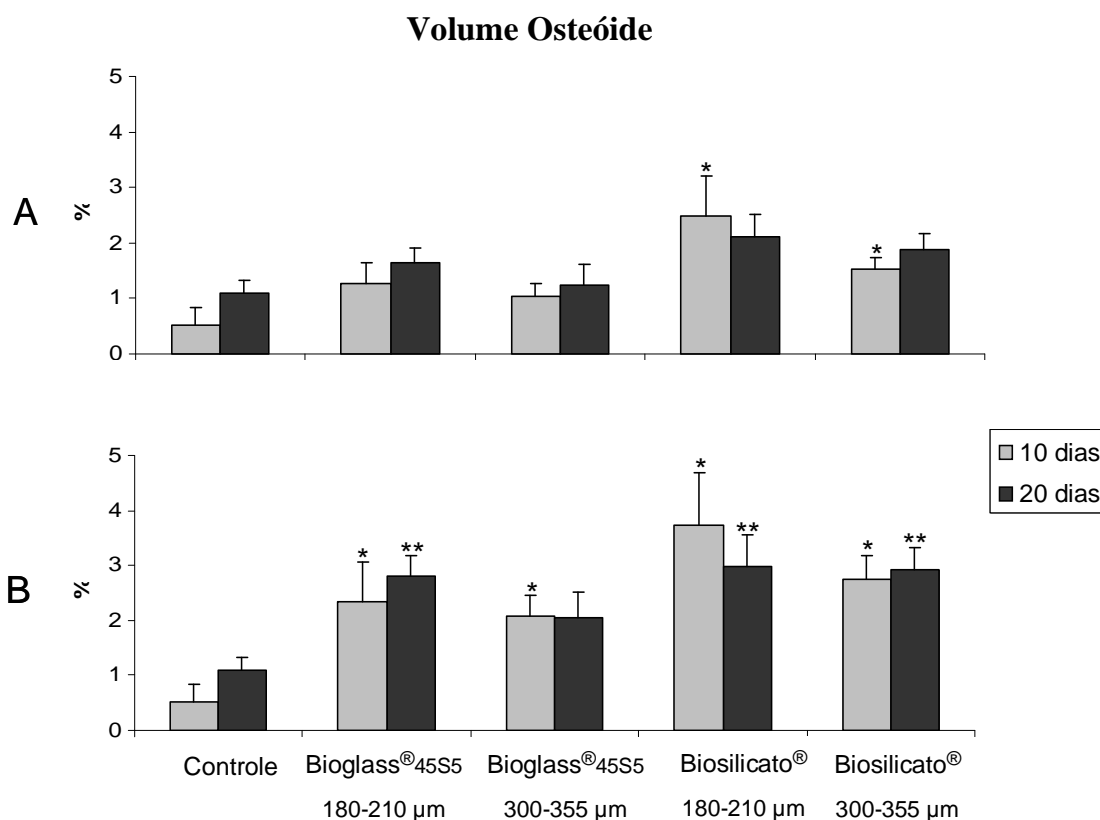


Fig. 2 - Volume osteóide como porcentagem do volume tecidual (A) e Volume Ósteóide Normalizado (B) 10 e 20 dias após defeitos ósseos (Grupo Controle) terem sido preenchidos com biomateriais (Bioglass® 45S5 e Biosilicato®) particulados em duas faixas granulométricas. Dados expressos como média  $\pm$  EPM.

\*  $p < 0,05$  vs. controle 10 dias / \*\*  $p < 0,05$  vs. controle 20 dias

Defeitos preenchidos com partículas de 180 a 210  $\mu\text{m}$  de Biosilicato® demonstraram um número significativamente maior de osteoblastos por unidade de área tecidual (N.Ob/T.Ar) que defeitos preenchidos com partículas de 300 a 355  $\mu\text{m}$ , nos dois tempos avaliados (Fig.3). No entanto, o número de osteoblastos não diferiu entre as duas granulometrias do Bioglass® 45S5. Comparações entre os biomateriais revelaram

superioridade nos grupos do Biosilicato<sup>®</sup>, exceto na faixa granulométrica 300 a 355  $\mu\text{m}$  no dia 20. A mesma disparidade entre biomateriais foi verificada na superfície osteoblástica como porcentagem da superfície óssea (Fig.4), apesar da inexistente diferença entre granulometrias.

As duas faixas granulométricas do Biosilicato<sup>®</sup> e do Bioglass<sup>®</sup> 45S5 exibiram um número de osteoblastos significativamente maior que o grupo controle, nos dois períodos avaliados, exceção feita ao grupo Bioglass<sup>®</sup> 45S5, 300-355  $\mu\text{m}$ , no dia 20 (Fig.3).

### Número de Osteoblastos

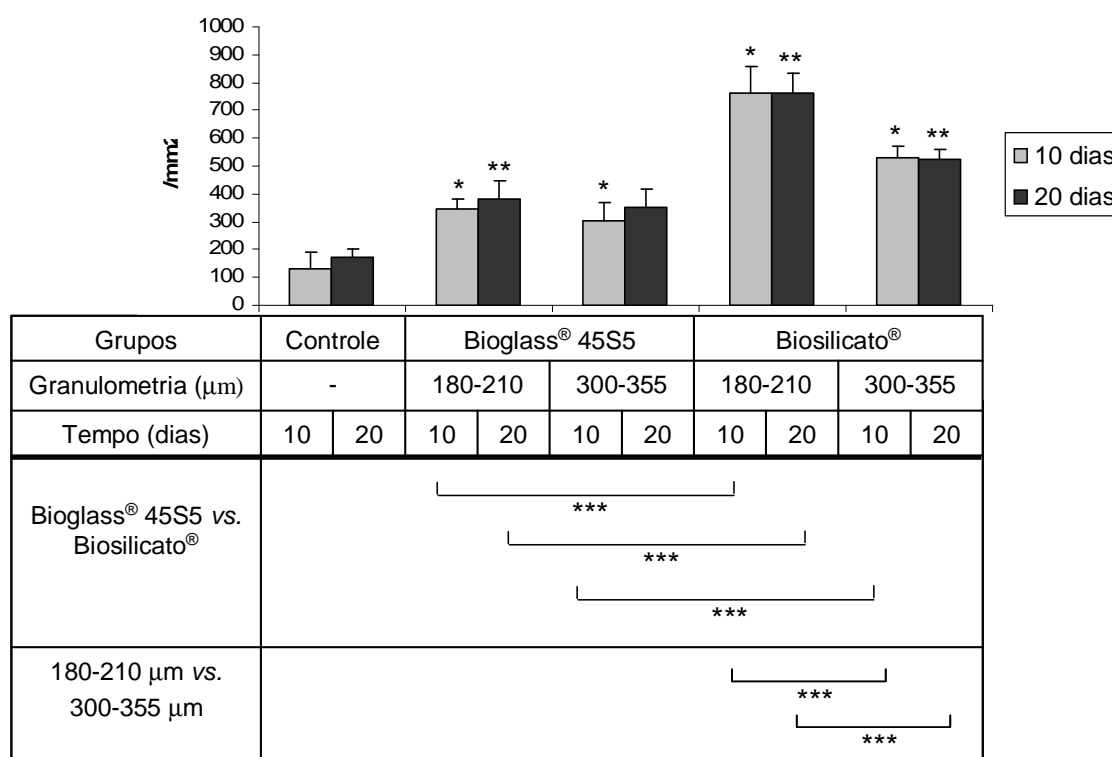


Fig. 3 – Número de osteoblastos por área de tecido (N.Ob/T.Ar, /mm<sup>2</sup>) 10 e 20 dias após defeitos ósseos (Grupo Controle) terem sido preenchidos com biomateriais (Bioglass<sup>®</sup> 45S5 e Biosilicato<sup>®</sup>) particulados em duas faixas granulométricas. Dados expressos como média  $\pm$  EPM.

\*  $p < 0,05$  vs. controle 10 dias / \*\*  $p < 0,05$  vs. controle 20 dias / \*\*\*  $p < 0,05$

### Superfície Osteoblástica

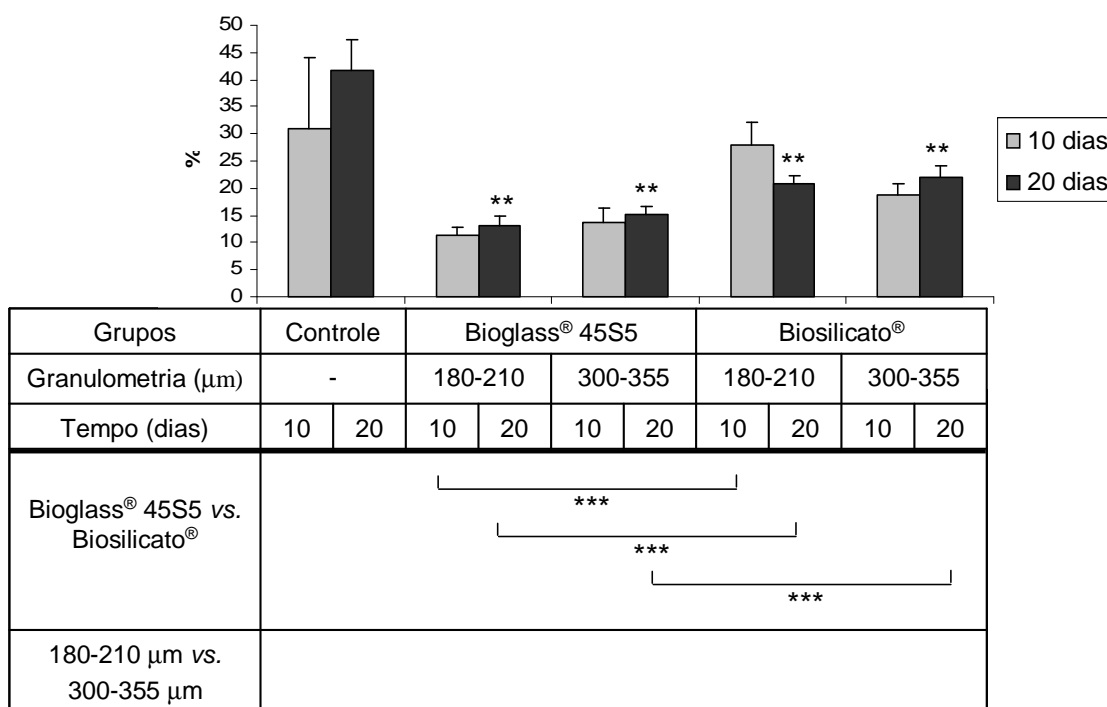


Fig. 4 – Superfície osteoblástica como porcentagem da superfície óssea (Ob.S/BS,%) 10 e 20 dias após defeitos ósseos (Grupo Controle) terem sido preenchidos com biomateriais (Bioglass® 45S5 e Biosilicato®) particulados em duas faixas granulométricas.

Dados expressos como média ± EPM.

\*  $p < 0,05$  vs. controle 10 dias / \*\*  $p < 0,05$  vs. controle 20 dias / \*\*\*  $p < 0,05$

Considerando os parâmetros de reabsorção óssea, não existiram diferenças significativas entre os materiais bioativos quanto ao número de osteoclastos por área de tecido (Fig.5), nem quanto à superfície osteoclástica como porcentagem da superfície óssea (Fig.6). O Bioglass® 45S5 e o Biosilicato®, na granulometria 180-210 μm, demonstraram um número significativamente maior de osteoclastos que o grupo controle nos dias 10 e 20, respectivamente (Fig.5).

### Número de Osteoclastos

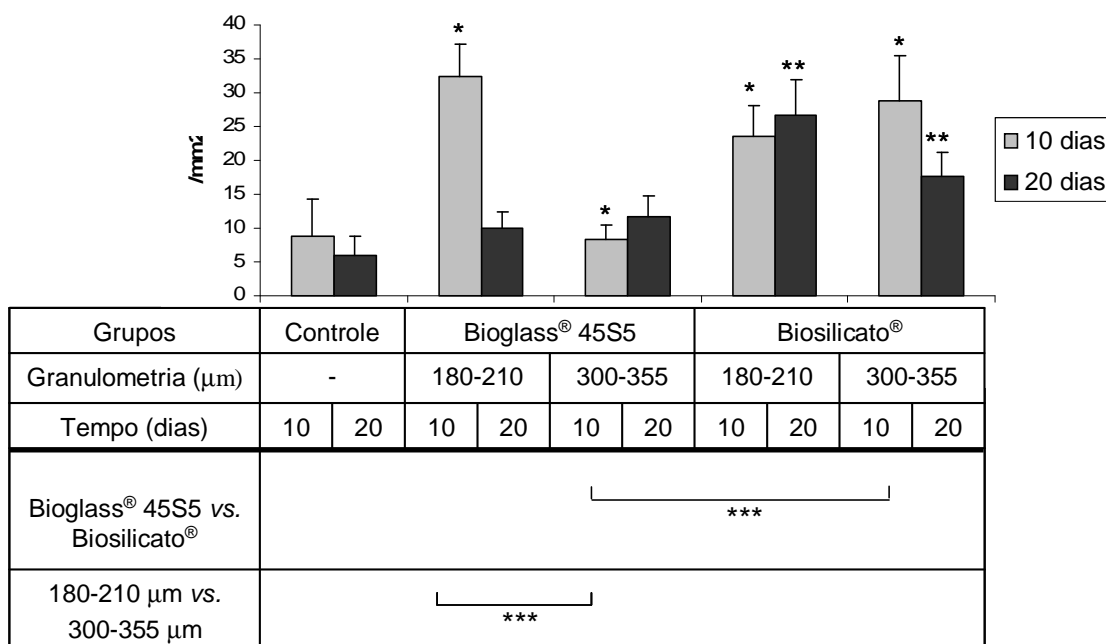


Fig. 5 - Número de osteoclastos por unidade de área de tecido (N.Oc/T.Ar, /mm<sup>2</sup>) 10 e 20 dias após defeitos ósseos (Grupo Controle) terem sido preenchidos com biomateriais (Bioglass® 45S5 e Biosilicato®) particulados em duas faixas granulométricas. Dados expressos como média ± EPM.

\* p < 0,05 vs. controle 10 dias / \*\* p < 0,05 vs. controle 20 dias

### Superfície Osteoclástica

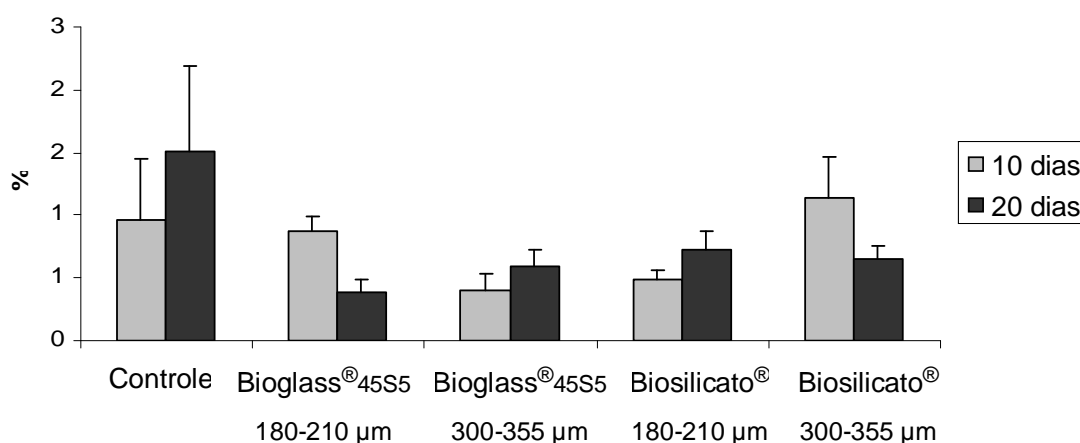


Fig. 6 - Superfície osteoclástica como porcentagem da superfície óssea (Oc.S/BS,%) 10 e 20 dias após defeitos ósseos (Grupo Controle) terem sido preenchidos com biomateriais (Bioglass® 45S5 e Biosilicato®) particulados em duas faixas granulométricas. Dados expressos como média ± EPM.



Não existiram diferenças significativas entre os grupos considerando a porcentagem de volume tecidual ocupado pelas partículas dos biomateriais no dia 10 (Fig.7). Neste mesmo período, não foram encontradas diferenças com relação à espessura dos biomateriais, considerando as mesmas faixas granulométricas de Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5. No entanto, a espessura das partículas no grupo Biosilicato<sup>®</sup> 180-210µm significativamente diminuiu entre os dias 10 e 20. No dia 20, este grupo experimental demonstrou o volume e a espessura do biomaterial significativamente menores que o grupo Bioglass<sup>®</sup> 45S5 na mesma granulometria. Portanto, um período de 10 dias entre as análises parece ser insignificante para a reabsorção dos materiais bioativos avaliados, exceto para o Biosilicato<sup>®</sup> na granulometria 180-210 µm, que demonstrou evidências de dissolução parcial.

Defeitos ósseos controles (não-preenchidos) exibiram uma fibrose medular transitória neste estudo, uma vez que as áreas fibróticas desapareceram totalmente no dia 20. Apenas defeitos preenchidos com Biosilicato<sup>®</sup> na granulometria 300-355µm demonstraram desempenho similar. Os outros grupos exibiram volume fibrótico significativamente maior no dia 20, apesar das inexistentes diferenças no dia 10 (Fig.8).

### Volume (A) e Espessura (B) dos Biomateriais

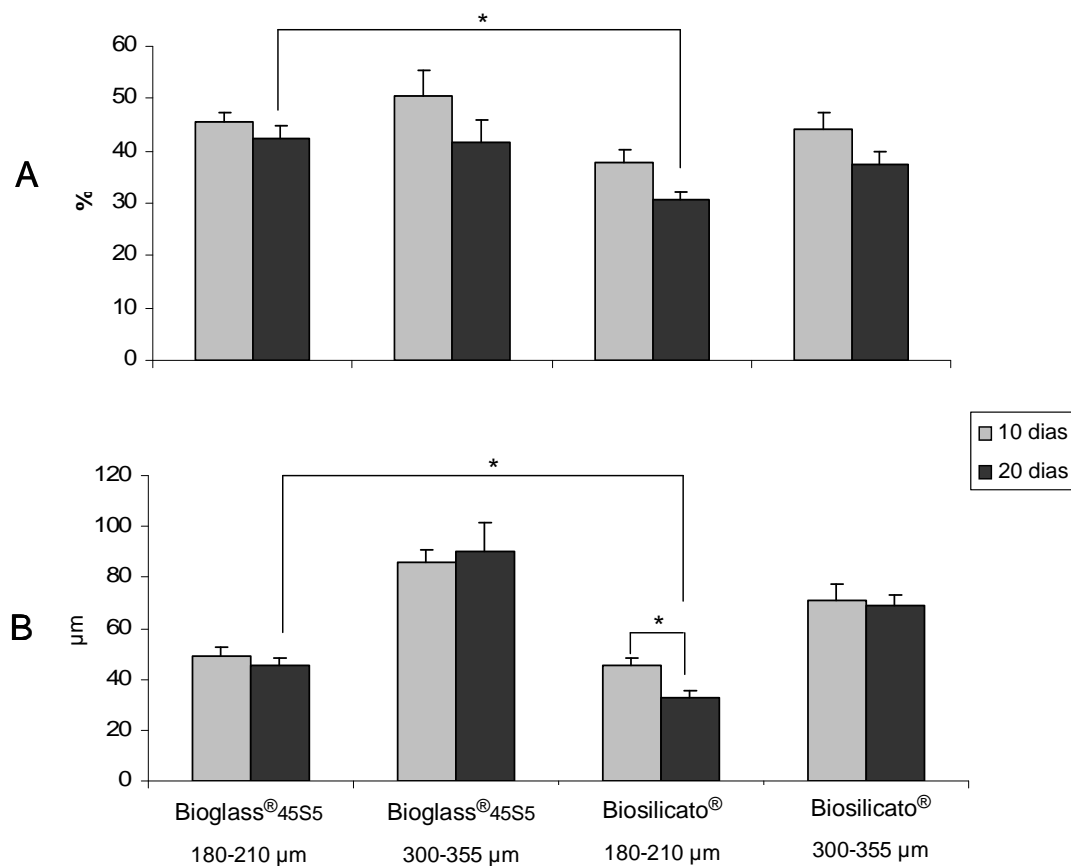


Fig. 7 - Volume (A) e Espessura (B) dos biomateriais (Bioglass® 45S5 e Biosilicato®) particulados em duas faixas granulométricas 10 e 20 dias após o preenchimento dos defeitos ósseos. Dados expressos como média ± EPM.

\*  $p < 0,05$

### Volume Fibrose Medular

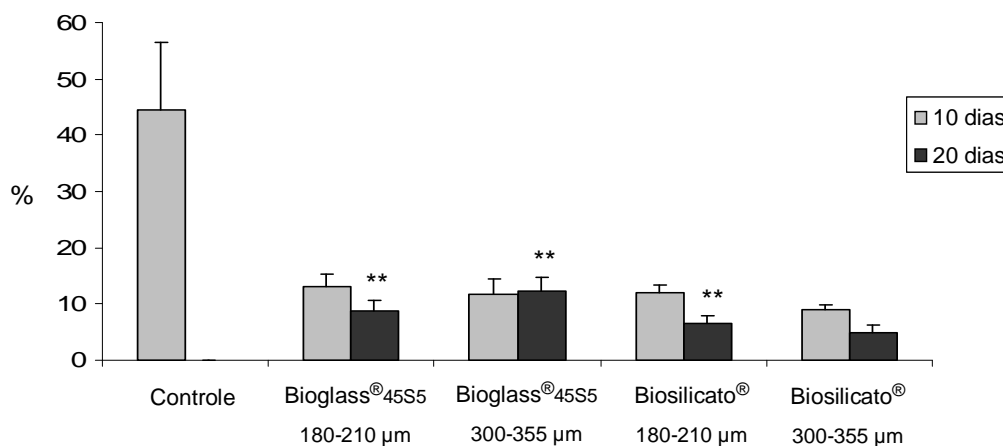


Fig. 8 – Volume de fibrose medular (Fb.V/TV, %) 10 e 20 dias após defeitos ósseos (Grupo Controle) terem sido preenchidos com biomateriais (Bioglass® 45S5 e Biosilicato®) particulados em duas faixas granulométricas. Dados expressos como média ± EPM.

\*  $p < 0,05$  vs. controle 10 dias / \*\*  $p < 0,05$  vs. controle 20 dias

## DISCUSSÃO

Acredita-se que geralmente as respostas biológicas variem de acordo com os fatores que influenciam a reatividade de um biomaterial (Ducheyne and Qiu, 1999; Oonish et al., 1999; Cruz et al. 2006). Neste contexto, o presente estudo foi delineado para a comparação dos efeitos de duas distribuições granulométricas de Biosilicato® e de Bioglass® 45S5 (material bioativo padrão-ouro) em defeitos ósseos em tíbias de ratos.

As partículas de Biosilicato® pertencentes à faixa granulométrica 180 a 210µm foram as únicas a exibirem reabsorção parcial nas condições do presente estudo. Sabe-se que o tamanho das partículas é uma influência crucial nesta propriedade, uma vez que afeta diretamente a área superficial disponível para as reações com células e fluidos fisiológicos (Vallet-Regi, 2001; Cruz et al, 2006). No geral, quanto menor o tamanho da

partícula, mais rápida será a reabsorção de um biomaterial. Portanto, a vantagem das partículas na granulometria 180-210 $\mu\text{m}$  para serem reabsorvidas, em comparação com as de 300-355 $\mu\text{m}$ , corrobora este conceito geral.

No entanto, as comparações entre os diferentes materiais bioativos revelaram achados contraditórios aos previamente esperados. O Biosilicato<sup>®</sup>, que é uma vitrocerâmica totalmente cristalina, exibiu reabsorção significativamente superior ao Bioglass<sup>®</sup> 45S5, que possui estrutura vítrea. Composições cristalinas são caracterizadas por uma estrutura espacial organizada de distribuição atômica (Vallet-Regi, 2001; Cruz et al., 2006). Por outro lado, a estrutura dos vidros possui uma desordem inerente (elevado número de defeitos estruturais e não-cristalinidade) que tem sido associada a uma maior solubilidade destes materiais (Vallet-Regi, 2001). Diversos estudos demonstraram que a solubilidade é inversamente correlacionada com a cristalinidade (Fulmer et al., 2002; Yang et al., 2005; Yoh et al., 2008). O discordante resultado do presente estudo pode ser devido à diferença na composição específica do Biosilicato<sup>®</sup> e do Bioglass<sup>®</sup> 45S5 dentro do sistema quaternário  $\text{P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2$ , no qual ambos pertencem, ou devido à estrutura cristalina inerente ao Biosilicato<sup>®</sup>. Estudos adicionais devem ser conduzidos visando uma investigação mais profunda deste fenômeno, incluindo grupos experimentais com o Biosilicato<sup>®</sup> vítreo e maiores tempos para análise das amostras.

No entanto, houve coerência entre os resultados referentes à reabsorção dos biomateriais e à formação óssea no presente estudo. Uma degradação parcial mais pronunciada das partículas de Biosilicato<sup>®</sup> na faixa granulométrica 180-210 $\mu\text{m}$  foi acompanhada por um volume ósseo significativamente maior neste grupo experimental. Este achado evidencia que o nível de reatividade diretamente influencia as respostas do

tecido ósseo aos materiais bioativos, com as maiores taxas de dissolução levando a um efeito ainda mais notável na formação óssea (Ducheyne and Qiu, 1999).

Com relação aos diferentes materiais bioativos, os achados do presente estudo concordam com resultados prévios de um estudo *in vitro* (Moura et al., 2007). Esta investigação anterior demonstrou que, apesar de discos de Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass<sup>®</sup> 45S5 terem sido ambos favoráveis à osteogênese, maiores áreas de matriz calcificada foram detectadas na vitrocerâmica totalmente cristalina. No entanto, no presente estudo a vantagem do Biosilicato<sup>®</sup> sobre o Bioglass<sup>®</sup> 45S5 foi apenas revelada quando comparadas as menores granulometrias destes biomateriais, o que pode ser decorrente de um efeito retardado considerando as partículas de maiores diâmetros.

Assim como neste estudo, um favorecimento da formação óssea em partículas de menores diâmetro foi também verificado em trabalhos envolvendo outros biomateriais (Malard et al., 1999; Vollenweider et al., 2007). Todavia, ainda existe especulação com relação à melhor faixa granulométrica para a osteogênese. Segundo alguns autores, a granulometria 300-355 $\mu$ m parece ser mais eficaz para a regeneração óssea por permitir um espaço ótimo entre as partículas para o crescimento tecidual (Schepers et al., 1993; Schepers et al., 1997).

Entretanto, é importante ressaltar que a reatividade de um material bioativo também pode desempenhar uma influência tempo-dependente na adesão, proliferação e diferenciação das células ósseas (Ducheyne and Qiu, 1999), uma vez que os produtos da dissolução iônica podem ser responsáveis por um controle genético sobre suas atividades (Hench et al, 2000; Xynos et al., 2000b; Xynos et al., 2001). Sendo assim, o tamanho das partículas, a composição química e a cristalinidade, por afetarem a cinética das reações

podem influenciar o recrutamento celular para a aposição de tecido ósseo (Malard et al., 1999). No presente estudo, o número de osteoblastos por área de tecido foi significativamente maior no grupo Biosilicato<sup>®</sup> 180-210  $\mu\text{m}$  do que nos grupos que consistiam de partículas maiores do mesmo material ou de partículas de Bioglass<sup>®</sup> 45S5 na mesma faixa granulométrica.

Por outro lado, o número de osteoclastos, bem como a superfície osteoclástica, não diferiu entre os grupos envolvendo biomateriais. Esperava-se que o expressivo número de osteoblastos, as células formadoras de osso, fosse acompanhado por um aumento também na quantidade das células com atividade reabsortiva. Sabe-se que existe um complexo de sinalização entre estas células, por meio da regulação de moléculas na superfície celular e da secreção de citocinas, que permite suas atividades serem mutualmente influenciadas (Martin and Udagawa, 1998; Boyce and Xing, 2006). Este efeito pode não ter sido observado no presente estudo porque os íons liberados pelos materiais bioativos imersos em fluídos fisiológicos são responsáveis por um aumento da alcalinidade da solução (Hench, 2003), que favorece a mineralização da matriz óssea pelos osteoblastos (Hench, 2003; Arnett, 2008). A acidificação é um requerimento chave para os osteoclastos escavarem as lacunas de reabsorção, com o  $\text{H}^+$  extracelular possuindo um importante papel como um fator de ativação osteoclástica (Arnett, 2008). Ainda mais, um experimento *in vitro* demonstrou que os osteoclastos são muito sensíveis a pequenas alterações na faixa de pH considerado ótimo para sua atividade (Arnett and Spowage, 1996). Portanto, supõe-se que as taxas de reações de nenhuma das granulometrias dos biomateriais avaliados no presente estudo criaram microambientes favoráveis para a máxima atividade reabsortiva dos osteoclastos.

No entanto, a bioreabsorção dos materiais deve ser considerada sob dois pontos de vista: mediada por processos celulares ou pela dissolução do material em fluido fisiológico (Oonishi et al., 1999). Provavelmente, os processos de dissolução pela lixiviação iônica contribuíram mais que a atividade fagocitária para a reabsorção parcial das partículas no presente estudo.

Além disso, os produtos iônicos desta dissolução podem ser a causa para a mais persistente fibrose na medula óssea nos grupos com biomateriais, tendo em vista que o insulto químico pode se constituir em um fator adicional à lesão tecidual para uma ativação persistente de mecanismos de reparo (Wynn, 2008), que provavelmente ocorre por meio da liberação de fatores de crescimento e citocinas (Kuter et al., 2007; Wynn, 2008). Porém, a inexistência de diferenças significativas entre defeitos ósseos controle e os preenchidos com Biosilicato<sup>®</sup> na granulometria 300-355 $\mu$ m sugere um possível decréscimo na atividade reacional destes grupos no dia 20, com diminuição da taxa de reabsorção do biomaterial/aposição óssea no segundo caso.

Estudos adicionais de longos prazos ainda são necessários para avaliar se os efeitos tardios espelham a influência positiva do Biosilicato<sup>®</sup> na formação óssea. Porém, sugere-se que o manejo da granulometria pode ser uma estratégia para se atingir condições ótimas para diferentes propósitos na prática clínica. As partículas menores de Biosilicato<sup>®</sup> demonstraram reabsorção parcial, que foi acompanhada por uma maior atividade osteogênica. Embora também eficientes para a formação óssea, partículas maiores exibiram um comportamento mais estável das respostas induzidas.

## **ESTUDO 3**

**“Análise preliminar qualitativa da  
interação celular *in vitro* com matrizes porosas  
de novos materiais bioativos”**



## INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos, permeada pelos princípios de interdisciplinaridade, tem gerado perspectivas promissoras perante a necessidade crescente de métodos eficazes para a reconstrução de partes lesadas no tecido ósseo (Drosse et al., 2008).

Pesquisas nesta área têm enfatizado a enorme aplicabilidade dos vidros e vitrocerâmicas bioativas em dispositivos médicos e odontológicos (Lee et al., 2006; Stevens et al., 2008), devido à capacidade destes materiais de se ligarem ao tecido ósseo por meio de reações químicas que levam à formação de uma camada interfacial que é química e estruturalmente equivalente à fase mineral do osso (Hench, 2003).

No entanto, investigações recentes demonstraram que o estágio crítico para a regeneração óssea é relacionado com a interação das células e a superfície dos biomateriais (Xynos et al., 2001; Hench e Polak, 2002; Hench, 2003), uma vez que a absorção de proteínas é um evento precoce na interação entre o biomaterial implantado e os tecidos vivos (Gao et al., 2001). Acredita-se que as respostas celulares constituem-se em um requisito fundamental para o comportamento bioativo dos materiais (Gao et al., 2001). Neste contexto, implantes ideais devem facilitar a adesão de células na sua superfície, para que as mesmas sejam viáveis em eventos subseqüentes como a proliferação, migração, diferenciação, maturação e mineralização do substrato.

É importante ressaltar que tanto as células cuja função é a formação do osso, como as que o reabsorvem, possuem um papel ativo na engenharia dos tecidos (Nakagawa et al., 2004, Domaschke et al., 2006). O dinamismo do remodelamento ósseo deve ser assegurado por meio da ação coordenada entre estas células, tendo em vista que este processo é fundamental para a integridade mecânica do esqueleto (Nakagawa et al., 2004, Domaschke

et al., 2006). Muitos estudos têm focalizado a formação óssea em vários substratos, a partir de osteoblastos maduros ou de seus precursores derivados da medula óssea (Nagakawa et al. 2004). Recentemente, um grande potencial osteogênico também têm sido verificado em células oriundas do ligamento periodontal crescendo diversas matrizes (Trubiani et al., 2007). No entanto, poucos estudos investigam a atividade reabsortiva dos osteoclastos em biomateriais implantados.

As células que formam e as que degradam o osso mutuamente controlam suas atividades (Boyce e Xing, 2006), que também podem sofrer influências da reatividade do biomaterial no qual estão inseridas (Duchene e Qiu, 1999). A cinética das reações sequenciais que ocorrem nos materiais bioativos submersos em meios fisiológicos provocam alterações na sua superfície e no microambiente (Hench, 2003), ambos fatores conhecidos pela influência na adesão e a função celular. Sendo assim, os fatores que influenciam a reatividade dos materiais bioativos devem ser investigados em busca de melhores condições para o sucesso nas respostas desejadas.

Com isso, uma análise preliminar no presente estudo visa qualitativamente verificar os efeitos de três diferentes composições químicas de novos materiais bioativos em monoculturas e co-culturas celulares.

## **METODOLOGIA**

### **Preparação das amostras**

Três diferentes tipos de matrizes porosas foram comparados neste estudo. As matrizes possuem características estruturais semelhantes (diâmetro = 8mm, espessura = 1,5 mm, porosidade total ~ 67 %, tamanho médio de poros ~ 80  $\mu$ m), mas diferem quanto à

composição química. A primeira delas teve como base uma vitrocerâmica totalmente cristalina do sistema  $\text{Na}_2\text{O}.\text{CaO}.\text{SiO}_2.\text{P}_2\text{O}_5$  (Biosilicato<sup>®</sup>), cuja composição e o protocolo de tratamentos térmicos constam-se descritos na patente WO 2004/074199. A partir desta composição base, foi realizada a substituição parcial ou total de  $\text{Na}_2\text{O}$  por  $\text{K}_2\text{O}$ , para obtenção das composições denominadas C050 e C000, pertencentes aos sistemas  $\text{K}_2\text{O}.\text{Na}_2\text{O}.\text{CaO}.\text{SiO}_2.\text{P}_2\text{O}_5$  e  $\text{K}_2\text{O}.\text{CaO}.\text{SiO}_2.\text{P}_2\text{O}_5$ , respectivamente. As porcentagens de  $\text{CaO}$ ,  $\text{SiO}_2$  e  $\text{P}_2\text{O}_5$  foram mantidas constantes em todas as composições, com a diferença residindo apenas nas concentrações de  $\text{Na}_2\text{O}$  e  $\text{K}_2\text{O}$ .

Para obtenção das composições, matérias-primas de elevada pureza foram misturadas nas devidas proporções em cadinhos de platina e aquecidas em forno elétrico de fusão por 3 horas com temperatura entre 1250 e 1380°C. Em seguida, um rápido resfriamento do material foi realizado vertendo-se o líquido em moldes cilíndricos de aço inox. Os cilindros vítreos obtidos foram quebrados e extensivamente moídos para serem utilizados na confecção das matrizes.

As matrizes porosas foram preparadas pelo método da adição de agentes porogênicos, incorporando naftaleno a barbotinas contendo a vitrocerâmica de interesse.

As barbotinas cerâmicas foram compostas inicialmente por Biosilicato<sup>®</sup>, C000 ou C050 particulado (6.0 % vol.), ligante PVB (3.0 % vol.) e álcool isopropílico (67.0 % vol.). Naftaleno (300.0 to 600.0µm) foi então introduzido na barbotina (24% vol.) e misturado por 2 minutos. Após isso, as barbotinas foram secas e granuladas em peneira de nylon com abertura de 1 mm. Posteriormente, as amostras foram conformadas em pastilhas por meio de prensagem uniaxial a 30.0 MPa, seguida de prensagem isostática a 100.0 MPa para compactação máxima. Finalmente, ciclos de tratamentos térmicos foram realizados para remover o naftaleno e promover a sinterização das amostras.

As matrizes obtidas foram estocadas em dessecador e esterilizadas em calor seco a 180°C por 2 h.

## **Isolamento e cultura de células**

### **Células do ligamento periodontal (CLPD)**

Células do ligamento periodontal humano foram isoladas a partir de terceiros molares extraídos de pacientes adultos com periodonto clinicamente saudável. Termos de consentimento formais foram obtidos de cada indivíduo. Fragmentos do ligamento periodontal do terço médio da raiz foram lavados duas vezes e dispostos em placas de poliestireno de 6 poços, que foram cultivadas em seguida em Meio Essencial Mínimo modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco BRL, Paisley, Scotland) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS, HyClone, Logan, UT) e 1% de solução antibiótica/ antimicótica (100 U/ml penicilina, 100 mg/ml estreptomicina e 250 ng/ml anfotericina B; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A progressão das culturas foi monitorada, com o meio trocado a cada 2-3 dias, até atingirem a confluência. As culturas foram expandidas, com todos os experimentos sendo realizados entre a quinta e a oitava passagens. Para serem plaqueadas sobre as matrizes porosas, as células foram previamente lavadas em salina tamponada com fosfato (PBS), tratadas com solução de tripsina a 0,1% (Difco Laboratories, Detroit, MI), suspensas em meio de cultura, centrifugadas por 10 minutos, resuspensas e quantificadas com hemocitômetro.

### **Células mononucleares do sangue periférico (CMSP)**

Células mononucleares do sangue periférico foram isoladas do sangue venoso de doadores saudáveis (Sanquin, Amsterdam, Holanda). Inicialmente, o sangue foi diluído em partes iguais (1:1) com 1% PBS-citrato. Vinte e cinco milímetros do sangue diluído foram cuidadosamente colocados sobre 15 ml de lymphoprep, procedimento que foi seguido por 30 minutos de centrifugação, sem intervalo, a 2300 rpm em temperatura ambiente. A interface contendo CMSPs foi cuidadosamente removida, diluída em 1% PBS-citrato até 50 ml e centrifugada por 10 min a 2000 rpm em temperatura ambiente. Após descarte do supernatante, o pellet celular foi suspenso em 5 ml de PBS-citrato/1%FCS e diluído em 1% PBS-citrato até 50 ml. Seguiram-se 5 repetições deste procedimento de lavagem, entremeadas por 4 minutos de centrifugação a 1500 rpm a 4°C. Finalmente, as células isoladas foram resuspensas em meio de cultura. A suspensão celular foi diluída em partes iguais com o meio de congelamento (60% DMEM + 20% FCS + 20% DMSO) e divididas em alíquotas para estoque a -80°C até o uso. Antes dos experimentos, células foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37°C, suspensas em meio de cultura (DMEM + FCS + 1% antibióticos), centrifugadas durante 10 minutos, resuspensas no meio e quantificadas com hemocitômetro.

### **Plaqueamento celular**

Antes do plaqueamento, as matrizes porosas foram dispostas em placas de poliestireno de 24 poços e pré-incubadas em meio de cultura a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Este pré-tratamento teve duração de 1 ou 10 dias, constituindo dois grupos experimentais (PT1 e PT10). Após estes períodos, o meio de cultura foi removido e as matrizes plaqueadas com CLPD, na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL de meio de

cultura, ou com CMSP, na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Nenhum suplemento osteogênico/ osteoclastogênico foi adicionado ao meio de cultura. A cada 2-3 dias o meio de cultura era trocado (0,5 mL/poço). As células plaqueadas foram cultivadas por períodos de até 14 dias.

### **Células em cocultura**

Para os experimentos em co-cultura de CLPD e CMSP, as matrizes porosas foram pré-incubadas durante 10 dias a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> em meio de cultura trocado a cada 2-3 dias. Após este período, as CLPD foram primeiramente plaqueadas nas matrizes, na concentração  $2 \times 10^5$  células/mL de meio de cultura. Após 24 horas em condições padronizadas de cultura, as matrizes contendo CLPD foram também plaqueadas com CMSPs na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Nenhum suplemento foi adicionado ao meio de cultura, que foi trocado a cada 2-3 dias (0,5 mL/poço). A co-cultura celular foi mantida por períodos de até 14 dias após o plaqueamento de CMSPs.

### **Microscopia confocal**

Após 1, 7 e 14 dias do início das mono e co-culturas celulares, as matrizes porosas foram analisadas em microscópio confocal de fluorescência por varredura laser (Leica TCSSP2) quanto à morfologia, espreadimento e número de células aderidas.

Previamente, as matrizes foram extensivamente lavadas (3 ciclos) em PBS para a remoção de células não-aderidas. Seguiu-se a fixação das células com paraformaldeído (PFA) a 4% em PBS, por 10 minutos em temperatura ambiente. Os filamentos de actina do citoesqueleto celular foram marcados com faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:40, 1 hora em temperatura ambiente; Molecular Probes, Eugene,

OR, EUA). O DNA nuclear foi marcado com iodeto de propídio (fluorescência vermelha, 1:1000, 10 minutos em temperatura ambiente; Sigma, St.Louis, MO). Antes e após cada incubação, as amostras foram lavadas em PBS.

No microscópio confocal, seções de 100 $\mu$ m de espessura foram escaneadas em 5 campos randomicamente selecionados em cada amostra (magnificação: 20x, zoom: 2x). Amostras triplicadas foram utilizadas.

## **RESULTADOS**

### **Células do ligamento periodontal (CLPD) em monocultura nas matrizes**

As células aderidas nas matrizes de Biosilicato<sup>®</sup>, C000 e C050 que foram pré-tratadas por 1 dia em meio de cultura (PT1) apresentavam contorno ovóide ou esférico e não estavam espalhadas. Com o passar do tempo, houve uma diminuição expressiva do número de CLPDs aderidas, sem diferenças aparentes entre as matrizes. (observar Fig.1)

Já com o pré-tratamento de 10 dias (PT10), as células encontravam-se espalhadas em todas as matrizes. Morfologicamente, apresentaram aspecto fusiforme ou estrelado. Além disso, as células aumentaram-se em número após 7 e 14 dias de cultura e passaram a exibir longos prolongamentos citoplasmáticos. A comparação entre os tipos de matrizes revelou uma aparente desvantagem das matrizes de C000. (observar Fig.2)

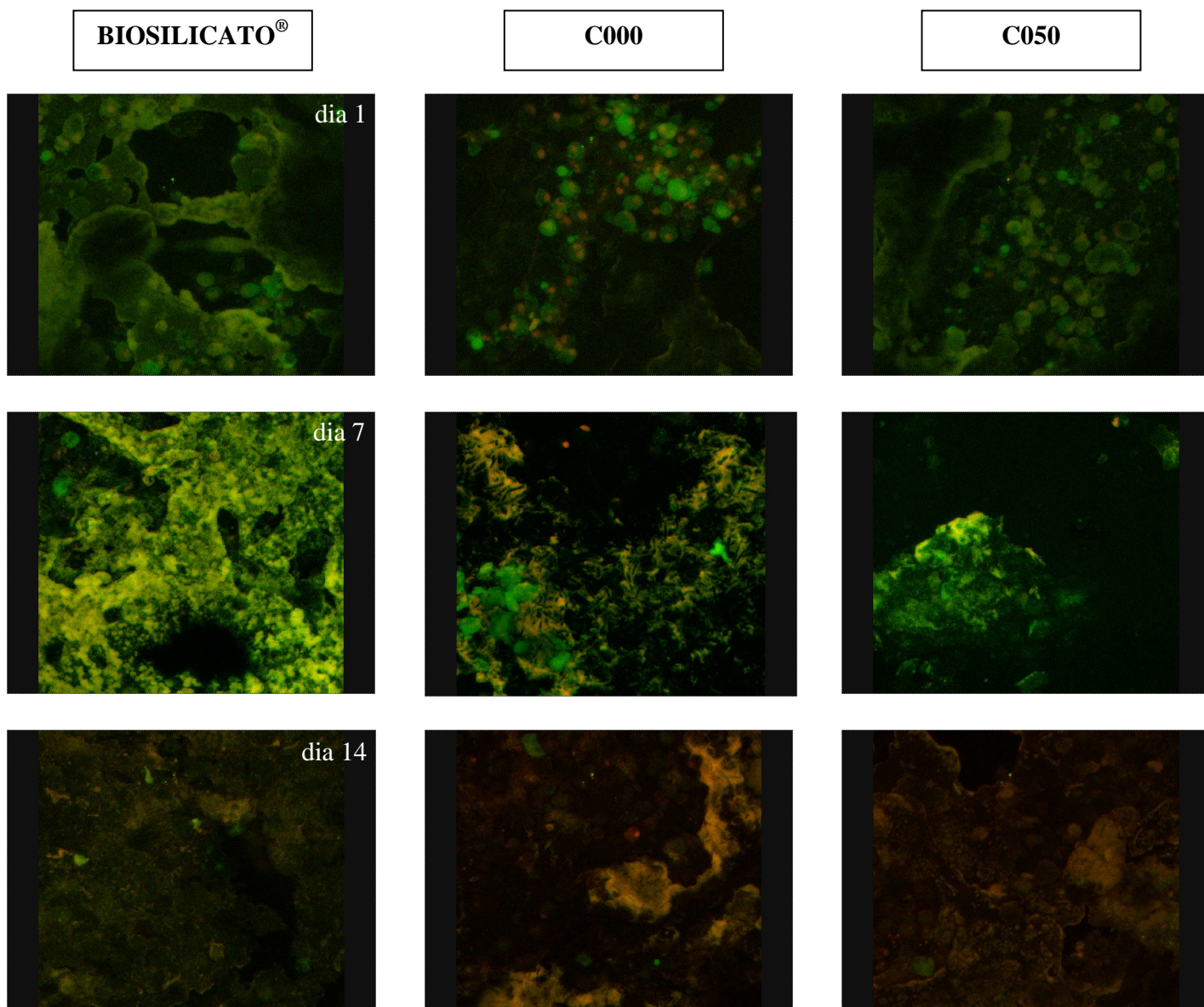


Fig.1 – Imagens por microscopia confocal de células do ligamento periodontal (CLPD) aderidas nas matrizes de Biosilicato<sup>®</sup>, C000 e C050 que foram pré-tratadas por 1 dia em meio de cultura (PT1). Fluorescência verde (faloidina + Alexa Fluor 488) revela o citoesqueleto de actina, enquanto que a vermelha (marcação de DNA por iodeto de propídio) indica núcleo celular. Magnificação: 20x, zoom: 2x.



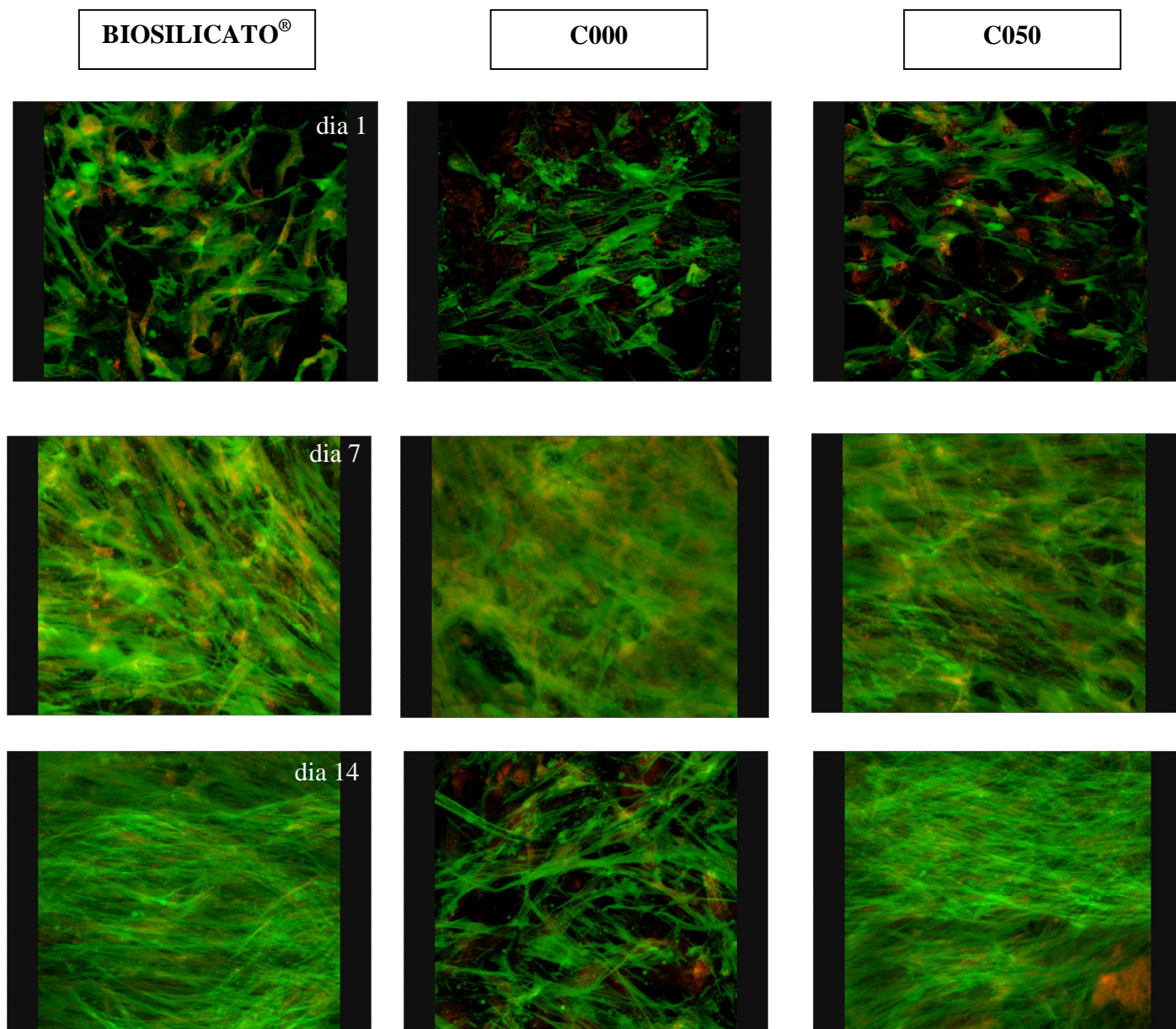


Fig.2 – Imagens por microscopia confocal de células do ligamento periodontal (CLPD) aderidas nas matrizes de Biosilicato®, C000 e C050 que foram pré-tratadas por 10 dias em meio de cultura (PT10). Fluorescência verde (faloidina + Alexa Fluor 488) revela o citoesqueleto de actina, enquanto que a vermelha (marcação de DNA por iodeto de propídio) indica núcleo celular. Magnificação: 20x, zoom: 2x.

### **Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) em monocultura nas matrizes**

Todas as matrizes estavam totalmente recobertas por CMSPs no dia seguinte ao plaqueamento das mesmas. As células se apresentavam com sua morfologia característica, sendo esféricas, pequenas e mononucleares.

No entanto, o grande número de CMSPs aderidas inicialmente nas matrizes que tinham sido pré-tratadas por 1 dia diminuiu significativamente com a progressão do tempo de cultura, com a extinção quase total da quantidade de células no dia 14. Nenhuma das composições químicas parece ter sido favorável à cultura de CMSPs nestas condições. (observar Fig.3)

Porém, no caso das matrizes previamente tratadas durante 10 dias, parte das células aumentam-se de tamanho, no sétimo dia de cultura, e passaram a exibir alguns prolongamentos citoplasmáticos. Houve evidente fusão de algumas delas, originando células com mais de um núcleo, efeito ainda mais evidente no dia 14. Muitas células mantiveram-se no seu formato original, com maior proporção delas nas matrizes de C000. (observar Fig.4)

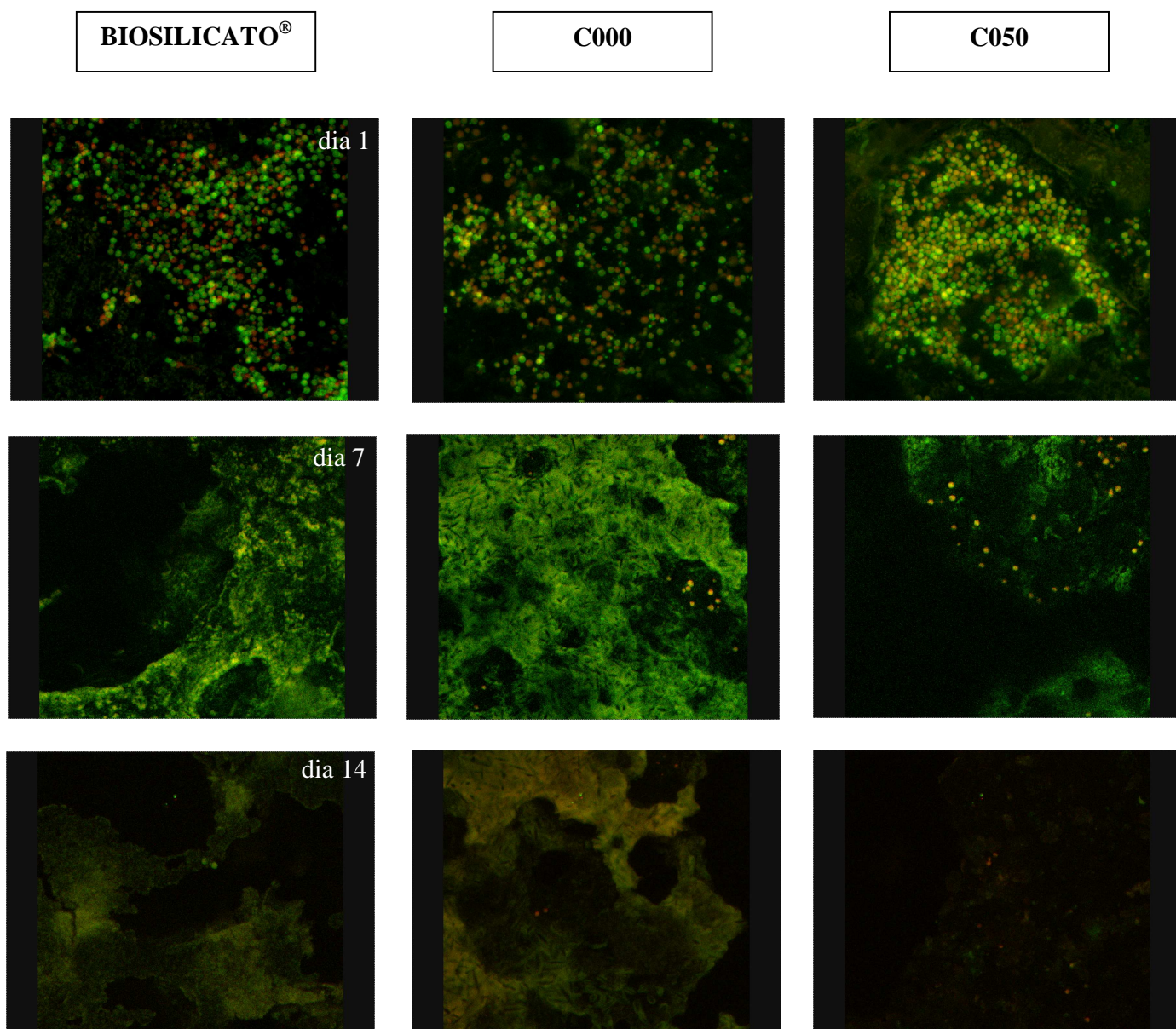


Fig.3 – Imagens por microscopia confocal de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) aderidas nas matrizes de Biosilicato®, C000 e C050 que foram pré-tratadas por 1 dia em meio de cultura (PT1). Fluorescência verde (faloidina + Alexa Fluor 488) revela o citoesqueleto de actina, enquanto que a vermelha (marcação de DNA por iodeto de propídio) indica núcleo celular. Magnificação: 20x, zoom: 2x.



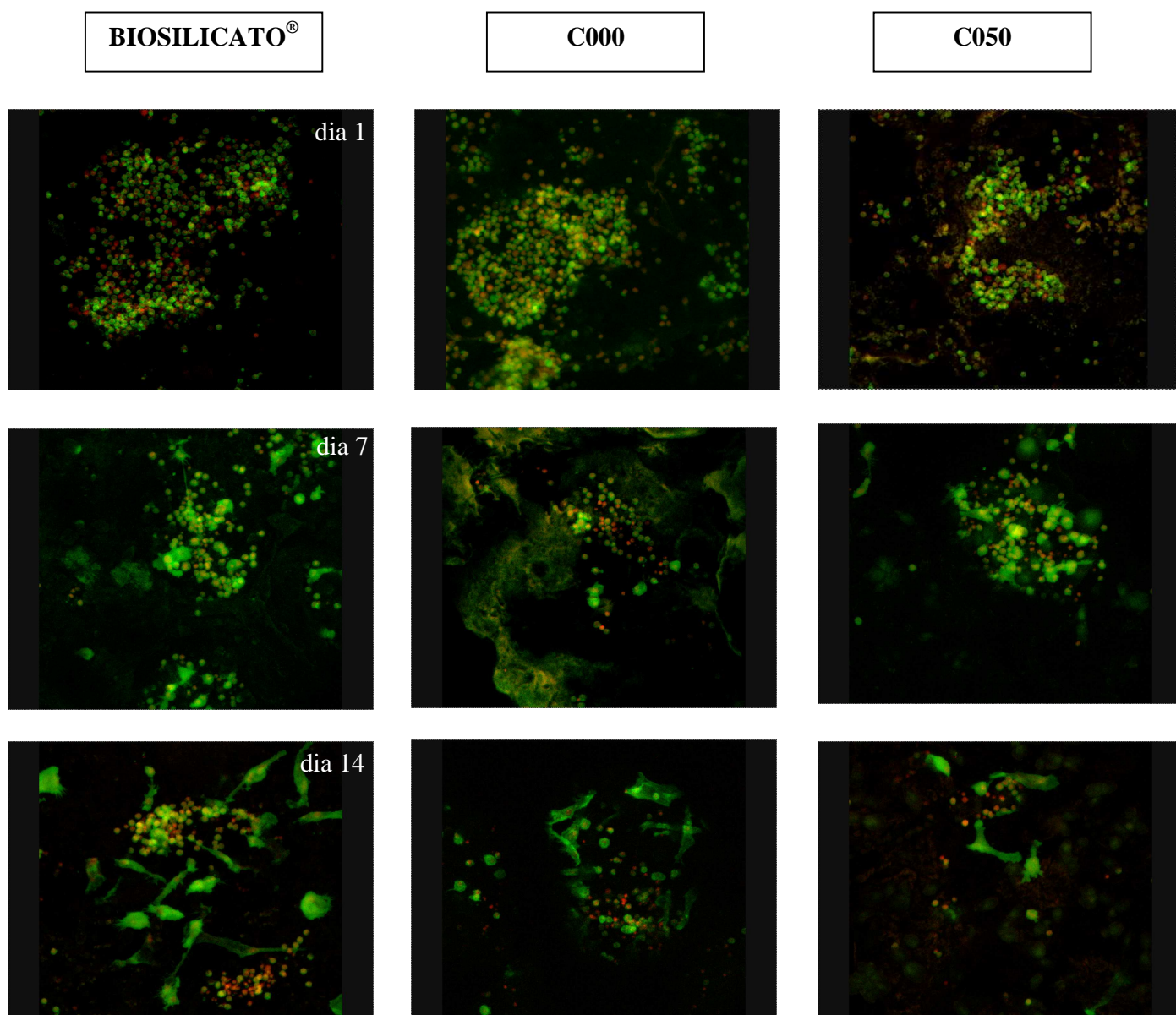


Fig.4 – Imagens por microscopia confocal de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) aderidas nas matrizes de Biosilicato®, C000 e C050 que foram pré-tratadas por 10 dias em meio de cultura (PT10). Fluorescência verde (faloidina + Alexa Fluor 488) revela o citoesqueleto de actina, enquanto que a vermelha (marcação de DNA por iodeto de propídio) indica núcleo celular. Magnificação: 20x, zoom: 2x.

### **Coculturas celulares (CLPD e CMSP) nas matrizes**

Como as matrizes que foram pré-incubadas durante 10 dias em meio de cultura anteriormente ao plaqueamento celular demonstram efeitos benéficos para CLPDs e CMSPs cultivadas isoladamente, este tipo de pré-tratamento foi escolhido para a cultura destas células de forma conjunta.

CLPDs, em cocultura com CMSPs nas matrizes, exibiram espriamento e notável proliferação durante o período avaliado. Assim como em condições de monocultura, uma aparente desvantagem foi verificada nas matrizes de C000 com relação às de Biosilicato<sup>®</sup> e C050. (observar Fig.5)

Com relação a CMSPs, a cocultura foi notadamente mais benéfica que a monocultura, tendo em vista que uma maior porcentagem de células demonstrou características semelhantes à células em processo de diferenciação, com aumento de tamanho e presença de mais de um núcleo. (observar Fig.5)

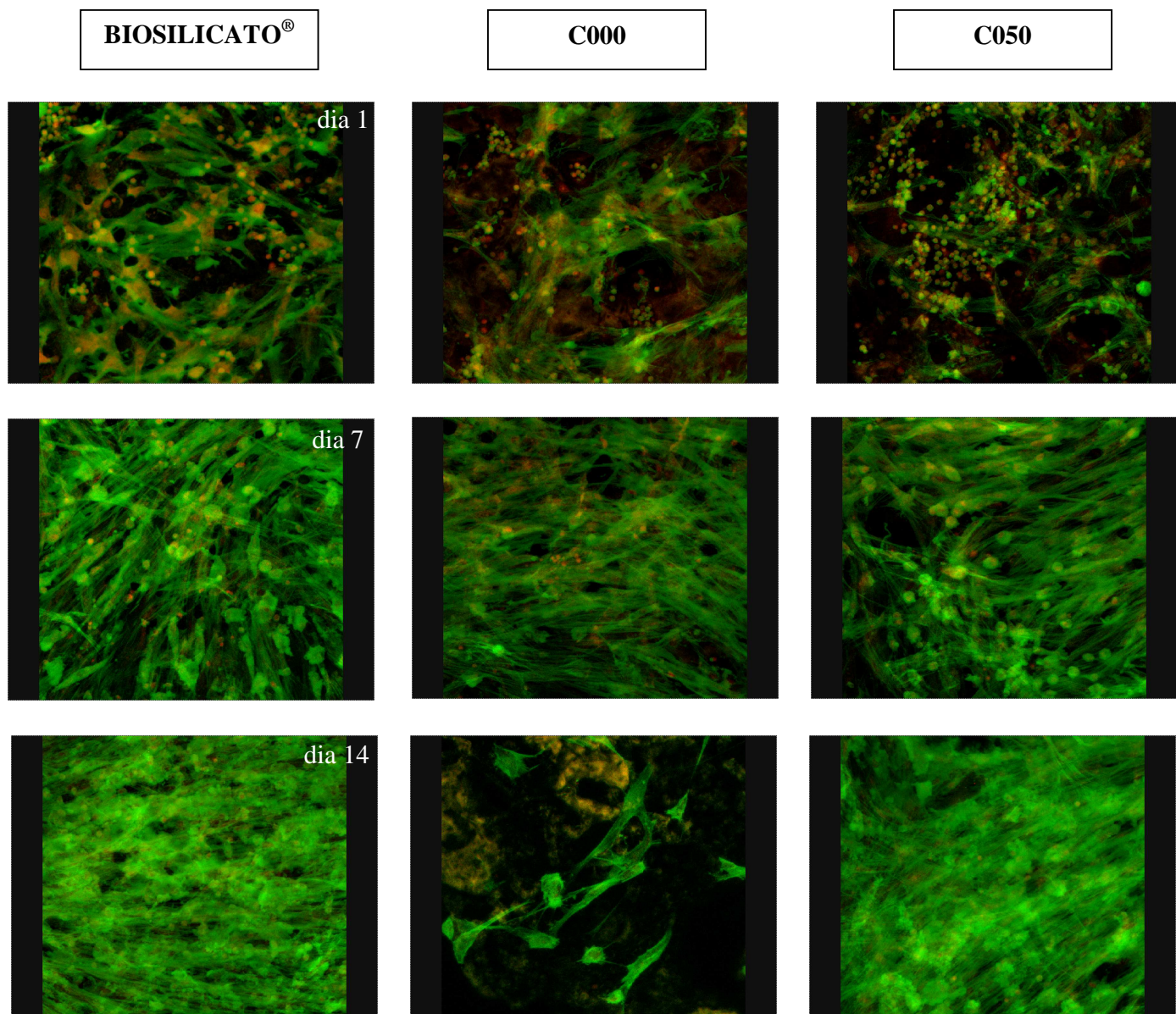


Fig.5 – Imagens por microscopia confocal de coculturas celulares (CLPD e CMSP) em matrizes de Biosilicato<sup>®</sup>, C000 e C050 que foram pré-tratadas por 10 dias em meio de cultura (PT10). Fluorescência verde (faloidina + Alexa Fluor 488) revela o citoesqueleto de actina, enquanto que a vermelha (marcação de DNA por iodeto de propídio) indica núcleo celular. Magnificação: 20x, zoom: 2x.

## DISCUSSÃO

O sucesso de um suporte a ser utilizado em engenharia de tecidos depende, em parte, da adesão e do crescimento das células de interesse na sua superfície. As respostas celulares irão determinar o papel dos biomateriais nas reações teciduais e, portanto, são fundamentais para o potencial regenerativo dos mesmos (Gao et al., 2001).

Sabe-se que materiais bioativos em contato com fluídos corpóreos sofrem um processo de lixiviação de íons na sua superfície, o que causa um aumento do pH da solução em contato com o material e favorece a mineralização do substrato. Diversas pesquisas demonstraram que os produtos da dissolução iônica dos materiais bioativos são responsáveis pela ativação de pelo menos sete famílias de genes que codificam proteínas associadas com a proliferação e diferenciação osteoblástica (Hench et al, 2000; Xynos et al., 2000; Xynos et al., 2001). No entanto, quando em elevadas concentrações, estes produtos podem causar a morte celular programada (Gough et al., 2004), o que pode explicar o insucesso das matrizes pré-tratadas por apenas 1 dia em meio de cultura no presente estudo, independentemente da composição química das matrizes.

No estudo de Moura-Neto et al. (2007), células osteogênicas isoladas de calvárias de ratos exibiram desorganização do citoesqueleto de actina, com redução de feixes citoplasmáticos e da fibrilogênese da fibronectina após 24 h do plaqueamento em discos de Biosilicato<sup>®</sup>, Biosilicato<sup>®</sup> vítreo e Bioglass<sup>®</sup> 45S5. O rearranjo dos filamentos de actina somente ocorreu em torno do quinto dia da cultura em áreas de multicamadas celulares, enquanto que as células aderidas diretamente ao substrato ainda apresentavam desarranjo do citoesqueleto. A viabilidade celular foi estatisticamente semelhante para as superfícies bioativas em todos os tempos experimentais. As figuras mitóticas aumentaram-se do

primeiro ao quinto dia, porém corpos apoptóticos eram frequentemente observados durante a fase de mineralização das culturas sobre todas as superfícies.

No presente estudo, as matrizes pré-tratadas por 10 dias demonstraram ser favoráveis para a cultura das células. As células do ligamento periodontal encontravam-se com sua morfologia característica e, mesmo que propositalmente não tenham sido adicionados suplementos osteogênicos no meio de cultura, houve uma evidente proliferação das mesmas (não quantificada). Um potencial promissor para o uso destas células na engenharia de tecidos tem sido indicado pelas suas propriedades osteoblasto-símile quando diferenciadas, incluindo a capacidade de formação de nódulos mineralizados (Trubiani et al., 2007).

No caso das células mononucleares do sangue periférico, a análise subjetiva preliminar revelou aparente fusão de algumas delas, com os indícios de diferenciação em pré-osteoclastos muito mais evidentes nas condições de cocultura com as células do ligamento periodontal. A osteoclastogênese requer contato dos precursores osteoclásticos com o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) e com o ligante do receptor ativador do fator NF-KappaB (RANKL), que são expressos em osteoblastos ou em células estromais (Nakagawa et al., 2004). Como o meio de cultura não foi suplementado com estes fatores, a situação de cocultura celular evidenciou a importância da interação entre os dois tipos celulares para a funcionalidade de complexos delineados para a regeneração óssea.

No entanto, tanto nas condições de cultura isolada como nas de cocultura, as matrizes de C000 aparentaram desvantagem quanto ao número de células aderidas. No estudo de Ramaswamy et al. (2005) variações na composição química e na solubilidade de materiais resultaram em diferenças na morfologia e na profundidade das lacunas de reabsorção originadas por osteoclastos, o que pode interferir na maneira com que osteoblastos



interagem com a matriz e na subsequente formação óssea. Dados relacionados à liberação iônica e ao pH demonstraram uma forte correlação entre solubilidade e biocompatibilidade no estudo de Bandyopadhyay-Ghosh et al. (2007).

Desta forma, verifica-se a existência um controle dose-dependente dos produtos da dissolução iônica de materiais bioativos nas respostas das células ósseas. A cinética de dissolução do material e precipitação de íons na sua superfície é fortemente dependente da relação área superficial do material / volume do líquido ( $R_{AS/VS}$ ); da composição química e do líquido em contato com o material; e da temperatura e pH do líquido (Sepulveda et al., 2001). Além disso, para vitrocerâmicas, a cinética de formação da camada de HCA depende das fases cristalinas presentes no material e da porcentagem de cristalinidade (Hench et al., 1999).

O emprego do meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino parece ter sido eficiente para um pré-tratamento das matrizes no presente estudo. Este meio foi utilizado para o mesmo propósito em outros estudos (Clupper et al., 2003; Nagakawa et al., 2004) e, apesar da diminuição da cinética de formação da camada de hidroxiapatita em comparação com SBF (Clupper et al., 2003), a camada apatítica formada tende a preservar seus elementos característicos essenciais (Faure et al., 2008).

No entanto, esse efeito deve ser averiguado no presente estudo por meio da caracterização da superfície das diferentes matrizes, utilizando microscopia de luz convencional, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

Além disso, as análises descritivas do presente estudo devem ser complementadas com dados quantitativos consistentes que serão obtidos por meio da análise do DNA e do RNA isolados das células previamente aderidas nas matrizes, possibilitando a quantificação

das células e da expressão de genes relativos à diferenciação osteoblástica e osteoclástica. A viabilidade celular também deverá ser verificada por meio de análises no meio de cultura armazenado.

De maneira preliminar, os achados do presente estudo sugerem que, quando em condições adequadas, as matrizes avaliadas podem produzir respostas celulares favoráveis ao seu emprego na engenharia do tecido ósseo. Ainda que diferentes respostas tenham sido relacionadas à composição química das matrizes, o sucesso das mesmas relacionou-se principalmente ao tempo no qual foram incubadas em meio de cultura previamente ao plaqueamento celular. Por isso, outras condições de pré-tratamento devem ser avaliadas em estudos posteriores visando possíveis efeitos benéficos adicionais.

O presente estudo pode auxiliar no fornecimento de diretrizes para que as novas composições químicas possam ser estabelecidas para o desenvolvimento de matrizes porosas, bem como das condições propícias para o emprego das mesmas na engenharia do tecido ósseo.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os estudos revelam que o Biosilicato<sup>®</sup> possui boas propriedades para a formação do tecido ósseo *in vivo*. Esta nova vitrocerâmica bioativa totalmente cristalina favoreceu um elevado número de osteoblastos e a formação óssea em um sítio de defeito, bem como a melhoria das propriedades mecânicas do osso.

Partículas menores de Biosilicato<sup>®</sup> demonstraram reabsorção parcial, que foi acompanhada por uma maior atividade osteogênica. Embora também eficientes para a formação óssea, partículas maiores exibiram um comportamento mais estável das respostas induzidas.

Embora investigações adicionais e ensaios clínicos sejam necessários, diversas situações clínicas envolvendo a perda de tecido ósseo podem ser beneficiadas pelas propriedades osteogênicas do Biosilicato<sup>®</sup> particulado, inclusive com a possibilidade de selecionar a faixa granulométrica para se atingir condições ótimas para cada caso específico.

Além disso, os achados apontam para a aplicação promissora do Biosilicato<sup>®</sup> na engenharia do tecido ósseo. Matrizes porosas avaliadas preliminarmente demonstraram que respostas celulares muito favoráveis podem ser obtidas, desde que exista uma cautela quanto a excessividade dos produtos da dissolução iônica dos materiais.

Os estudos desta tese apontam para algumas diretrizes quanto à reatividade do Biosilicato<sup>®</sup> e, com isso, novos estudos *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para o desenvolvimento de estratégias eficientes que viabilizem o emprego terapêutico desta vitrocerâmica altamente bioativa. Como exemplo, a promoção de estímulos adicionais para a angiogênese, de maneira a assegurar sua ocorrência concomitante com a osteogênese, pode ter um papel decisivo no sucesso dos complexos bioativos delineados para a regeneração guiada do tecido ósseo.

**REFERÊNCIAS**  
**BIBLIOGRÁFICAS**

Arnett TR, Spowage M. Modulation of the resorptive activity of rat osteoclasts by small changes in extracellular pH near the physiological range. *Bone* 1996; 18(3): 277-9.

Arnett TR. Extracellular pH regulates bone cell function. *J Nutr* 2008; 138(2): 415S-418S.

Beckham CA, Greenlee-Jr TK, Crebo AR. Bone Formation at a Ceramic Implant Interface. *Calc Tiss Res* 1971; 8:165-71.

Bandyopadhyay-Ghosh S, Reaney IM, Brook IM, Hurrell-Gillingham K, Johnson A, Hatton PV. In vitro biocompatibility of fluorcanasite glass-ceramics for bone tissue repair. *J Biomed Mater Res A* 2007; 80(1): 175-83.

Bauman RD, Lewallen DG, Hanssen AD. Limitations of structural allograft in revision total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 2009; 467 (3): 818-24.

Boyce BF, Xing L. Osteoclasts, no longer osteoblast slaves. *Nat Med* 2006; 12(12): 1356-8.

Clupper DC, Gough JE, Hall MM, Clare AG, LaCourse WC, Hench LL. In vitro bioactivity of S520 glass fibers and initial assessment of osteoblast attachment. *J Biomed Mater Res A* 2003; 67(1): 285-94.

Cruz ACC, Pochapski MT, Daher JB, Silva JCZ, Pilatti GL, Santos FA. Physico-chemical characterization and biocompatibility evaluation of hydroxyapatites. *J Oral Sci* 2006; 48(4): 219-26.

Davies JE, Baldan N. Scanning electron microscopy of the bone-bioactive implant interface. *J Biomed Mater Res* 1997; 15, 36(4): 429-40.

Dieudonne SC, van den Dolder J, de Ruijter JE, Paldan H, Peltola T, van 't Hof MA, Happonen RP, Jansen JA. Osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells cultured on silica gel and sol-gel-derived titania. *Biomaterials* 2002; 23: 3041-3051.

Domaschke H, Gelinsky M, Burmeister B, Fleig R, Hanke T, Reinstorf A, Pompe W, Rösen-Wolff A. In Vitro Ossification and Remodeling of Mineralized Collagen I Scaffolds. *Tissue Eng* 2006; 12(4): 949-58.

Drosse I, Volkmer E, Capanna R, De Biase P, Mutschler W, Schieker M. Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury* 2008; 39 Suppl 2:S9-20.

Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 1999; 20(23-24): 2287-303.

Faure J, Balamurugan A, Benhayoune H, Torres P, Balossier G, Ferreira JMF. Morphological and chemical characterisation of biomimetic bone like apatite formation on alkali treated Ti6Al4V titanium alloy. *Materials Science and Engineering: C* 2009; *In Press*.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Zanotto ED et al. Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments. *Int. C. C03C10/00*, 20 Feb. 2004, WO2004/074199.

Fulmer MT, Ison IC, Hankermayer CR, Constantz BR, Ross J. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. *Biomaterials* 2002; 23(3): 751-5.

Gao T, Aro HT, Ylänen H, Vuorio E. Silica-based bioactive glasses modulate expression of bone morphogenetic protein-2 mRNA in Saos-2 osteoblasts in vitro. *Biomaterials* 2001; 22: 1475-83.

Gauthier O, Müller R, von Stechow D, Lamy B, Weiss P, Bouler JM, Aguado E, Daculsi G. In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: A three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. *Biomaterials* 2005; 26: 5444–53.

Gorustovich AA, López JM, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Biological performance of boron-modified bioactive glass particles implanted in rat tibia bone marrow. *Biomed Mater* 2006; 1(3): 100-5.

Hamadouche M, Meunier A, Greenspan DC, Blanchat C, Zhong JP, La Torre GP, Sedel L. Long-term in vivo bioactivity and degradability of bulk sol-gel bioactive glasses. *J Biomed Mater Res* 2001; 15,54 (4): 560-6.

Hench LL, West JK. Biological applications of bioactive glasses. *Life Chem Reports* 1996; 13: 187-241.

Hench, LL, Xynos ID., BATTERY LD, Polak JM. Bioactive Materials to Control Cell Cycle. *Mat Res Innovat* 2000; 3: 313-23.

Hench LL, Polak JM. Third-Generation Biomedical Materials. *Science* 2002; 295: 1014-1017.

Hench LL. Glass and Genes: The 2001 W. E. S. Turner Memorial Lecture. *Glass Technology* 2003; 44(1): 1-10.

Hench L L, Splinter R J, Allen WC, Greenlee-Jr T K. Bonding mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials. *J Biomed Mater Res* 2004; 5 (6): 117-41.

Hench LL, Xynos ID, Polak JM. Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004; 15(4): 543-62.



Hench LL. Challenges for Bioceramics in the 21st Century. *American Ceramic Society Bulletin* 2005; 84(9): 18-22.

Ilharreborde B, Morel E, Fitoussi F, Presedo A, Souchet P, Penneçot GF, Mazda K. Bioactive glass as a bone substitute for spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis: a comparative study with iliac crest autograft. *J Pediatr Orthop* 2008; 28(3): 347-51.

Kobayashi M, Nakamura T, Shinzato S, Mousa WF, Nishio K, Ohsawa K, Kokubo T, Kikutani T. Effect of bioactive filler content on mechanical properties and osteoconductivity of bioactive bone cement. *J Biomed Mater Res* 1999; 15,46(4): 447-57.

Kuter DJ, Bain B, Mufti G, Bagg A, Hasserjian RP. Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *Br J Haematol* 2007; 139(3): 351-62.

Laurencin CT, Ambrosio AM, Borden MD, Cooper JA Jr. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng* 1999; 1:19-46.

Lee KY, Park M, Kim HM, Lim YJ, Chun HJ, Kim H, Moon SH. Ceramic bioactivity: progresses, challenges and perspectives. *Biomed Mater* 2006; 1(2): R31-7.

Malard O, Bouler JM, Guicheux J, Heymann D, Pilet P, Coquard C, Daculsi G. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1999; 46(1): 103-11.

Martin TJ, Udagawa N. Hormonal regulation of osteoclast function. *Trends Endocrinol Metab* 1998; 9(1): 6-12.

Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Beloti MM, Panzeri H, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate). *J Biomed Mater Res A* 2007; 82(3): 545-57.

Nakagawa K, Abukawa H, Shin My, Terai H, Troulis Mj, Vacanti Jp. Osteoclastogenesis on Tissue-Engineered Bone. *Tissue Eng* 2004; 10(1-2): 93-100.

Nandi SK, Kundu B, Datta S, De DK, Basu D. The repair of segmental bone defects with porous bioglass: An experimental study in goat. *Res Vet Sci* 2009; 86(1): 162-73.

Nishimura N, Yamamuro T, Taguchi Y, Ikenaga M, Nakamura T, Kokubo T, Yoshihara S. A new bioactive bone cement: its histological and mechanical characterization. *J Appl Biomater* 1991; 2(4): 219-29.

Olivera MI, Martínez MP, Conti MI, Bozzini C, Bozzini CE, Alippi RM. Permanent reduction of mandibular size and bone stiffness induced in post-weaning rats by cyclophosphamide. *Arch Oral Biol* 2009; 54(1): 6-11.

Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, Tsuji E, Sugihara T. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin Orthop Relat Res* 1997; 334: 316-25.

Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Kushitani S, Iwaki H. Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *J Biomed Mater Res* 1999; 44(1): 31-43.

Parfitt AM, Drezner MK., Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. *J. Bone Miner Res* 1987; 2: 595–610.

Peitl Filho O, LaTorre GP, Hench LL. Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5. *J Biomed Mater Res* 1996; 30(4): 509-14.

Ramaswamy Y, Haynes DR, Berger G, Gildenhaar R, Lucas H, Holding C, Zreiqat H. Bioceramics composition modulate resorption of human osteoclasts. *J Mater Sci Mater Med.* 2005; 16(12): 1199-205.

Reilly GC, Radin S, Chen AT, Ducheyne P. Differential alkaline phosphatase responses of rat and human bone marrow derived mesenchymal stem cells to 45S5 bioactive glass. *Biomaterials* 2007; 28(28): 4091-7.

Sepulveda P; Jones JR; Hench LL. Effect of particle size on bioglass<sup>®</sup> dissolution. *Key Engineering Materials* 2001; 192-195:629-34.

Schepers EJ, Ducheyne P, Barbier L, Schepers S. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. *Implant Dent* 1993; 2(3):151-6.

Schepers EJ, Ducheyne P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. *J Oral Rehabil* 1997; 24(3):171-81.

Stevens B, Yang Y, Mohandas A, Stucker B, Nguyen KT. A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 85(2): 573-82.

Trubiani O, Scarano A, Orsini G, Di Iorio D, D'Arcangelo C, Piccirilli M, Sigismondo M, Caputi S. The performance of human periodontal ligament mesenchymal stem cells on xenogenic biomaterials. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007; 20(1 Suppl 1):87-91.

UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION. Hench et al. Bioactive ceramics and method of preparing bioactive ceramics. *U. S. Patent Documents*, n. 5981412, 01 May 1997, 09 Nov. 1999. Int. C. C03C010/04.

Vallet-Regi M. Ceramics for medical applications. *J Chem Soc. Dalton Trans* 2001; 97-108.

Vargas GE, Mesones RV, Bretcanu O, López JM, Boccaccini AR, Gorustovich A. Biocompatibility and bone mineralization potential of 45S5 Bioglass<sup>®</sup>-derived glass-ceramic scaffolds in chick embryos. *Acta Biomater* 2009; 5(1): 374-80.

Vollenweider M, Brunner TJ, Knecht S, Grass RN, Zehnder M, Imfeld T, Stark WJ. Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. *Acta Biomater* 2007; 3(6): 936-43.

Xynos ID, Hukkanen MV, Batten JJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif Tissue Int* 2000a; 67(4): 321-9.

Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000b; 24, 276(2): 461-5.

Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench L L, Polak JM. Gene Expression Profiling of Human Osteoblasts Following Treatment with the Ionic Products of Bioglass<sup>®</sup> 4555 Dissolution. *J Biomed Mater Res* 2001; 55: 151-7.

Yang Y, Dennison D, Ong JL. Protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to hydroxyapatite of different crystallinities. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20(2): 187-92.

Yoh R, Matsumoto T, Sasaki J, Sohmura T. Biomimetic fabrication of fibrin/apatite composite material. *J Biomed Mater Res A* 2008; 87(1): 222-8.

Yoneda M, Terai H, Imai Y, Okada T, Nozaki K, Inoue H, Miyamoto S, Takaoka K. Repair of an intercalated long bone defect with a synthetic biodegradable bone-inducing implant. *Biomaterials* 2005; 26 (25): 5145-52.

Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214(2): 199-210.

Zimmermann G, Muller U, Wentzensen A. The value of laboratory and imaging studies in the evaluation of long-bone non-unions. *Injury* 2007; 38S: S33-S37.

# **ANEXO A**

**In vivo biological performance of a novel highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate<sup>®</sup>): a biomechanical and histomorphometric study in rat tibial defects.**

**ABSTRACT**

**Objective:** This study aimed to investigate the bone responses to a novel bioactive fully-crystallized glass-ceramic (Biosilicate<sup>®</sup>) of the quaternary system  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ .

**Background Data:** Although a previous study demonstrated positive effects of Biosilicate<sup>®</sup> on *in vitro* bone-like matrix formation, its *in vivo* effects were not studied yet.

**Methods:** Male Wistar rats (n = 40) with tibial bone defects were used. Experimental groups were designed to compare this novel biomaterial with a gold standard bioactive material (Bioglass<sup>®</sup> 45S5) and also with unfilled defects and intact controls. A three-point bending test was performed 20 days after the surgical procedure, in addition to the histomorphometric analysis in 2 regions of interest: cortical bone and medullary canal where the particulate biomaterial was implanted. **Results:** The three-point bending test revealed a significant increase in the maximum load at failure and stiffness in the Biosilicate<sup>®</sup> group (*vs.* control defects), reaching values similar to uninjured bones. There were no differences in the cortical bone parameters in groups with bone defects, but a great deal of woven bone was present surrounding Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 particulate. Although both bioactive materials supported significant higher bone formation; Biosilicate<sup>®</sup> was superior to Bioglass<sup>®</sup> 45S5 in some histomorphometric parameters (bone volume and number of osteoblasts). Regarding bone resorption, Biosilicate<sup>®</sup> group showed significant higher number of osteoclasts per unit of tissue area than defect and intact controls, despite of the non-significant difference in the osteoclastic surface as percentage of bone surface. **Conclusion:** This study reveals that the fully-crystallized Biosilicate<sup>®</sup> has good bone-forming and bone-bonding properties.

**Key words:** Bioactive glass and glass-ceramic, Bone histomorphometry, Mechanical properties, Animal study.

## INTRODUCTION

Millions of bone fractures occur every year worldwide. Although bone regeneration is a well-organized biological process, delayed union or non-unions may result from insufficient wound healing responses.<sup>1</sup> In addition, impairment of bone regenerative growth and remodeling can be caused by other clinical situations involving bone loss, such as various diseases or tumor resection.<sup>2</sup>

In this context, there is a critical need for technologies that are able to enhance bone healing.<sup>2</sup> One promising treatment is the use of bioactive glasses as bone graft substitutes due to their ability to bond and integrate with living bone by forming a biologically active bonelike apatite layer on their surfaces.<sup>3,4</sup> Osteoproduction, i.e. proliferation of new bone within a bone defect site,<sup>4</sup> occurs as a consequence of rapid reactions on bioactive glass surface. Moreover, surface reactions release critical concentrations of soluble silicon, calcium, phosphorus and sodium ions that stimulate the attachment, proliferation and differentiation of osteoblasts (bone-forming cells).<sup>4-8</sup>

Bioglass<sup>®</sup> 45S5, a silica-based melt-derived glass (45% SiO<sub>2</sub>, 24.5% Na<sub>2</sub>O, 24.5% CaO, 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), has been known for many years as the most bioactive composition among numerous bone-bonding glasses.<sup>4</sup> It was first introduced in the early 70s by Hench and since then, it has been reached many clinical applications, including the repair of periodontal bone defects, maxillo-facial defects reconstruction, spinal surgery and bone replacement.<sup>4</sup>

Many works have proved that Bioglass<sup>®</sup> 45S5 has good bone bonding properties and a stimulatory effect on osteogenesis.<sup>9-11</sup> Human bone cell culture over the surface of Bioglass<sup>®</sup> 45S5 discs demonstrated enhanced formation of bone nodules, which are three-



dimensional structures composed of mineralized extracellular matrix and cell aggregates with organizational complexity similar to natural bone grown *in vivo*.<sup>6</sup> In addition, the ionic products of Bioglass<sup>®</sup> 45S5 induced an increase in both human osteoblast proliferation and expression of insulin-like growth factor II (IGF-II), a potent osteoblast mitogenic growth factor.<sup>7</sup> Indeed, the mechanism for *in-situ* tissue regeneration involves upregulation of seven families of genes that control the osteoblast cell cycle, mitosis and differentiation.<sup>12</sup>

Despite its well-known stimulatory effects on osteogenesis, the use of bioglasses monolithic Bioglass<sup>®</sup> 45S5 for bone engineering applications has been limited mainly due to its relatively poor mechanical properties.<sup>13,14</sup> Considering this important matter, our research group has developed nucleation and growth thermal treatments to obtain a novel fully-crystallized bioactive glass-ceramic of the quaternary P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub> system (Biosilicate<sup>®</sup>, patent application WO 2004/074199). Crystallinity significantly changes the fracture characteristics of glasses leading to glass-ceramics with improved mechanical properties. On the other hand, the introduction of crystalline phases could, in principle, decrease the bioactivity.<sup>13,15</sup> But, interestingly, *in vitro* experiments demonstrated that Biosilicate<sup>®</sup> exhibits higher bone-like matrix formation than its parent glass and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 in an osteogenic culture system.<sup>16</sup>

This important finding stimulated us to progress the understanding of the effects of this fully-crystallized glass-ceramic on osteogenesis. Although Biosilicate<sup>®</sup> promotes enhanced *in vitro* bone-like matrix formation; its effect on *in vivo* bone growth has not been studied yet. In this context, the present study aims to investigate and compare the effects of Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 (gold standard biomaterial) on the bone regenerative process of surgically created defects in rat tibia.

## **METHODOLOGY**

### **Biomaterials**

High purity silica and reagent grade calcium carbonate, sodium carbonate, and sodium phosphate were used to obtain the generic glass compositions: Bioglass<sup>®</sup> 45S5 and Biosilicate<sup>®</sup> parent glass. The chemicals were weighed and mixed for 30 min. Premixed batches were melted in Pt crucible at a temperature range of 1250 to 1380°C for 3h in an electric furnace (Rapid Temp 1710 BL, CM Furnaces Inc., Bloomfield, NJ, USA) at the Vitreous Materials Laboratory of the Federal University of São Carlos (São Carlos, SP, Brazil). Immediately after, the liquid was rapidly cooled in cylindrical stainless steel molds in order to achieve vitreous plaques.

To obtain the fully-crystallized Biosilicate<sup>®</sup> glass-ceramic, Biosilicate<sup>®</sup> parent glass cylinders underwent cycles of thermal treatment to promote their crystallization. The first thermal cycle was performed at a relatively low temperature, just above the glass transition temperature to promote volumetric nucleation of crystals. Afterwards, the nucleated samples were submitted to further treatment at about 100°C above the nucleation temperatures. The detailed compositions and thermal treatment schedules to obtain the Biosilicate<sup>®</sup> glass-ceramic are described in the patent WO 2004/074199.<sup>17</sup>

Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 cylinders were crushed and the powders were sieved to select particles in the 180-210 µm range, which were used to fill bone defects in the present study.

### **Experimental design**

Forty male Wistar rats (aged 12 weeks and weighting 250-300 g) were used in this study. They were maintained under natural conditions of humidity and temperature, light-

dark periods of 12 hours, and with free access to water and commercial diet. All animal handling and surgical procedures were strictly conducted according the Guiding Principles for the Use of Laboratory Animals. This study was approved by the Animal Care Committee guidelines of the Federal University of São Carlos.

Rats were randomly distributed into four groups of 10 animals each:

- control intact group (intact tibias without the surgical creation of bone defects)
- control defect group (bone defects without any filler)
- Bioglass<sup>®</sup> 45S5 group (bone defects filled with the gold standard biomaterial)
- Biosilicate<sup>®</sup> group (bone defects filled with the biomaterial to be tested).

### **Surgical procedures**

Bilateral non-critical size bone defects were surgically created at the upper third of the tibia (10 mm distal of the knee joint). Surgery was performed under sterile conditions and general anesthesia induced by intra-peritoneal injection of Ketamine/ Xylazine (80/10 mg/Kg). The medial compartment of the tibia was exposed through a longitudinal incision on the shaved skin. A standardized 2.5-mm-diameter bone defect was created by using a motorized drill under copious irrigation with saline solution. Holes were compressed with gauze for 5 minutes. Immediately afterwards, bone cavities were completely filled with the corresponding biomaterial in the treated animal groups. After implantation, the cutaneous flap was replaced and sutured with resorbable polyglactin, and the skin was disinfected with povidone iodine. The health status of the rats was monitored daily.

Twenty days after the surgical procedure, animals were euthanized by anesthesia overdose and tibias were bilaterally harvested for analysis.

### **Mechanical test**

Biomechanical properties of the left tibia were determined by a three-point bending test in an Instron<sup>®</sup> Universal Testing Machine (USA, 4444 model, 1 KN load cell).

Tibias were placed on a special holding device with two supports located at a distance of 21.7 mm. The load cell was perpendicularly positioned at the exact site of the bone defect, prior to submitting the medial surface (repair area) to traction. A 5-N pre-load was applied in order to avoid specimen sliding. Finally, the bending force was applied at a constant deformation rate of 5 mm/min until fracture occurred. From the load-deformation curve, the maximum load at failure (N), structural stiffness (N/mm) and energy absorption (J) were obtained.

### **Bone histomorphometric analysis**

After harvesting the right tibias, the proximal segment was fixed in 70% ethanol, dehydrated, embedded in methylmetacrylate, and transversally sectioned using a Polycut S microtome (Leica, Heidelberg, Germany). Five- $\mu$ m-thick sections were obtained from the centre of the bone defect site. Sections were stained with 0.1% toluidine blue at pH 6.4, and at least two non-consecutive sections were examined for each sample. Data were obtained using the Osteomeasure semiautomatic image analyzer (Osteometrics, Atlanta, GA, USA).

Measurements were first performed at the inner and outer shells of cortical bone. Static parameters of cortical volume (Ct.V/TV, %) and thickness (Ct.Th,  $\mu$ m) were obtained. Afterwards, measurements were performed at two standardized fields inside the medullary canal where biomaterial particles were placed. The mean tissue area (T.Ar) analyzed was  $0.3392 \pm 0.0004$  mm<sup>2</sup>. The static indices obtained were bone volume as a percentage of tissue volume (BV/TV, %), osteoid volume as a percentage of tissue volume

(OV/TV, %), osteoid thickness (O.Th,  $\mu\text{m}$ ), number of osteoblasts per unit of tissue area (N.Ob/T.Ar, / $\text{mm}^2$ ), osteoblast surface as a percentage of bone surface (Ob.S/BS,%), number of osteoclasts per unit of tissue area (N.Oc/T.Ar, / $\text{mm}^2$ ), and osteoclast surface as a percentage of bone surface (Oc.S/BS, %). Histomorphometric indices were reported according to the standard nomenclature recommended by the American Society of Bone and Mineral Research.<sup>18</sup> All measurements were performed by a single observer who had no knowledge of which experimental group the samples belonged.

### **Statistical analysis**

The normality of all variable distribution was verified using Shapiro–Wilk’s *W* test. For the variables that exhibited normal distributions (BV/TV, OV/TV, O.Th, N.Ob/T.Ar, Ob.S/BS, N.Oc/T.Ar, energy absorption), comparisons among groups were made using one-way analysis of variance (ANOVA), complemented by Tukey HSD post-test analysis. Kruskal-Wallis test was performed for the variables not exhibiting normal distributions (Ct.V/TV, Ct.Th, Oc.S/BS, maximum load, stiffness). STATISTICA version 7.0 (data analysis software system - StatSoft Inc.) was used to carry out the statistics analysis. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Results are all presented as mean  $\pm$  standard error of the mean.

### **RESULTS**

Neither postoperative complications nor behavioural changes were observed. All animals recovered from the bilateral surgery and returned rapidly to their normal diet and movement pattern. The sacrifice time was reached without any adverse events.

### **Bone mechanical properties**

Table 1 summarizes the data of the biomechanical test. Bones which had the created defects filled with Biosilicate<sup>®</sup> exhibited similar biomechanical properties than intact controls. In addition, they could abide a significant large load before failure occurrence and exhibited higher stiffness than unfilled bone defects (defect controls). No significant difference was found in the comparison between Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 groups, instead of the non-significant difference among bone defects filled with Bioglass<sup>®</sup> 45S5 and unfilled bones.

### **Bone histomorphometry**

Cortical volume (Ct.V/TV) was significantly decreased in experimental groups submitted to the surgical creation of bone defects (control defect, Bioglass<sup>®</sup> 45S5 and Biosilicate<sup>®</sup> groups) in comparison with intact bones (Fig.1). The cortical thickness was also significantly higher in control intact group than in Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 groups. No significant difference was found among bone defects filled with Biosilicate<sup>®</sup>, Bioglass<sup>®</sup> 45S5 and unfilled bone defects (control defects).

However, a great deal of high cellularized woven bone was present circumjacent to the biomaterial particles and the quantitative analysis demonstrated that bone volume (BV/TV) was significantly higher in the Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 groups than in both control groups (Fig.2), with defect controls also exhibiting osteogenic activity in the medullary region. By comparing Biosilicate<sup>®</sup> with the gold standard biomaterial (Bioglass<sup>®</sup> 45S5), we found a significantly higher bone volume in the Biosilicate<sup>®</sup> group (Fig.2).

Newly formed bone was observed surrounding Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 particles, in a direct contact with the material surface (Fig.3). Moreover, interparticle spaces

were also filled by new bone trabeculae, exhibiting trabeculae bridges formation between some particles.

Nonmineralized bone tissue (osteoid) deposits were present over the surface of the woven bone. Osteoid volume was significantly higher in the Biosilicate<sup>®</sup> group than in both control groups (Fig.4), and the osteoid thickness higher than in control intact (Fig.5). Bioglass<sup>®</sup> 45S5 and control defect group also exhibited higher osteoid volume than control intact group, without differences regarding osteoid thickness.

Active cuboidal osteoblasts were present lining areas of osteoid tissue. Bone defects filled with Biosilicate<sup>®</sup> showed a significant higher number of osteoblasts per unit of tissue area (N.Ob/T.Ar) than defects filled with Bioglass<sup>®</sup> 45S5, unfilled defects and intact controls (Fig.6). The number of osteoblasts was also significantly higher in the Bioglass<sup>®</sup> 45S5 group than in intact and defect controls, instead of the greater osteoblast surface as a percentage of bone surface (Ob.S/BS) in control groups in comparison with the two treated groups (Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5) (Fig. 7).

Regarding the histomorphometric parameters of bone resorption, the Biosilicate<sup>®</sup> group showed a significant higher number of osteoclasts per unit of tissue area than both control groups (Fig. 8), instead of the non-significant difference in the osteoclast surface as a percentage of bone surface (Fig. 9).

## **DISCUSSION**

Since a previous *in vitro* study demonstrated the high osteogenic potential of Biosilicate<sup>®</sup>,<sup>16</sup> we hypothesized that this novel biomaterial could also greatly induce *in vivo* bone growth. Results from the present work showed that, instead of the incomplete cortical healing, bones which had the surgically created defects filled with Biosilicate<sup>®</sup> particulate

exhibited significant larger volumes of newly formed bone tissue and greater mechanical properties.

The bone mass, as well as the quality and arrangement of its microstructural elements, influences bone mechanical properties.<sup>19</sup> Therefore, the improved bone load-bearing capacity and stiffness stimulated by Biosilicate<sup>®</sup> probably mirror the huge amount and/or spatial distribution of newly formed bone into the defect site, the presence of the biomaterial particulate and the strong bond between them, which can be very useful during bone healing processes.

Newly formed bone was observed surrounding Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 particles, in a direct contact with the material surface. Moreover, interparticle spaces were also filled by new bone trabeculae, exhibiting trabeculae bridges formation between some particles.

Oonishi et al.<sup>20</sup> demonstrated a progressive bone formation at the surface of Bioglass<sup>®</sup> 45S5 particles filling bone defects in rabbits. According to these authors, the new bone had a trabecular architecture that incorporates the glass particles within the bone structure.

In the present study, Biosilicate<sup>®</sup> particulate implantation resulted in both mineralized and osteoid matrix volumes augmentation. Despite of the comparisons with a gold standard bioactive material (Bioglass<sup>®</sup> 45S5) and the fact that a previous in vitro study demonstrated that Biosilicate<sup>®</sup> is comparable to class A bioactive glasses,<sup>16</sup> this study failed in not including bone defects filled with bioinert materials, for instance alumina, as an additional control group.

Within this limitation, the findings uphold the working principle of bioactive glasses or glass ceramics, which is considered to be a rapidly deposition of a layer of hydroxycarbonate apatite (HCA) on the surface of the silica gel as a result of exchange



between calcium and silica ions when bioactive glass came into contact with living tissues.<sup>4,15</sup> Entirely inorganic reactions, previously described by Hench,<sup>4</sup> lead to rapid growth of HCA bone mineral on the glass surface and to a rapid proliferation of new bone within a bone defect site, a process termed osteoproduction.

The size, crystal habit, orientation and composition of the HCA phase are equivalent to that of the mineral phase of living bone. This phase provides binding site for osteoprogenitor cells attachment, proliferation and differentiation; hence cell function is favored and osteoid matrix is generated.<sup>4</sup> Indeed, collagen fibrils are incorporated within the mineralized layer of newly forming bone, as demonstrated by electron microscopy of the glass interface bonded to bone.<sup>21</sup>

However, the rate of the reactions that occurs on the material surface is highly sensitive to the material composition.<sup>4</sup> In the present study, comparisons among bone defects filled with Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5, both belonging to the quaternary P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub> system, demonstrated significant larger areas of mineralized matrix formation in Biosilicate<sup>®</sup> group on day 20 post-surgery. Therefore, Biosilicate<sup>®</sup> specific compositional range within the quaternary system most likely enhances the production of bone-like matrix.

This *in vivo* finding corroborates previous *in vitro* results, which showed that, although Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 discs supported osteogenesis, significantly larger areas of calcified matrix were detected for the fully-crystallized glass-ceramic (Biosilicate<sup>®</sup>) after 17 days in an osteogenic culture system.<sup>16</sup>

It was worth noticing that the special nucleation and growth thermal treatments developed by our research group to improve the mechanical properties of glasses were also

feasible to the obtainment of a fully-crystallized glass-ceramic (Biosilicate<sup>®</sup>) with the high bioactivity level and osteoproliferative properties exhibited by glasses.

We considered that filling limited bone defects was an efficient model to assess bone growth induced by particulate biomaterials. The difficulty of placing and retaining the particles in the defect site was overcome by the cohesive mass formed when Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 particles were placed in bleeding sites. Consequently, the particles could easily pack into the bone defect site and stay in place. The same phenomenon was reported by Oonish et al. using Bioglass<sup>®</sup> 45S5 particles to fill non-critical bone defects in femoral condyles of rabbits.<sup>20</sup> According to these authors, the cohesive mass is formed because rapid reactions on the material surface lead to the formation of a gel layer and, consequently, sufficient hemostasis is reached. The intramedullary implantation has been widely used to assess bone responses to biomaterials.<sup>20, 22-24</sup>

Clinical advantage of Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 has been provided by their capacity to be easy to manipulate, hemostatic and to promote large areas of bone tissue formation. However, recent research shows that the critical stage of reaction for bone regeneration is related with cell attachment and proliferation on the biomaterial surface,<sup>3,4,8</sup> mechanisms still beginning to be understood. It's believed that cellular responses constitute an essential requirement for the bioactive behavior.<sup>25</sup>

Multiple studies have shown that an exposure of human primary osteoblasts to the soluble chemical extracts of Bioglass<sup>®</sup> 45S5 is responsible for activating several families of genes within few hours, including genes encoding nuclear transcription factors and potent growth factors.<sup>5-8</sup> These findings indicate that Class A bioactive glasses promote osteogenesis through a direct control over genes that regulate cell cycle induction and

progression, which can explain the significant higher number of osteoblasts per unit of area (N.Ob/T.Ar) in Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 groups in the present study.

On the other hand, the osteoblast surface as a percentage of bone surface was significantly higher in the control group. Therefore, despite the huge number of osteoblasts observed in bone defects filled with Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5, the magnitude of the bone formation was higher than the increment in the number of cells. In fact, any cells or organic molecules are required for the rapid growth of HCA bone mineral on the bioactive glass or glass-ceramic surface.<sup>4</sup> However, isolating the physicochemical phenomena from the reactions affected by cellular activity would be a mechanistic explanation for the multiple and parallel interactions occurring at the material-tissue interface. Considering this important matter, we hypothesize that cellular activity and function may also be enhanced by the local chemical environment created by Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 particulate implantation. In this case, these bioactive materials could influence not only cell proliferation but also the osteogenic potential of these cells.

Motivated by the remarkable number of osteoblasts surrounding Biosilicate<sup>®</sup> granules found in the present work, further studies must be developed to investigate the influence of the inorganic ions released by this novel glass-ceramic on the genetic control of the osteoblast cell cycle and function.

Moreover, once new bone matrix has been formed by osteoblasts, supplementary efforts should be spent on the investigation of its degradation caused by osteoclasts. The remodeling process, including bone-forming activity and bioresorption, is an important prerequisite to the obtainment of the desired complete reorganization of the implanted biomaterial into bone tissue.<sup>26,27</sup>

While many studies have focused on bone formation from both mature and bone marrow-derived osteoblasts on various biomaterials, few investigations address osteoclasts role in bone tissue engineering.<sup>26</sup> Hamadouche et al. investigated the long-term *in vivo* bioactivity and degradability of bulk sol-gel-derived glasses (58S and 77S Bioglass<sup>®</sup>), using bulk 45S5 melt-derived Bioglass<sup>®</sup> as a control.<sup>28</sup> Absorbability was observed for both sol-gel-derived glasses starting 12 weeks after implantation, and reaching 40% after 52 weeks. The authors assumed that this absorbability was partially related to osteoclastic resorption as viable osteoclasts-like cells were found to be in direct contact with the glass surfaces. On the other hand, no degradation could be measured in the case of Bioglass<sup>®</sup> 45S5 within 1 year of implantation.

In the present study, Biosilicate<sup>®</sup> group showed a significant higher number of osteoclasts per unit of tissue, instead of the non-significant difference in the eroded surface as percentage of bone surface.

Nevertheless, the present study investigated a single stage of the bone regenerative process induced by a well-defined size range of the biomaterial particulate. Then, further studies should be developed to provide additional information concerning the dynamics of the Biosilicate<sup>®</sup> influence on bone remodeling and the structural changing behavior of this biomaterial. This supplementary investigation should focus on the final aim of bone induced-regeneration, which is the ability to restore the bone architecture with biological and mechanical properties similar to the uninjured one.

## CONCLUSION

This study reveals that the fully-crystallized Biosilicate<sup>®</sup> has good bone-forming properties. The novel bioactive glass-ceramic supported a great number of osteoblasts inside the defect site and enhanced new bone formation, as well as improved mechanical

properties of the bone. Although further long term studies and clinical trials are required, the findings here presented point to a promising use of Biosilicate<sup>®</sup> for bone engineering applications.

## REFERENCES

1. Zimmermann G, Muller U, Wentzensen A. The value of laboratory and imaging studies in the evaluation of long-bone non-unions. *Injury* 2007; 38S: S33-S37.
2. Gauthier O, Müller R, von Stechow D, Lamy B, Weiss P, Bouler JM, Aguado E, Daculsi G. In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: A three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. **Biomaterials** 2005; 26: 5444–5453.
3. Hench LL, Polak JM. Third-Generation Biomedical Materials. *Science* 2002; 295: 1014-1017.
4. Hench LL. Glass and Genes: The 2001 W. E. S. Turner Memorial Lecture. *Glass Technology* 2003; 44(1): 1-10.
5. Hench, LL, Xynos ID., Buttery LD, Polak JM. Bioactive Materials to Control Cell Cycle. *Mat Res Innovat* 2000; 3: 313-23.
6. Xynos ID, Hukkanen MV, Batten JJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif Tissue Int* 2000; 67(4): 321-9.
7. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 24,276(2): 461-5.

8. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench L L, Polak JM. Gene Expression Profiling of Human Osteoblasts Following Treatment with the Ionic Products of Bioglass® 4555 Dissolution. *J Biomed Mater Res* 2001; 55: 151-7.
9. Reilly GC, Radin S, Chen AT, Ducheyne P. Differential alkaline phosphatase responses of rat and human bone marrow derived mesenchymal stem cells to 45S5 bioactive glass. *Biomaterials* 2007; 28(28): 4091-7.
10. Nandi SK, Kundu B, Datta S, De DK, Basu D. The repair of segmental bone defects with porous bioglass: An experimental study in goat. *Res Vet Sci* 2009; 86(1): 162-73.
11. Vargas GE, Mesones RV, Bretcanu O, López JM, Boccaccini AR, Gorustovich A. Biocompatibility and bone mineralization potential of 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds in chick embryos. *Acta Biomater* 2009; 5(1): 374-80.
12. Hench LL, Xynos ID, Polak JM. Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004; 15(4): 543-62.
13. Vallet-Regi M. Ceramics for medical applications. *J Chem Soc. Dalton Trans* 2001; 97–108.
14. Dieudonne SC, van den Dolder J, de Ruijter JE, Paldan H, Peltola T, van 't Hof MA, Happonen RP, Jansen JA. Osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells cultured on silica gel and sol-gel-derived titania. *Biomaterials* 2002; 23: 3041-3051.
15. Hench LL, West JK. Biological applications of bioactive glasses. *Life Chem Reports* 1996; 13: 187-241.
16. Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Beloti MM, Panzeri H, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate). *J Biomed Mater Res A* 2007; 82(3): 545-57.

17. FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Zanotto ED et al. Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments. Int. C. C03C10/00, 20 Feb. 2004, WO2004/074199.
18. Parfitt AM, Drezner MK., Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. *J. Bone Miner Res* 1987; 2: 595–610.
19. Olivera MI, Martínez MP, Conti MI, Bozzini C, Bozzini CE, Alippi RM. Permanent reduction of mandibular size and bone stiffness induced in post-weaning rats by cyclophosphamide. *Arch Oral Biol* 2009; 54(1): 6-11.
20. Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, Tsuji E, Sugihara T. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin Orthop Relat Res* 1997; 334:316-25.
21. Davies JE, Baldan N. Scanning electron microscopy of the bone-bioactive implant interface. *J Biomed Mater Res* 1997; 15, 36(4): 429-40.
22. Nishimura N, Yamamuro T, Taguchi Y, Ikenaga M, Nakamura T, Kokubo T, Yoshihara S. A new bioactive bone cement: its histological and mechanical characterization. *J Appl Biomater* 1991; 2(4): 219-29.
23. Kobayashi M, Nakamura T, Shinzato S, Mousa WF, Nishio K, Ohsawa K, Kokubo T, Kikutani T. Effect of bioactive filler content on mechanical properties and osteoconductivity of bioactive bone cement. *J Biomed Mater Res* 1999; 15,46(4): 447-57.
24. Gorustovich AA, López JM, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Biological performance of boron-modified bioactive glass particles implanted in rat tibia bone marrow. *Biomed Mater* 2006; 1(3):100-5.

25. Gao T, Aro HT, Ylänen H, Vuorio E. Silica-based bioactive glasses modulate expression of bone morphogenetic protein-2 mRNA in Saos-2 osteoblasts in vitro. *Biomaterials* 2001; 22: 1475-1483.
26. Nakagawa K, Abukawa H, Shin My, Terai H, Troulis Mj, Vacanti Jp. Osteoclastogenesis on Tissue-Engineered Bone. *Tissue Eng* 2004; 10(1-2): 93-100.
27. Domaschke H, Gelinsky M, Burmeister B, Fleig R, Hanke T, Reinstorf A, Pompe W, Rösen-Wolff A. In Vitro Ossification and Remodeling of Mineralized Collagen I Scaffolds. *Tissue Eng* 2006; 12(4): 949-58.
28. Hamadouche M, Meunier A, Greenspan DC, Blanchat C, Zhong JP, La Torre GP, Sedel L. Long-term in vivo bioactivity and degradability of bulk sol-gel bioactive glasses. *J Biomed Mater Res* 2001; 15,54 (4): 560-6.



# **ANEXO B**

## Comparative kinetics of bone responses to different-sized Biosilicate® particles.

### ABSTRACT

**Objective:** This study aims to compare the bone reaction to two different granulometric distributions of a novel bioactive glass-ceramic (Biosilicate®). **Background Data:** Bone responses may vary depending on the factors that influence the chemical reaction kinetics of a bioactive material. Despite of the positive effects of the full crystallization of bioactive glasses in a range of composition of the system  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$  on osteogenesis promotion, the effects of different-sized particles have not been studied yet. **Methods:** Surgically created bone defects in the tibia of rats ( $n = 80$ ) were filled with 180- to 200- $\mu m$  or with 300- to 355- $\mu m$  particles of Biosilicate® and Bioglass® 45S5 (gold standard bioactive material). Unfilled bones ( $n=20$ ) were also used as controls. Histomorphometric analyses were performed 10 and 20 days after the surgical procedure. **Results:** The more pronounced partial degradation of 180- to 210- $\mu m$  Biosilicate® particles was accompanied by a significant higher bone volume in this experimental group ( $p<0.05$ ). Biosilicate® advantage over Bioglass® 45S5 was only revealed in the comparison of smaller-sized particles. The rate of the surface reactions also influenced osteoblasts recruitment, although no differences were found in the number of osteoclasts. Only bone defects filled with 300- to 355- $\mu m$  particles of Biosilicate® showed similar behavior than unfilled bones regarding the transitory bone marrow fibrosis. **Conclusion:** Smaller-sized particles of Biosilicate® revealed partial reabsorption, which was accompanied by a more pronounced bone-forming ability. Although also efficient for bone formation, larger particles of this bioactive material exhibited a more steady-state behavior for its responses.

## INTRODUCTION

Bone-bonding ability is a particular feature of bioactive ceramics, glasses, glass ceramics and composites (1,2). This unique property has attracted a great deal of interests for the treatment of clinical situations involving bone loss (3), especially considering the demands for high quality bone and joint health care of the rapidly growing aging population worldwide (4,5).

The underlying mechanisms that make bioactive materials suitable for bone regeneration involve a sequence of inorganic reactions, previously described by Hench (2), that lead to rapid growth of a layer of hydroxycarbonate apatite (HCA) on the material surface immersed in physiological environments. The size, crystal habit, orientation and composition of the HCA phase are equivalent to that of the mineral phase of living bone, thus providing a binding site for osteoprogenitor cells attachment, proliferation and differentiation (2).

Early attention was paid to these changes occurring in the bioactive material surface, but additional findings supported the concept that the mechanism for *in-situ* tissue regeneration also involves a direct genetic control of the cellular responses to the inorganic ions released by these biomaterials (2,5,6). Indeed, an exposure of human primary osteoblasts to the ionic dissolution products of Bioglass<sup>®</sup> 45S5, which has been known as the most bioactive composition among numerous bone-bonding glasses (2), is responsible for the upregulation of at least seven families of genes that encode proteins known to influence all aspects of cell proliferation and differentiation (7,8).

These findings indicate that bioactive materials can induce bone regeneration through a more biologically based method than the merely substitution and/or replacement of tissues. However, better advantage of this property can be taken by the investigation of

the rate at which bioactive materials undergo the sequential reactions toward bone growth and cell stimulation (9,10). The kinetic factors that influence the biomaterial reactivity, such as chemical composition, crystallinity and particle size, deeply affect bone responses (10, 11, 12). Therefore, these factors can be controlled for different desired purposes in the clinical practice, since some effects must be preferable over others depending on the specific situation.

Regarding crystallization, it has been known that the introduction of crystalline phases could, in principle, decrease the kinetics of the apatite layer formation in simulated body fluid (SBF) K9 (11, 13). However, *in vitro* experiments demonstrated that a novel fully-crystallized bioactive glass-ceramic of the quaternary  $P_2O_5$ - $Na_2O$ - $CaO$ - $SiO_2$  system (Biosilicate<sup>®</sup>) exhibited hydroxycarbonateapatite (HCA) layer formation on its surface in SBFK9 as early as 24 h, which is comparable to the class A bioactive glasses (14). Moreover, Biosilicate<sup>®</sup> discs supported significantly larger areas of calcified matrix after 17 days in an osteogenic culture system, in comparison to Bioglass<sup>®</sup> 45S5 and Biosilicate<sup>®</sup> parent glass (14).

Despite of the positive effects of the full crystallization of bioactive glasses in a range of composition of the system  $P_2O_5$ - $Na_2O$ - $CaO$ - $SiO_2$  on osteogenesis promotion, the effects of different-sized particles have not been studied yet. As it is a factor that influence the chemical reaction kinetics, the particle size greatly affect both cell and solution-mediated dissolution of a biomaterial in contact with physiological fluids towards the production of newly formed bone (9, 12). In this context, the present study aims to compare the bone reaction to two different granulometric range of Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 (gold standard biomaterial) particulate on surgically created defects in rat tibia.

## METHODOLOGY

### Biomaterials

High purity silica and reagent grade calcium carbonate, sodium carbonate, and sodium phosphate were used to obtain the generic glass compositions: Bioglass<sup>®</sup> 45S5 and Biosilicate<sup>®</sup> parent glass. The chemicals were weighed and mixed for 30 min in a polyethylene bottle. Premixed batches were melted in Pt crucible at a temperature range of 1250 to 1380°C for 3h in an electric furnace (Rapid Temp 1710 BL, CM Furnaces Inc., Bloomfield, NJ, USA) at the Vitreous Materials Laboratory of the Federal University of São Carlos (São Carlos, SP, Brazil). Immediately after, the liquid was rapidly cooled in cylindrical stainless steel molds in order to achieve vitreous plaques.

To obtain the fully-crystallized Biosilicate<sup>®</sup> glass-ceramic, Biosilicate<sup>®</sup> parent glass cylinders underwent cycles of thermal treatment to promote their crystallization. The first thermal cycle was performed at a relatively low temperature, just above the glass transition temperature to promote volumetric nucleation of crystals. Afterwards, the nucleated samples were submitted to further treatment at about 100°C above the nucleation temperatures. The detailed compositions and thermal treatment schedules to obtain the Biosilicate<sup>®</sup> glass-ceramic are described in the patent WO 2004/074199 (15).

Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 cylinders were crushed and the powders were sieved to select particles from both 180-210 µm and 300-355 µm size range, which were used to fill bone defects in the present study.

### **Experimental design and surgical procedures**

One hundred male Wistar rats (aged 12 weeks and weighting 250-300 g) were randomly distributed into 5 groups of 20 animals each. Groups differ regarding the biomaterial used to fill the bone defects and the size range of the biomaterial particles:

- Control group (bone defects without any fillers)
- Bioglass<sup>®</sup> 45S5 group (180- to 210- $\mu$ m particles)
- Bioglass<sup>®</sup> 45S5 group (300- to 355- $\mu$ m particles)
- Biosilicate<sup>®</sup> group (180- to 210- $\mu$ m particles)
- Biosilicate<sup>®</sup> group (300- to 355- $\mu$ m particles)

All groups were divided into 2 sub-groups, considering different time-points for sample analysis (10 and 20 days post-surgery).

Non-critical size bone defects were surgically created at the upper third of the right tibiae (10 mm distal of the knee joint). Surgery was performed under sterile conditions and general anesthesia induced by intra-peritoneal injection of Ketamine/ Xylazine (80/10 mg/Kg). The medial compartment of the tibia was exposed through a longitudinal incision on the shaved skin. A standardized 2.5-mm-diameter bone defect was created by using a motorized drill under copious irrigation with saline solution. Holes were compressed with gauze for 5 minutes. Immediately afterwards, bone cavities were completely filled with the corresponding biomaterial in the treated animal groups. After implantation, the cutaneous flap was replaced and sutured with resorbable polyglactin, and the skin was disinfected with povidone iodine. The health status of the rats was monitored daily. They were maintained under natural conditions of temperature and humidity, light-dark periods of 12 hours, and with free access to water and commercial diet.

On days 10 and 20 after the surgical procedure, animals were euthanized by anesthesia overdose and tibias were bilaterally harvested for analysis.

All animal handling and surgical procedures were strictly conducted according the Guiding Principles for the Use of Laboratory Animals. This study was approved by the Animal Care Committee guidelines of the Federal University of São Carlos.

### **Bone histomorphometric analysis**

After harvesting the right tibias, the proximal segment was fixed in 70% ethanol, dehydrated, embedded in methylmetacrylate, and transversally sectioned using a Polycut S microtome (Leica, Heidelberg, Germany). Five- $\mu$ m-thick sections were obtained from the centre of the bone defect site. Sections were stained with 0.1% toluidine blue at pH 6.4, and at least two non-consecutive sections were examined for each sample. Data were obtained by the Osteomeasure semiautomatic image analyzer (Osteometrics, Atlanta, GA, USA). Measurements were performed at a standardized and representative field in the medullary region. The mean tissue area (T.Ar) analyzed was  $0.1697 \pm 0.0002 \text{ mm}^2$ . The static indices of bone structure, formation and resorption were bone volume as a percentage of tissue volume (BV/TV, %), osteoid volume as a percentage of tissue volume (OV/TV, %), bone marrow fibrosis volume as a percentage of tissue volume (Fb.V/TV, %), number of osteoblasts per unit of tissue area (N.Ob/T.Ar, / $\text{mm}^2$ ), osteoblast surface as a percentage of bone surface (Ob.S/BS,%), number of osteoclasts per unit of tissue area (N.Oc/T.Ar, / $\text{mm}^2$ ), and osteoclast surface as a percentage of bone surface (Oc.S/BS, %).

The space occupied by the biomaterial particles were also measured in order to determine the bone graft substitute volume (BGV, %) and the biomaterial thickness (BG.Th,  $\mu$ m). These measurements were performed within the same tissue area where bone

measurements were made, so enabling the calculation of the bone and osteoid volume as a percentage of the free space within the tissue volume (normalized bone and osteoid volumes, %).

### **Statistical analysis**

Kruskal-Wallis test was performed for the comparisons among groups. Wilcoxon matched pairs test was used for the comparisons between time-points. STATISTICA version 7.0 (data analysis software system - StatSoft Inc.) was used to carry out the statistics analysis. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Results are all presented as mean  $\pm$  standard error of the mean.

### **Results**

Woven bone was present circumjacent to the Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 particles at both time-points analyzed, without differences regarding the quality of the newly formed bone tissue. However, bones which had the surgically created defects filled with Biosilicate<sup>®</sup> particles in the size range of 180-210 $\mu$ m exhibited significant larger volumes of newly formed bone tissue on day 20 than those filled with 300- to 355- $\mu$ m particles of the same biomaterial (Fig.1). Moreover, only the smaller-sized particles of Biosilicate<sup>®</sup> showed a significantly higher bone volume than Bioglass<sup>®</sup> 45S5 particles on day 20 (Fig.1). No significant differences were found on day 10. For the comparisons among biomaterials and particle sizes, similar results were found for bone volume as a percentage of the tissue volume or as a percentage of the free space volume (Normalized Bone Volume).

Unfilled bones (controls) exhibited smaller bone volume than all granulometric distributions of Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> at both time-points analyzed (Fig.1), except for Bioglass<sup>®</sup> 45S5 300-355  $\mu$ m group on day 10.



There were no significant differences regarding osteoid volume among bone defects filled with biomaterials (Fig.2). However, only bone defects filled with Biosilicate<sup>®</sup> exhibited significantly higher osteoid volume as a percentage of the tissue volume than control group on day 10 (Fig.2).

Bone defects filled with 180- to 210- $\mu\text{m}$  particles of Biosilicate<sup>®</sup> showed a significant higher number of osteoblasts per unit of tissue area (N.Ob/T.Ar) than defects filled with 300- to 355- $\mu\text{m}$  particles at both time-points (Fig.3). However, there were no differences in the number of osteoblasts concerning the two particle-size ranges of Bioglass<sup>®</sup> 45S5. Comparisons among biomaterials revealed a significant higher number of osteoblasts in Biosilicate<sup>®</sup> groups, except for the 300- to 355-  $\mu\text{m}$  granulometric range on day 20. The same disparity among biomaterials was verified in the osteoblast surface as a percentage of bone surface (Fig.4).

All granulometric distributions of Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 exhibited significant higher number of osteoblasts than control group at both time-points analyzed (Fig.3), except for Bioglass<sup>®</sup> 45S5 300-355  $\mu\text{m}$  group on day 20.

Regarding the histomorphometric parameters of bone resorption, there were no significant differences among biomaterials and/or particle sizes neither in the number of osteoclasts per unit of tissue (Fig.5) area nor in the osteoclast surface as a percentage of bone surface (Fig.6). Bioglass<sup>®</sup> 45S5 and Biosilicate<sup>®</sup> particles in the size range of 180-210  $\mu\text{m}$  exhibited significantly higher number of osteoclasts per unit of tissue area than the control group on day 10 and 20, respectively (Fig.5).

There were no significant differences among groups regarding the percentage of the tissue area occupied by biomaterial particles on day 10 (Fig.7). Furthermore, no significant differences were found in the biomaterial thickness among similar sized Biosilicate<sup>®</sup> and

Bioglass<sup>®</sup> 45S5 groups on day 10. However, the thickness of Biosilicate<sup>®</sup> 180-210 $\mu$ m particles significantly decreased from day 10 to day 20. This experimental group exhibited significant lower biomaterial volume and thickness than Bioglass<sup>®</sup> 45S5 180-210  $\mu$ m group on day 20. Therefore, a ten-days-period between the two time-points was insufficient for a significant resorption of the analyzed biomaterials, except for 180-210  $\mu$ m particles of Biosilicate<sup>®</sup>, which showed evidence of partial degradation.

Unfilled bones exhibited a transitory bone marrow fibrosis, since the fibrotic areas totally disappeared on day 20. Only bone defects filled with 300- to 355- $\mu$ m particles of Biosilicate<sup>®</sup> showed similar behavior. The other groups exhibited a significant higher fibrosis volume on day 20, instead of the non-significant difference on day 10 (Fig.8).

## **DISCUSSION**

The search for ideal conditions to the use of bioactive materials has attracted a great deal of interests nowadays, since there is a growing need for efficient bone-bonding implants in the field of orthopaedic and dental surgery (5). It's generally accepted that biological responses may vary depending on some factors that influence the biomaterial reactivity (9, 10, 12). In this context, the present study was designed to compare the effects of two different granulometric distributions of Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 (gold standard biomaterial) particulate on surgically created defects in rat tibia.

Biosilicate<sup>®</sup> particles in the size range of 180- to 210- $\mu$ m were the only one exhibiting signs of partial bioresorption in this study. It is well-know that the particle size is one crucial factor that influences this property, as it directly affects the surface area available for reactions with cells and physiological fluids (11, 12). In general, the smaller the particle size, the faster is the biomaterial resorption. Therefore, the 180- to 210- $\mu$ m-particles

advantage for being resorbed in comparison with 300- to 355- $\mu\text{m}$  particles corroborate with these broad concepts.

However, the biomaterial-related difference was an unexpected finding. Biosilicate<sup>®</sup>, which is a fully-crystallized glass-ceramic, exhibited a significant higher resorption rate than Bioglass<sup>®</sup> 45S5, which has a glass network. Crystalline structures are characterized by an ordered spatial lattice and atomic distribution (11, 12). Oppositely, the glass structure has an inherent disorder (high number of structural defects and non-crystallinity) that has been associated with a higher solubility of these materials (11). Various studies demonstrated that solubility is inversely correlated to crystallinity (16, 17, 18). The contradictory result in the present study is probable due to the difference in the chemical element ratio of Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 within the quaternary  $\text{P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2$  system, which they both belong. Additional studies, including groups with Biosilicate<sup>®</sup> parent glass and also longer time-points for analysis, should be developed to promote a deep understanding about this phenomenon.

Another point which merits consideration is that results regarding biomaterial resorption are consistent with the findings regarding new bone formation in the present study. The more pronounced partial degradation of 180- to 210- $\mu\text{m}$  Biosilicate<sup>®</sup> particles was accompanied by a significant higher bone volume in this experimental group. This finding gives rise to the evidence that the surface reactivity directly affect the bone responses to bioactive materials, with larger solubility rates leading to a more noticeable enhancement effect on bone tissue growth (10).

Regarding the different bioactive materials, this *in vivo* finding corroborates previous *in vitro* results (14) which showed that, although Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 discs supported osteogenesis, significantly larger areas of calcified matrix were detected for the

fully-crystallized glass-ceramic (Biosilicate<sup>®</sup>) after 17 days in an osteogenic culture system. However, Biosilicate<sup>®</sup> advantage over Bioglass<sup>®</sup> 45S5 was only revealed in the comparison of smaller-sized particles in the present study, which can be due to a slower effect on bone growth considering larger-sized particles. Enhancement of bone tissue growth in smaller-sized particles was also demonstrated in some studies involving other biomaterials (19, 20).

Furthermore, the rate of the surface reactions may also play a role in the cell recruitment for osseous apposition (19), through a time-dependent influence on the attachment, proliferation, differentiation and mineralization of bone cells (10). In the present study, the number of osteoblasts per unit of tissue area was significantly higher in the Biosilicate<sup>®</sup> 180-210  $\mu\text{m}$  group than in the groups consisting of larger-sized particles of the same biomaterial and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 particles in the same granulometric range. Multiple studies have shown that an exposure of human primary osteoblasts to the soluble chemical extracts of Class A bioactive glasses is responsible for activating several families of genes that regulate cell cycle induction and progression (7, 21-23). Therefore, as the factors that influence the biomaterial reactivity, such as particle size, composition and crystallinity, regulate the kinetics of the ions release; they most likely also affect cell proliferation and function.

On the other hand, neither the number of osteoclast nor the eroded surface as a percentage of bone surface differed among groups involving biomaterials in the present study. It was expected that the increase in the number of osteoblasts, the bone-forming cells, could also be accompanied by an increase in the number of osteoclasts, the bone-degrading cells. It's well-known that there is a complex signaling between these cells through the regulation of cell surface molecules and the secretion of cytokines, enabling their activities to be mutually influenced (24, 25). We hypothesize that this effect was not

observed in the present study because the ions released by bioactive materials when immersed in physiologic fluids buffer the solution towards an alkaline pH (Hench, 2003), which favors the bone matrix mineralization by osteoblasts (2, 26). Acidification is the key requirement for osteoclasts to excavate resorption pits, and it has become clear the role of extracellular H<sup>+</sup> as a long-sought osteoclast activation factor (26). Moreover, an in vitro study demonstrated that osteoclasts are very sensitive to small shifts in pH within the pathophysiologic range (27). In the present study, we suppose that reaction rates from neither smaller- nor larger-sized particles of both biomaterials created efficient extracellular environment conditions for the near-maximal resorption activity of osteoclasts.

However, bioresorption must be considered from two viewpoints: the solution- and the cell-mediated degradation (9). We believe that the biomaterial dissolution in the physiological solution contributed more than phagocytosis for the partial degradation of the particles in the present study.

Furthermore, the ionic products of the biomaterial dissolution may be the cause for the longer-lasting bone marrow fibrosis, as the chemical insult could constitute an additional factor to the tissue injury for a persistent activation of repair mechanisms (28), which is likely to occur through the release of growth factors and cytokines (28, 29). On the other hand, it was worth noticing that no significant differences were found in the bone marrow fibrosis volume among bone defects filled with 300- to 355- $\mu$ m particles of Biosilicate<sup>®</sup> and unfilled bone defects, thus suggesting a possible decreased reactional state of these groups on day 20. Further long-term studies are required to access if the late bone responses to Biosilicate<sup>®</sup> particles mirror its positive effects on bone growth.

## CONCLUSION

Smaller-sized particles of Biosilicate<sup>®</sup> revealed partial reabsorption, which was accompanied by a more pronounced bone-forming ability. Although also efficient for bone formation, larger particles of this biomaterial exhibited a more steady-state behavior for its responses. Although additional investigations are required, especially including long-term analysis of the bone reaction to Biosilicate<sup>®</sup> implantation, the results from the present study point that bone-engineering strategies can be usefully applied in order to achieve optimal conditions for different desired purposes in clinical practice.

## REFERENCES

- 1 - Hench LL, Polak JM. Third-Generation Biomedical Materials. *Science* 2002; 295: 1014-1017.
- 2 - Hench LL. Glass and Genes: The 2001 W. E. S. Turner Memorial Lecture. *Glass Technology* 2003; 44(1): 1-10.
- 3 - Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, Tsuji E, Sugihara T. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin Orthop Relat Res* 1997; 334:316-25.
- 4 - Laurencin CT, Ambrosio AM, Borden MD, Cooper JA Jr. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng* 1999; 1:19-46.
- 5 - Hench LL. Challenges for Bioceramics in the 21st Century. *American Ceramic Society Bulletin* 2005; 84(9).
- 6 - Gao T, Aro HT, Ylänen H, Vuorio E. Silica-based bioactive glasses modulate expression of bone morphogenetic protein-2 mRNA in Saos-2 osteoblasts in vitro. *Biomaterials* 2001; 22: 1475-83.

- 7 - Hench, LL, Xynos ID., Buttery LD, Polak JM. Bioactive Materials to Control Cell Cycle. *Mat Res Innovat* 2000; 3: 313-23.
- 8 - Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench L L, Polak JM. Gene Expression Profiling of Human Osteoblasts Following Treatment with the Ionic Products of Bioglass® 4555 Dissolution. *J Biomed Mater Res* 2001; 55: 151-7.
- 9 - Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Kushitani S, Iwaki H. Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *J Biomed Mater Res*. 1999; 44(1): 31-43.
- 10 - Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 1999; 20(23-24): 2287-303.
- 11 - Vallet-Regi M. Ceramics for medical applications. *J Chem Soc. Dalton Trans* 2001; 97-108.
- 12 - Cruz ACC, Pochapski MT, Daher JB, Silva JCZ, Pilatti GL, Santos FA. Physico-chemical characterization and biocompatibility evaluation of hydroxyapatites. *J Oral Sci*. 2006; 48(4): 219-26.
- 13 - Peitl Filho O, LaTorre GP, Hench LL. Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5. *J Biomed Mater Res* 1996; 30(4): 509-14.
- 14 - Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Beloti MM, Panzeri H, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate). *J Biomed Mater Res A*. 2007; 1;82(3): 545-57.
- 15 - FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Zanotto ED et al. Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments. *Int. C. C03C10/00*, 20 Feb. 2004, WO2004/074199.

- 16 - Fulmer MT, Ison IC, Hankermayer CR, Constantz BR, Ross J. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. *Biomaterials* 2002; 23(3): 751-5.
- 17 - Yang Y, Dennison D, Ong JL. Protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to hydroxyapatite of different crystallinities. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20(2): 187-92.
- 18 - Yoh R, Matsumoto T, Sasaki J, Sohmura T. Biomimetic fabrication of fibrin/apatite composite material. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 87(1): 222-8.
- 19 - Malard O, Bouler JM, Guicheux J, Heymann D, Pilet P, Coquard C, Daculsi G. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1999; 46(1): 103-11.
- 20 - Vollenweider M, Brunner TJ, Knecht S, Grass RN, Zehnder M, Imfeld T, Stark WJ. Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. *Acta Biomater* 2007; 3(6): 936-43.
- 21 - Xynos ID, Hukkanen MV, Batten JJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif Tissue Int* 2000; 67(4): 321-9.
- 22 - Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 24; 276(2): 461-5.
- 23 - Martin TJ, Udagawa N. Hormonal regulation of osteoclast function. *Trends Endocrinol Metab* 1998; 9(1): 6-12.



- 24 - Boyce BF, Xing L. Osteoclasts, no longer osteoblast slaves. *Nat Med* 2006; 12(12):1356-8.
- 25 - Arnett TR. Extracellular pH regulates bone cell function. *J Nutr* 2008; 138(2): 415S-418S.
- 26 - Arnett TR, Spowage M. Modulation of the resorptive activity of rat osteoclasts by small changes in extracellular pH near the physiological range. *Bone* 1996; 18(3): 277-9.
- 27 - Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008; 214(2): 199-210.
- 28 - Kuter DJ, Bain B, Mufti G, Bagg A, Hasserjian RP. Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *Br J Haematol* 2007; 139(3): 351-62.