



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

JOÃO PAULO TEIXEIRA MARTINS

**INTERAÇÃO DO HIDROGEL DE ÁLCOOL POLI VINÍLICO E SULFATO DE
CONDROITINA CONTENDO NANOESTRUTURAS DE HIDROXIAPATITA COM O
TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

MARINGÁ – PR

2016

JOÃO PAULO TEIXEIRA MARTINS

**INTERAÇÃO DO HIDROGEL DE ÁLCOOL POLI VINÍLICO E SULFATO DE
CONDROITINA CONTENDO NANOESTRUTURAS DE HIDROXIAPATITA COM O
TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

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

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

MARINGÁ – PR

2016

JOÃO PAULO TEIXEIRA MARTINS

**INTERAÇÃO DO HIDROGEL DE ÁLCOOL POLI VINÍLICO E SULFATO DE
CONDROITINA CONTENDO NANOESTRUTURAS DE HIDROXIAPATITA COM O
TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

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

Aprovado em 12 de Fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Luzmarina Hernandes (Orientador)

Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Eneri Vieira de Souza L. Mello

Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Vilmar Divanir Gottardo

Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR

Dedico este trabalho,

À minha mãe, professora dedicada que sempre procurou me ensinar os bons valores e a importância dos estudos na busca pelo desenvolvimento intelectual. Agradeço infinitamente os conselhos, os ensinamentos e até mesmo as broncas, fundamentais durante o meu aprendizado. Obrigado por não medir esforços para proporcionar o melhor para mim. Mesmo na distância física sei que me acompanha e orienta.

A Deus, por me dar a vida e guiar meus pensamentos, me colocando no caminho do bem e me amparando nos momentos difíceis.

A Prof^a. Dr^a. Luzmarina Hernandez, por ter aceitado me orientar nessa etapa tão importante da minha formação, não medindo esforços, independentemente do momento à qual fosse solicitada, em atender os meus pedidos, tirar minhas dúvidas, e até mesmo dar conselhos quanto às minhas escolhas. Serei eternamente grato pela dedicação que teve comigo e pela amizade construída nesses dois anos.

A Prof^a. Dr^a. Eneri Vieira de Souza Leite Mello, por fazer parte da banca examinadora, disponibilizando seu tempo e conhecimento para que meu trabalho pudesse ser enriquecido. Agradeço também a paciência e a boa vontade, estando sempre solícita nos momentos em que precisei.

Ao Prof. Dr. Vilmar Divanir Gottardo, por fazer parte da banca examinadora, enriquecendo meu trabalho. Agradeço a disponibilidade que nunca me foi negada e a amizade construída, sempre pronto para me atender, tirar dúvidas, e discutir a respeito do trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Thelma Sley Pacheco Cellet, que se tornou uma verdadeira amiga. Obrigado pela paciência, pelas inúmeras dúvidas em que me ajudou, pela disponibilidade e principalmente pela animação contagiante.

Aos Professores do Departamento de Odontologia, participando de minha formação desde o ano de 2007. Pessoas íntegras e compromissadas com a educação. Espero um dia chegar ao patamar profissional ao qual vocês pertencem.

Aos meus pais e irmãos, sempre me apoiando, proporcionando suporte e ensinando valores indispensáveis para uma vida digna. Agradeço todos os dias pela família que tenho. Apesar da distância e as dificuldades impostas pela vida, nos mantemos unidos.

A minha namorada Anna, por todos os momentos de força quando o que eu mais queria era desistir. Pelas palavras de incentivo e por sempre me apoiar nas minhas escolhas.

Aos colegas da turma de mestrado, pelo convívio, conhecimento compartilhado e pelas boas risadas.

Às técnicas Maria Euride Carlos Cancino, Maria dos Anjos Moreira Fortunato e Maria Ângela Moreira. Obrigado por todos os momentos de paciência, pelos ensinamentos laboratoriais, que não foram poucos, mas, sobretudo, por toda a preocupação que tiveram com a minha pesquisa. Vocês foram de uma importância enorme para que eu chegasse até aqui. Muito obrigado.

Por fim, agradeço a todos aqueles que me ajudaram, de forma direta ou indireta, fazendo com que esse trabalho se concretizasse. Muito obrigado.

“Tente mover o mundo - o primeiro passo será mover a si mesmo.”

Platão

INTERAÇÃO DO HIDROGEL DE ÁLCOOL POLI VINÍLICO E SULFATO DE CONDROITINA CONTENDO NANOESTRUTURAS DE HIDROXIAPATITA COM O TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS

RESUMO

Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais, formadas pela reticulação química ou física de um polímero hidrofílico. Estes materiais tem a capacidade de absorver grandes quantidades de água e apresentam propriedades estruturais e funcionais semelhantes às de muitos tecidos moles do organismo humano. Os hidrogéis tem atraído grande interesse na área biomédica, uma vez que estes materiais têm potencial aplicação como *scaffolds* na engenharia de tecidos moles e duros. A inserção de nanopartículas de hidroxiapatita na matriz dos hidrogéis pode auxiliar nas propriedades mecânicas bem como na bioatividade do material. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar a interação tecidual frente ao hidrogel composto por álcool poli-vinílico - sulfato de condroitina (PVA-SC) associado com nanopartículas de hidroxiapatita pura (HAp), constituindo o compósito PVA-SC-HAp. Foram utilizados ratos Wistar machos pesando de 200 a 250g. No tecido subcutâneo do dorso de cada animal foram inseridos bastões de 1,5 cm compostos por PVA-SC-HAp15 (15% de SC-HAp), PVA-SC-HAp20 (20% SC-HAp) e controles. Após 7, 15 e 30 dias amostras de pele contendo os bastões foram coletadas, fixadas em paraformaldeído 4% e processadas para inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina & Eosina, coloração de Azan-Mallory e imunocorados com anticorpo primário anti-osteocalcina. O compósito apresentou microporosidade que não favoreceu sua atuação como *scaffold*. Sua presença no tecido subcutâneo induziu uma resposta biológica, não inflamatória, caracterizada por aumento de vascularização e celularidade, com desenvolvimento de cápsula fibrosa em algumas áreas da circunferência dos bastões ou deposição de matriz acidófila, semelhante à matriz óssea. Este estudo demonstrou que o biomaterial apresentou morfologia heterogênea e microporosidade que interferiram na resposta biológica. O compósito foi biocompatível e apresentou atividade osteoindutora.

Palavras-chave: compósito, scaffold, biocompatibilidade, osteoindução osteogênese ectópica.

INTERACTION OF POLY (VINYL ALCOHOL) - CHONDROITIN SULFATE - NANOCRYSTALLINE HYDROXYAPATITE HYDROGEL WITH TISSUE OF RATS SUBCUTANEOUS

ABSTRACT

Hydrogels are three-dimensional polymeric network formed by chemical or physical cross-linking of a hydrophilic polymer. These materials have the ability to adsorb large quantities of water and exhibit structural and functional characteristics similar to those of many soft tissues of the human body. The hydrogels have attracted much interest in the biomedical field, since these materials have potential application as engineering scaffolds for soft and hard tissue. The insertion of hydroxyapatite nanoparticles in the matrix of the hydrogel may assist in the mechanical properties and bioactivity of the material. So the aim of this study was to evaluate the tissue interaction of a hydrogel composed of poly (vinyl alcohol) - chondroitin sulfate (PVA-SC) associated with nanoparticles of pure hydroxyapatite (HAp), constituting the composite PVA-SC-HAp. Male Wistar rats weighing 200 to 250g were used in the experiment. In the dorsum of each animal were inserted 1.5 cm rods comprise of PVA-SC-HAp15 (15% SC-HAp), PVA-SC-HAp20 (20% SC-HAp) and controls. After 7, 15 and 30 days skin samples containing bats were collected, fixed in 4% paraformaldehyde and processed for paraffin embedding. The histological sections were stained with hematoxylin & eosin, staining Azan-Mallory and immunostained with anti-osteocalcin primary antibody. The composite showed microporosity that did not favor its role as scaffold. It's presence in the subcutaneous tissue induced a biological response, non-inflammatory, characterized by increased vascularity and cellularity, with development of fibrous capsule in some areas of the circumference of bats or deposition of Acidophile matrix, similar to bone matrix. This study demonstrated that the biomaterial showed heterogeneous morphology and microporosity that interfered in the biological response. The composite was biocompatible and showed osteoinductive activity.

Key-words: composite, scaffold, biocompatibility, osteoinduction, ectopic osteogenesis.

SUMÁRIO

1. SIGLAS E ABREVIATURAS.....	10
2. INTRODUÇÃO.....	11
3. OBJETIVOS.....	13
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
4.1. HIDROGÉIS COMO BIOMATERIAIS.....	14
4.2. ÁLCOOL POLI VINÍLICO – SULFATO DE CONDROITINA – HIDROXIAPATITA.....	15
4.3. TECIDO SUBCUTÂNEO.....	16
4.4. TECIDO ÓSSEO.....	18
4.5. OSTEOCALCINA.....	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
5.1. SÍNTESE DOS HIDROGÉIS.....	21
5.2. PROCEDIMENTOS.....	21
5.3. EXPERIMENTO COM ANIMAIS.....	23
5.4. ESTUDO HISTOLÓGICO.....	25
6. RESULTADOS.....	28
6.1. ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS MATERIAS.....	28
6.2. AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS.....	30
6.3. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	31
6.3.1. AVALIAÇÃO AOS 7 DIAS.....	31
6.3.2. AVALIAÇÃO AOS 15 DIAS.....	31
6.3.3. AVALIAÇÃO AOS 30 DIAS.....	32
6.3.4. ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO.....	32
7. DISCUSSÃO.....	37
8. CONCLUSÃO.....	41
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
10. ANEXOS.....	49
10.1. PROTOCOLO PARA INCLUSÃO EM PARAFINA.....	49
10.2. PROTOCOLO COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA.....	49
10.3. PROTOCOLO COLORAÇÃO AZAN-MALLORY.....	50
10.4. PROTOCOLO IMUNO-HISTOQUÍMICA PADRÃO.....	51
10.5. PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL.....	53

1 – SIGLAS E ABREVIATURAS

BGP	Bone gla protein
β -TCP	β – tricálcio – fosfato
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
DCM	Departamento de Ciências Morfológicas
DRX	Difração de raios-X
EDS	Espectroscopia por dispersão de energia
FTIR-KBr	Espectrometria de infravermelho utilizando pastilhas de brometo de potássio
GA	Glutaraldeído
GAG	Glicosaminoglicano
GalNAc	N-acetil-D-galactosamina
GlcA	Ácido glucurônico
HAp	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina-eosina
HCl	Ácido clorídrico
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
n-HAp	Hidroxiapatita nanométrica
PBS	Tampão fosfato de sódio
PVA	Álcool poli vinílico
PVA-SC	Álcool poli vinílico – sulfato de condroitina
PVA-SC-HAp	Álcool poli vinílico – sulfato de condroitina – hidroxiapatita
RMN CP/MAS ¹³ C	Polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico
SC	Sulfato de condroitina

2 - INTRODUÇÃO

O progresso no desenvolvimento de materiais para a reabilitação de tecidos perdidos, indispensáveis na área da saúde, tem sido crescente (Mastrogiacomo *et al.*, 2006). O avanço na engenharia tecidual é hoje fundamental para o exercício da medicina regenerativa e o mercado potencial de produtos desenvolvidos por ela é estimado em cerca de 100 bilhões de dólares por ano. A área de biomateriais é responsável por desenvolver próteses, lentes, enxertos, *stents*, cateteres, tubos de circulação extracorpórea, *scaffolds* entre outros materiais (Soares e Nassi, 2005).

O arcabouço (inglês: *scaffold*), representa um tipo de biomaterial poroso, com estrutura tridimensional, que pode ser carregado com células vivas específicas e/ou com fatores de indução ao crescimento, como citocinas, com o intuito de proporcionar regeneração do tecido ou substituição do mesmo, de forma natural (Naderi *et al.*, 2014; Spiller *et al.*, 2011). A interação entre a célula e a superfície do substrato é consideravelmente complexa, no entanto o comportamento das células é fortemente afetado pela composição química e topografia dos materiais (Senaratne *et al.*, 2005; Kieswetter *et al.*, 1996). Apesar do uso generalizado de materiais em engenharia de tecidos, ainda não existe o biomaterial “padrão-ouro” que estabeleça uma perfeita interface com todos os sistemas biológicos. Assim, há uma crescente necessidade de desenvolvimento de novos materiais. A grande vantagem dos polímeros ainda está relacionada ao custo do material final e à sua facilidade de produção.

Hidrogéis são redes poliméricas altamente hidratadas que tem sido utilizadas como *scaffolds*, visto que geralmente apresentam boa biocompatibilidade, elasticidade, boa permeabilidade aos nutrientes e produtos das células, facilidade de modificação química além de apresentarem capacidade de sofrer geleificação *in situ*, que significa que material é formado por reação química de forma instantânea (Naderi *et al.*, 2014; Spiller *et al.*, 2011).

Um bio-polímero que pode ser utilizado para sintetizar hidrogéis é o sulfato de condroitina (SC), um glicosaminoglicano (GAG) composto por unidades alternadas de β (1,4) – D - ácido glucurônico (GlcA) e β (1,3) - N - acetil - D - galactosamina (GalNAc) (Pachua e Mazumder, 2013; Vázquez *et al.*, 2013). Este GAG é encontrado tanto em vertebrados como em invertebrados, distribuído nas matrizes extracelulares de tecidos e cartilagens conferindo desejáveis propriedades mecânicas para as mesmas. Cadeias de SC estão envolvidas em inúmeros processos biológicos, incluindo o desenvolvimento do sistema nervoso central, transdução de sinal, morfogênese, cicatrização de feridas, infecções virais e bacterianas (Onishi *et al.*, 2013; Schiraldi *et al.*, 2010).

Um dos grandes problemas encontrados na utilização do SC como *scaffold* em meios fisiológicos é a sua alta solubilidade em água, o que o torna incapaz de atuar como arcabouço de sustentação. Entretanto, o processo de reticulação das cadeias de SC com outros polímeros,

como o álcool poli-vinílico (*poly vinyl alcohol – PVA*), diminui sua solubilidade. O PVA também pode ser utilizado como *scaffold*. Tem sido empregado em cartilagem artificial, no crescimento ósseo e em válvulas cardíacas (Lee e Mooney, 2001). Apresenta a vantagem de ser biocompatível e possuir propriedades mecânicas adequadas, entretanto tem a desvantagem de apresentar baixa adesão celular devido a sua hidrofília acentuada (Schmedlen *et al.*, 2002). Sua associação com o SC possibilita a formação de um compósito que contem as características desejadas de ambos os materiais (Lee *et al.*, 2005).

Muitos esforços têm sido voltados para o desenvolvimento de materiais compostos por uma cerâmica e um polímero híbrido, no qual as partículas de cerâmica bioativas são incorporadas nas matrizes de polímeros biodegradáveis. Os materiais à base de fosfato de cálcio, especialmente a hidroxiapatita (HAp), são os mais empregados para substituir enxertos autógenos em cirurgias ortopédicas e odontológicas (Oonishi *et al.*, 1997). A HAp sintética é biocompatível, não é carcinogênica e nem alergênica (Oonishi *et al.*, 1997), além de promover osteoindução (Kurashina *et al.*, 2002). Recentemente um compósito, na forma de hidrogel, composto por PVA-SC-HAp foi desenvolvido para atuar como um *scaffold* (Cellet *et al.*, 2015). Não há estudos avaliando a biocompatibilidade e a bioatividade deste compósito. Desta forma, considerando a importância do desenvolvimento dos biomateriais e a inexistência de estudos com o compósito PVA-SC-HAp, o objetivo deste trabalho foi avaliar a potencial capacidade do compósito PVA-SC-HAp atuar como *scaffold* e verificar sua biocompatibilidade e bioatividade, *in vivo*, quando implantado no tecido subcutâneo, em ratos.

3 - OBJETIVOS

Objetivo geral:

- O objetivo deste trabalho foi avaliar a potencial capacidade do compósito PVA-SC-HAp atuar como *scaffold* e verificar sua biocompatibilidade e bioatividade, *in vivo*, quando implantado no tecido subcutâneo, em ratos.

Objetivos específicos:

- Avaliar sob microscópio óptico a estrutura do compósito PVA-SC-HAp, com 15 ou 20% de SC-HAp, construídos na forma de bastão;
- Avaliar, *in vivo*, por meio de estudo histológico e imunohistoquímico as reações teciduais do compósito PVA-SC-HAp com 15 ou 20% de SC-HAp, em tecido subcutâneo de ratos, a fim de avaliar sua biocompatibilidade e bioatividade;
- Comparar os resultados obtidos com as amostras controles compostas de PVA-SC e HAp em pó.

4.1. HIDROGÉIS COMO BIOMATERIAIS

Hidrogéis são polímeros altamente hidratados formados por ligações químicas ou físicas. Constituem materiais potenciais para aplicação biomédica devido a suas características, principalmente a de absorverem grandes quantidades de água. Com propriedades estruturais e funcionais semelhantes às de muitos tecidos moles do organismo humano, eles têm atraído grande interesse na área biomédica, demonstrando potenciais aplicações como *scaffolds* na engenharia para tecidos moles e duros (Vashist *et al.*, 2014).

Recentemente, hidrogéis à base de polímeros naturais tem recebido mais atenção na área médica do que aqueles à base de polímeros sintéticos, muitas vezes em razão do comportamento biocompatível e biodegradável dos polímeros naturais (Swethaa *et al.* 2010). Os materiais à base de polímeros naturais incluem polissacarídeos (amido, alginato, quitina/quitosana, sulfato de condroitina) ou proteínas (colágeno, fibrina, seda) e uma variedade de biofibras, tais como as celuloses (Rezwan *et al.*, 2006). Polímeros naturais, muitas vezes possuem estruturas altamente organizadas que podem orientar as células a se desenvolverem e ainda estimular uma resposta imune simultaneamente (Cheung *et al.*, 2007).

A “National Institutes of Health Consensus Development Conference” definiu biomaterial como qualquer substância (que não seja uma droga) ou combinação de substâncias, sintéticas ou de origem natural, que possam ser utilizadas por qualquer período de tempo, como um todo ou como parte de um sistema, tratando, aumentando, ou substituindo qualquer tecido, órgão ou função do corpo (ANVISA, 2012).

A área referente à engenharia tecidual consiste de três partes fundamentais: células, fatores de crescimento e *scaffolds*. Esses últimos, também chamados de arcabouços para formação tecidual, compreendem os hidrogéis. As características de um bom material para funcionar como arcabouço de formação devem ser: excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade controlável, cito-compatibilidade, microestrutura adequada (tamanho dos poros e porosidade total) e propriedades mecânicas satisfatórias (Madhally e Matthew, 1999).

A porosidade dos *scaffolds* é um importante fator no processo de reparo tecidual, em especial na reparação do tecido ósseo, pois o tamanho do poro permite a migração celular e vascular para dentro do material. Tipicamente, um tamanho de poro entre 50-500 µm é

necessário para a penetração de células do tecido para dentro do implante (Tarafder *et al.*, 2013).

4.2. ALCOOL POLI VINÍLICO – SULFATO DE CONDROITINA – HIDROXIAPATITA

O álcool poli-vinílico (PVA) tem sido investigado como *scaffold* para aplicação em cartilagem artificial, no pâncreas, em ossos e em válvulas cardíacas (Lee e Mooney, 2001). A vantagem da utilização de PVA como *scaffold* na engenharia de tecidos inclui boa biocompatibilidade e propriedades mecânicas adequadas. No entanto, como PVA é altamente hidrofílico, apresentando baixa adesão celular (Schmedlen *et al.*, 2002).

O sulfato de condroitina (SC) pertence à classe de polissacarídeos complexos naturais chamados glicosaminoglicanos (GAGs) e é uma complexa macromolécula não ramificada extraída e purificada a partir de vários tecidos. É composto por sequências alternadas de dissacarídeos. Dependendo da natureza do dissacarídeo, diferentes tipos de SC são conhecidos. Além disso, o número de unidades de dissacarídeos que formam o polímero de SC é outro fator determinante para a atividade biológica e farmacológica do mesmo. Como consequência, SC representa uma ampla família heterogênea de polissacarídeos, que variam de acordo com o grau de sulfatação, com a massa molecular, quantidades de ácido glucurônico e com a origem do tecido. (Bauerova *et al.*, 2011).

Lee e colaboradores, 2005, desenvolveram, caracterizaram e testaram *in vitro* um hidrogel a base de poli (álcool vinílico) e sulfato de condroitina. A escolha desses componentes para a formação do hidrogel deveu-se ao PVA ter boa biocompatibilidade e força mecânica, já a escolha do SC por apresentar efeito anti-inflamatório em modelos animais e características de interação com proteínas relativas à adesão celular. Os testes físico-químicos realizados foram ensaio de intumescimento, teste mecânico para verificar o módulo de elasticidade, verificação da quantidade de sulfato de condroitina no compósito e análise espectrofotométrica. Em relação à cultura celular, foram utilizadas células do tipo BHK (Baby-Hamster-Kidney) e os quesitos avaliados foram número de células e morfologia. Após verificação dos resultados os autores chegaram à conclusão de que os hidrogéis de PVA-SC, sintetizados através de glutaraldeído possuíam as vantagens de ambos os componentes PVA e SC (Lee *et al.*, 2005).

Em estudo realizado *in vitro*, Venkatesan e colaboradores, 2012, avaliaram a proliferação celular em quatro tipos diferentes de *scaffolds* desenvolvidos, sendo eles: quitosana, quitosana - hidroxiapatita, quitosana - sulfato de condroitina - hidroxiapatita, quitosana – amilopectina - hidroxiapatita. As células utilizadas no estudo eram do tipo MG-63 (citadas pelo autor como osteoblastos). O grupo que obteve um maior escore em relação à

proliferação celular foi o composto que apresentava sulfato de condroitina em sua composição. Ainda em uma parte do mesmo estudo, porém realizada *in vivo*, os resultados sugeriram que a adição de sulfato de condroitina juntamente com colágeno e hidroxiapatita levou a um aumento da remodelação óssea, aumento da formação óssea e aumento da diferenciação celular em osteoblastos (Venkatesan *et al.*, 2012).

A hidroxiapatita é uma cerâmica bioativa formada por fosfato de cálcio cristalino ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e representa um depósito de 99% do cálcio corporal e 80% do fósforo total. Sua utilização em pesquisas relativas à área de biomateriais têm sido de grande interesse por parte dos pesquisadores, uma vez que os resultados obtidos com o material parecem ser promissores. Cerâmicas de fosfato de cálcio são amplamente utilizadas como substitutos ósseos. Quando implantadas em defeitos ósseos, são degradadas por processos químicos e biológicos e, em seguida, substituídas por osso neoformado. Algumas cerâmicas de fosfato de cálcio induzem a formação de osso em locais ectópicos, sem quaisquer agentes osteogênicos adicionais ao material. Este fenômeno é chamado de "osteoindução", e a capacidade de osteoindução é chamada de "osteointutividade" ou "potencial osteoindutor. Osteoindução induzida pelo material foi observada principalmente em animais de grande porte, como cães, ovelhas, suínos, e babuínos, e com menos frequência, em roedores (Tsukanaka *et al.*, 2015).

A hidroxiapatita (HAp) é o componente bioativo mais comumente usado para aumentar as propriedades de osseointegração. Além disso, permite aos biopolímeros reabsorvíveis a possibilidade de serem utilizados como matrizes para a regeneração de defeitos ósseos (Persson *et al.*, 2014).

Em estudo publicado em 2006, Duarte e colaboradores realizaram enxertos de hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães para avaliar o comportamento do material num período de até 120 dias. Vinte e oito cães adultos pesando entre 10 e 15 kg foram utilizados. Operou-se um dos lados dos animais deixando o outro como controle para eventual comparação. Os resultados obtidos mostraram uma intensa vascularização entre as partículas do material, além da formação de osso e intensa migração de osteoblastos. A biocompatibilidade da hidroxiapatita permitiu a sua integração com o processo alveolar por meio da formação direta de osso lamelar, sendo também verificada a degradação da hidroxiapatita à medida que a neoformação óssea foi ocorrendo (Duarte *et al.*, 2006).

4.3. TECIDO SUBCUTÂNEO

A hipoderme ou tecido celular subcutâneo é uma camada de tecido conjuntivo frouxo localizada abaixo da derme, a camada profunda da pele, unindo-a de maneira pouco

firme aos órgãos adjacentes. A depender do estado nutricional e da região do corpo, a hipoderme pode conter uma quantidade variável de tecido adiposo. A hipoderme constitui órgão interior e não pode ser considerada parte da pele (Junqueira e Carneiro, 2013).

Também chamado de sistema tegumentar, trata-se de um conjunto de estruturas que formam o revestimento externo dos seres vivos. Esse revestimento externo é chamado de tegumento ou integumento, e nos vertebrados também é chamado de pele. As estruturas que formam o sistema tegumentar são: células, tecido conjuntivo, pelos, escamas, penas, unhas, chifres entre outros). O tecido subcutâneo é composto por faixas fibrosas de ancoragem da pele para o fáscia profunda, colágeno e elastina (Junqueira e Carneiro, 2013).

Em sua maioria, as células presentes no tecido subcutâneo são os fibroblastos. O fibroblasto é a célula constituinte do tecido conjuntivo e sua função é formar a substância fundamental amorfa. Tem um citoplasma ramificado e rodeado de um núcleo elíptico contendo 1-2 nucléolos. Os fibroblastos ativos podem ser reconhecidos pela abundante ocorrência de retículo endoplasmático. Amadurece, transformando-se em fibrócito. É responsável pela biossíntese de colágeno do tipo 1. Produz substância intercelular e origina células de outros tecidos conjuntivos, são responsáveis pela regeneração. Os fibroblastos sintetizam as proteínas colágeno e elastina, além das glicosaminoglicanas e glicoproteínas multi-adesivas que farão parte da matriz extracelular. Essas células estão também envolvidas na produção de fatores de crescimento, que controlam o crescimento e a diferenciação celular. Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e são capazes de modular sua capacidade metabólica, a qual vai refletir em sua morfologia. As células com intensa atividade de síntese são denominadas de fibroblastos, enquanto as células metabolicamente quiescentes são conhecidas como fibrócitos (Junqueira e Carneiro, 2013).

Os modelos de estudo para biomateriais visando testar características como biocompatibilidade, potencial osteoindutor, vascularização, formação de cápsula fibrosa, presença de infiltrado inflamatório entre outras, são variados, podendo ser realizados em diferentes sítios quando trabalhamos com modelos animais. Um desses sítios pode ser o tecido subcutâneo, onde a possibilidade de formação de tecido ósseo (ectópico), ou seja, fora da localidade habitual, pode significar um potencial osteoindutivo inerente ao material. Por definição, osteoindução é um termo referente à transformação de células mesenquimais indiferenciadas perivasculares em células formadoras de osso na presença de substâncias/materiais em um ambiente favorável (Gao *et al.*, 2006).

Brito e colaboradores em pesquisa realizada em 2009, avaliaram a biocompatibilidade de membranas de quitosana implantadas em tecido subcutâneo de ratos. Através de incisões realizadas no dorso dos animais foram implantadas membranas feitas a partir de quitosana e as mesmas coletadas num período de até 60 dias. Os materiais foram submetidos à avaliação

histológica e morfométrica e os resultados obtidos serviram para definir o grau de tolerabilidade ao material pelo organismo dos animais (Brito *et al.*, 2009).

Tsukanaka e colaboradores, em artigo publicado em 2015, testaram o potencial osteoindutivo do material β -TCP altamente purificado implantado no tecido subcutâneo de duas espécies de ratos, com duas porosidades diferentes (60 e 75%). O modelo de estudo utilizado pelos autores mostrou-se efetivo em relação à avaliação da formação de osso em sítio ectópico, formação vascular nos poros do material implantado, além da avaliação da proliferação celular no interior do implante (Tsukanaka *et al.*, 2015).

Ainda a respeito de osteoindução em tecido subcutâneo, Barradas e colaboradores em 2012 desenvolveram um estudo para verificar este processo em diferentes linhagens de ratos. Para isso blocos cerâmicos contendo β -TCP foram implantadas no tecido subcutâneo de animais com 6 e 7 semanas de idade. Blocos cerâmicos foram então inseridos nas bolsas. Após sacrifício dos animais a pele foi imediatamente aberta e os blocos cerâmicos (implantes) coletados. Os resultados mostraram que todos os tipos de linhagens de ratos testadas apresentaram osso no tecido subcutâneo dos animais, além disso, demonstraram a eficácia da formação óssea induzida pelo β -TCP e a potencialidade dessa formação, dependente de fatores genéticos (Barradas *et al.*, 2012).

4.4. TECIDO ÓSSEO

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

Além de atuar como o maior depósito de cálcio e fosfato do corpo humano, os ossos exercem funções muito importantes no organismo, como alojar e proteger órgãos vitais, fornecer suporte estrutural para os músculos esqueléticos e ampliar a força de contração dos mesmos, funcionando como um complexo sistema de alavancas (Junqueira e Carneiro, 2013).

Como todo tecido conjuntivo, é subdividido em uma matriz composta por proteínas e íons, e diversos tipos celulares (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) que atuam na remodelação e síntese do novo tecido ósseo (Titorencu *et al.*, 2014). Os componentes do osso possuem estrutura na forma de nanocompósitos orgânicos e inorgânicos entrelaçadas em uma matriz 3D, em que a hidroxiapatita nanocristalina e fibrilas de colágeno se encontram bem organizados, com uma arquitetura contendo diversas escalas de comprimento, incluindo a nano escala (Naderi *et al.*, 2014).

No campo da histologia, dois tipos de tecido ósseo são conhecidos: imaturo ou primário, e o maduro, também chamado de secundário ou lamelar. Possuindo os mesmos tipos celulares e uma matriz de constituintes semelhantes, o que os diferencia é a orientação das fibras colágenas,

estando essas no tecido ósseo imaturo dispostas irregularmente, e no tecido maduro, organizadas em forma de lamelas. Outra diferença encontrada é que o tecido ósseo imaturo apresenta uma menor quantidade de minerais e maiores proporções de osteócitos em relação ao osso lamelar, que por sua vez, possui fibras colágenas organizadas em lamelas de três a sete micrômetros de espessura, que ou ficam paralelas umas às outras, ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando o sistema de Havers ou ósteons (Junqueira e Carneiro, 2013).

A formação de tecido ósseo, também chamada de ossificação ou osteogênese pode ocorrer de duas formas: ossificação intramembranosa, também chamada de endoconjuntiva e ossificação endocondral (Pretto e Pagnoncelli, 2005).

Tanto a ossificação intramembranosa quanto a endocondral ocorrem próximas a áreas de crescimento vascular. No caso da intramembranosa, o que ocorre é uma invasão de capilares nas zonas mesenquimais e posterior diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos maduros. Estes, por sua vez, iniciam um processo de deposição de matriz óssea que leva a formação de espículas de tecido ósseo. Essas espículas crescem e se desenvolvem, por vezes unindo-se umas às outras, formando então trabéculas ósseas. A união das trabéculas, devido ao seu aumento em número e tamanho, forma o tecido ósseo desorganizado, caracterizado por apresentar grande quantidade de osteócitos (Junqueira e Carneiro, 2013; Kanczler e Oreffo, 2008).

A formação e o crescimento do esqueleto ósseo são guiados pelas propriedades funcionais dos ossos e cartilagens (Kanczler e Oreffo, 2008). No caso da ossificação endocondral, este processo tem início sobre uma peça de cartilagem hialina e é responsável pela formação de ossos longos e curtos. É dividido basicamente em dois processos: primeiramente, a cartilagem hialina sofre modificações, ocorrendo hipertrofia dos condrócitos, redução da matriz cartilaginosa a finos tabiques, mineralização da matriz e apoptose dos condrócitos. Após a ocorrência desse fato, vasos sanguíneos e células osteogênicas vindas do conjuntivo adjacente invadem os locais antes ocupados pelos condrócitos. As células que vieram do conjuntivo se diferenciam em osteoblastos e posteriormente começam a secretar matriz óssea sobre os tabiques de cartilagem calcificados (Junqueira e Carneiro, 2013).

Durante todo o processo de reparação óssea a angiogênese desempenha um papel fundamental, pois os vasos sanguíneos atuam fornecendo oxigênio, nutrientes, hormônios, citocinas, bem como células precursoras de osteoblastos e osteoclastos (Kanczler e Oreffo, 2008).

4.5. OSTEOCALCINA

Uma forma de verificarmos a presença de atividade osteogênica próxima a determinado material é através da imunocoloração. Dentro dessa abordagem, marcadores químicos para determinadas proteínas celulares podem ser utilizados. A proteína osteocalcina, também chamada de *Bone Gla Protein* (BGP), é a mais abundante das proteínas não colagenosas do osso, constituída por uma única cadeia de 46 - 50 aminoácidos (Chenu *et al.*, 1994) produzida por osteoblastos (Chenu *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2009), condrócitos hipertrofiados e odontoblastos (Vieira, 1999). Esta proteína é depositada na matriz, onde atua como um sinal específico para migração e adesão de osteoclastos, indicando reparo ósseo (Chenu *et al.*, 1994; Vieira, 1999).

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

5.1. SÍNTESE DOS HIDROGÉIS

A obtenção das nanopartículas de hidroxiapatita, bem como a síntese de hidrogéis de sulfato de condroitina reticulados com álcool poli-vinílico (PVA-SC) formando o composto utilizado nesse estudo (PVA-SC-HAp) foram desenvolvidos no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá pela Dr^a. Thelma Sley Pacheco Cellet em um projeto coordenado pelo professor Adley Forti Rubira.

Para a obtenção dos bastões foram usados os seguintes materiais: Ácido clorídrico, Ácido fosfórico, Glutaraldeído, Hidróxido de Cálcio, Iodo, Poli (álcool vinílico) (Mw 13.000-23.000), Sulfato de Condroitina, lote B5B234-B.01, fornecido por Solabiá - Maringá/BR (Mv=22 x 10³ g.mol⁻¹), tampão fosfato pH 7,4.

5.2. PROCEDIMENTOS

Síntese de nanopartículas de hidroxiapatita na superfície do sulfato de condroitina (SC-HAp)

Para a síntese das nanopartículas de hidroxiapatita (n-HAp) na superfície do SC, foi utilizada uma razão de 60 % SC e 40 % de n-HAp. Inicialmente foi preparada 39 mL de uma solução de ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,7 mol.L⁻¹ contendo 4 gramas de SC. Esta mistura foi levada à agitação até garantir total solubilidade do SC. Separadamente foi preparada uma solução de hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] de concentração 0,45 mol.L⁻¹. Esta suspensão foi agitada vigorosamente e aquecida a 37 °C. Posteriormente, a solução de H₃PO₄ e SC foi adicionada vagarosamente a 100 mL da solução de Ca(OH)₂, até atingir pH 9. O tempo de reação foi de 24 horas a 37 °C. O precipitado formado foi filtrado e posteriormente seco a temperatura ambiente. O material obtido foi caracterizado por FTIR-KBr, DRX, EDS e morfologicamente por MET (Cellet *et al.*, 2015).

Síntese do hidrogél de álcool poli-vinílico e sulfato de condroitina contendo nanoestruturas de hidroxiapatita (PVA-SC-HAp)

Inicialmente foram preparadas duas soluções aquosas diferentes, uma contendo 18% (massa/volume) de PVA e outra contendo 20% (massa/volume) de SC-HAp. Em seguida as

duas soluções foram misturadas como descrito na Tabela 1. Para esse estudo foram preparadas duas soluções com diferentes percentagens em peso de SC-HAp (15% e 20%). Uma solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) a 5% foi adicionado a estas soluções, que foram agitadas durante 1 hora. A seguir, 25% em massa de glutaraldeído foi adicionado, sendo as soluções posteriormente vertidas em discos de teflon e caracterizadas através de testes físico-químicos. Para confecção do material utilizado no estudo com os animais, ao invés das soluções serem vertidas em discos de teflon, essas foram inseridas em um dispositivo de infusão intravenosa (escalpe) com diâmetro externo de 2,3mm.

Soluções	SC-HAp	SC-HAp
	15	20
PVA 18% (g)	8,97	8,44
SC-HAp 20% (g)	1,58	2,11
HCl 5% (g)	0,28	0,28
GA 25% (g)	0,28	0,28

Tabela1. Composição em massa dos hidrogéisSC-PVA-HAp.

Os hidrogéis foram formados após uma reação de reticulação durante 12 horas a temperatura ambiente. Foram então imersos em tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,4 por 48 horas para a remoção de qualquer tipo de resíduo que não reagiu. Os hidrogéis foram então secos por 24 horas a temperatura ambiente sob pressão reduzida. Após a secagem, os géis de PVA-SC-HAp foram armazenados em dessecador até serem caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas. Testes realizados: FTIR-ATR, DRX, EDS, RMN CP/MAS ¹³C e MEV (Cellet, 2015).

Os compósitos foram desenvolvidos para apresentar uma estrutura de arcabouço. O compósito PVA-SC-HAp15 continha poros na ordem de 2µm e o compósito PVA-SC-HAp20 na ordem de 300nm.

Hidrogéis de poli (álcool vinílico) e sulfato de condroitina (PVA-SC) sem a presença de hidroxiapatita também foram sintetizados nas mesmas proporções apresentadas na Tabela 1, com o intuito de serem utilizados para comparação com o novo composto.

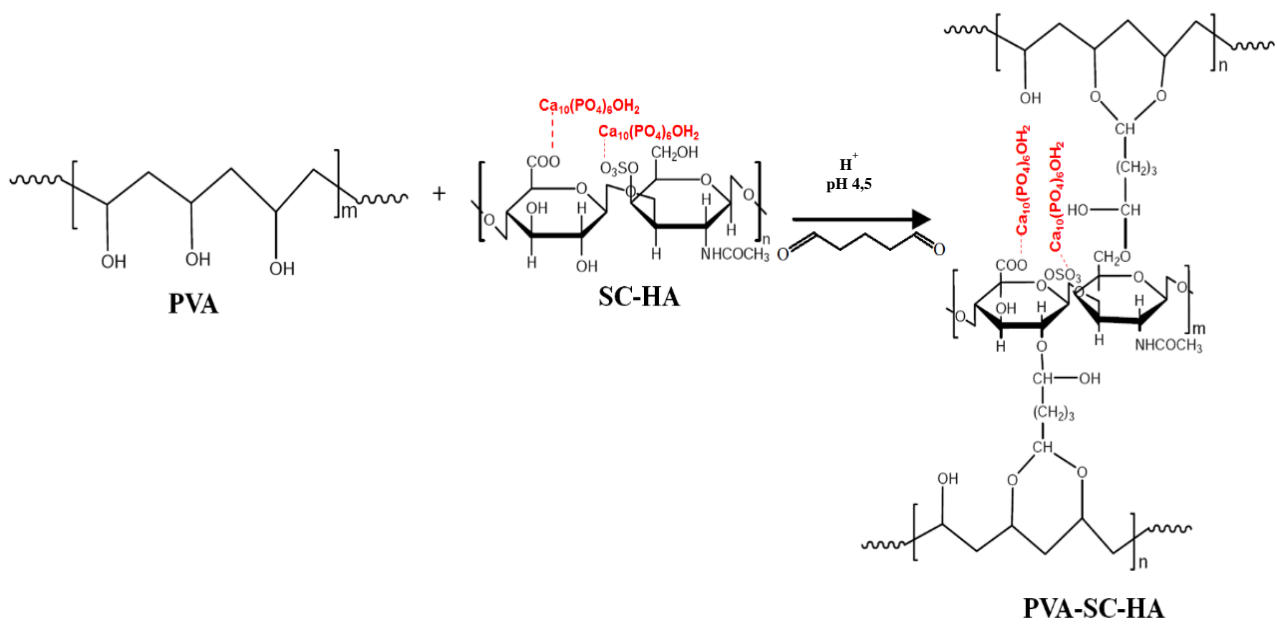


Figura 1- Reação de reticulação utilizando glutaraldeído para obtenção dos hidrogéis de PVA-SC-HA.

5.3. EXPERIMENTO COM ANIMAIS

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, sob parecer nº 137/2014, e foram realizados no laboratório de histotécnica do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM) da instituição.

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*) machos, com 90 dias de idade, com peso corporal entre 200 e 250g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram divididos em três grupos de acordo com o tempo de avaliação: grupo 7 dias, grupo 15 dias e grupo 30 dias. Cada animal recebeu quatro tipos de materiais, sendo: HAp (pura), PVA-SC-Hap15, PVA-SC-Hap20 e PVA-SC. Os materiais, na forma de bastões, foram implantados no tecido subcutâneo na região dorsal dos animais. Todos os materiais utilizados nesta etapa foram esterilizados utilizando óxido de etileno.

Para os procedimentos operatórios, os animais foram anestesiados por via intramuscular com uma associação 1:1 de xilazina (0,1ml/100g) e ketamina (0,1ml/100g). Após epilação da região dorsal (realizada com uma semana de antecedência ao procedimento cirúrgico para evitar estresse demasiado aos animais e uma possível inflamação cutânea indesejada durante a

cirurgia) e anti-sepsia com iodo tópico foram realizadas quatro incisões transversais na pele, sendo duas cefálicas e duas caudais, até atingir o tecido subcutâneo. Os materiais na forma de bastões de 1,5 cm de comprimento e 0,71mm de diâmetro foram completamente introduzidos pela abertura da incisão que foi então suturada com pontos contínuos de Mononylon 4-0 (Ethicon® Johnson, USA, um ponto por incisão). A região recebeu aplicação tópica da solução alcoólica de poli (vinil pirrolidona) iodada como medida anti-séptica local.

As quatro incisões na pele de cada animal receberam os seguintes materiais:

- Incisão cefálica lado esquerdo: Bastão composto por PVA-SC (poli (álcool vinílico) – sulfato de condroitina);
- Incisão cefálica lado direito: Bastão de PVA-SC-HAp15 (poli (álcoolvinílico) – sulfato de condroitina – hidroxiapatita15%);
- Incisão caudal lado esquerdo: Bastão contendo HAp (Hidroxiapatita na forma de pó, envolta por uma cânula plástica proveniente do envoltório de cateteres intravenosos – marca SOLIDOR® registro ANVISA: 10237580028 diâmetro externo de 1,1mm e interno de 0,7mm).
- Incisão caudal lado direito: Bastão de PVA-SC-HAp20 (poli (álcoolvinílico) – sulfato de condroitina - hidroxiapatita 20%).

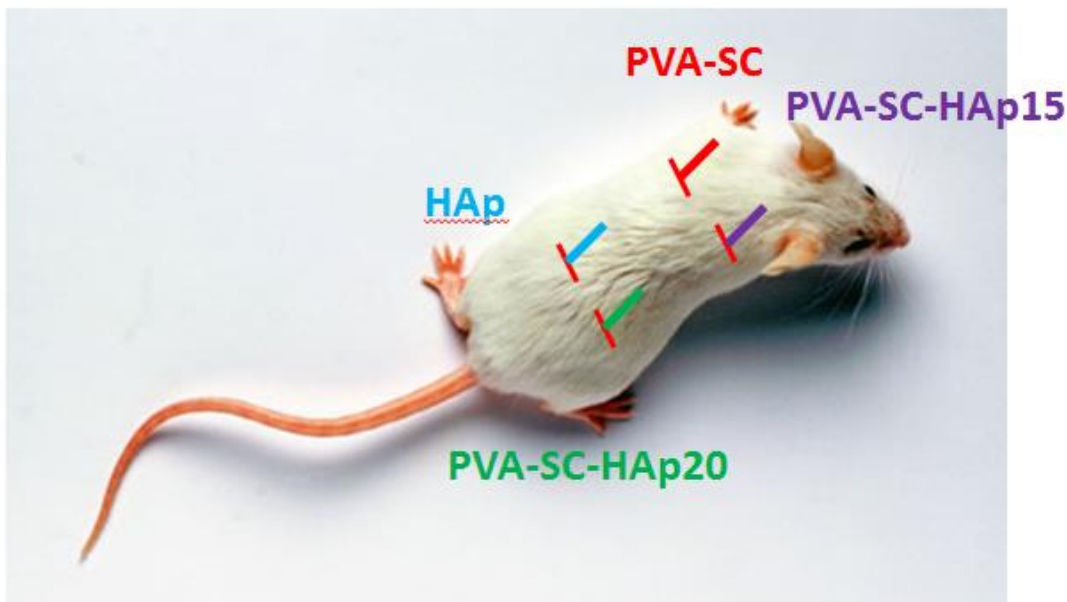


Figura 2. Esquema da disposição dos materiais inseridos no animal.

Os animais foram observados no período inicial da recuperação anestésica e em seguida mantidos em gaiolas individuais em condições ambientais apropriadas, ciclo claro/escuro de 12/12 horas e temperatura de 20°C, com ração e água *ad libitum*. No decorrer do período experimental foi realizada avaliação clínica, para que se observasse qualquer alteração nos locais onde foram realizadas as cirurgias.

Após 7, 15 e 30 dias (n=5 animais/tempo), foram realizadas as eutanásias por meio da infiltração do triplo da dose anestésica da associação 1:1 de xilazina (0,1ml/100g) e ketamina (0,1ml/100g). No momento da coleta do material foi avaliada clinicamente qualquer alteração onde os bastões foram instalados. Os segmentos de pele, juntamente com tecido subcutâneo contendo os implantes foram então removidos, distendidos em papel cartão e fixados em solução de paraformaldeído a 4% por 24h.

5.4 ESTUDO HISTOLÓGICO

Após a fixação, o material foi processado para inclusão em parafina. Foram feitos cortes semi-seriados de 6µm no sentido transversal dos bastões. No caso do bastão contendo HAp (hidroxiapatita), devido ao fato do material estar envolto por uma cânula plástica, procurou-se selecionar os cortes provenientes da extremidade do bastão, para que se fosse avaliado o material extravasado (hidroxiapatita em pó) em contato direto com o tecido. As

lâminas contendo os cortes histológicos foram coradas com H&E, pela técnica de Azan-Mallory e imunocoloração com marcador anti-osteocalcina para estudo histológico (Anticorpo para Osteocalcina, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA; diluição utilizada 1:50).

Estudo histológico: (n=5 animais/ grupo/ tempo de observação).

Unidade observacional: bastão + tecido

Cortes semi-seriados de 6µm analisados como segue:

Microscopia de luz:

- Avaliação das características morfológicas de cada material;
- Avaliação do infiltrado inflamatório, formação de colágeno, formação de cápsula fibrosa, proliferação vascular circundante, presença de osso ectópico, presença de células do complexo osteogênico, diferenciação entre os tipos de colágeno.

Análise realizada em microscópio óptico Nikon (Eclipse 80i, Shimjuku, Japão) acoplado com câmera de alta resolução Nikon (DS-Filc, Shimjuku, Japão) e os resultados apresentados descritivamente através de fotomicrografias.

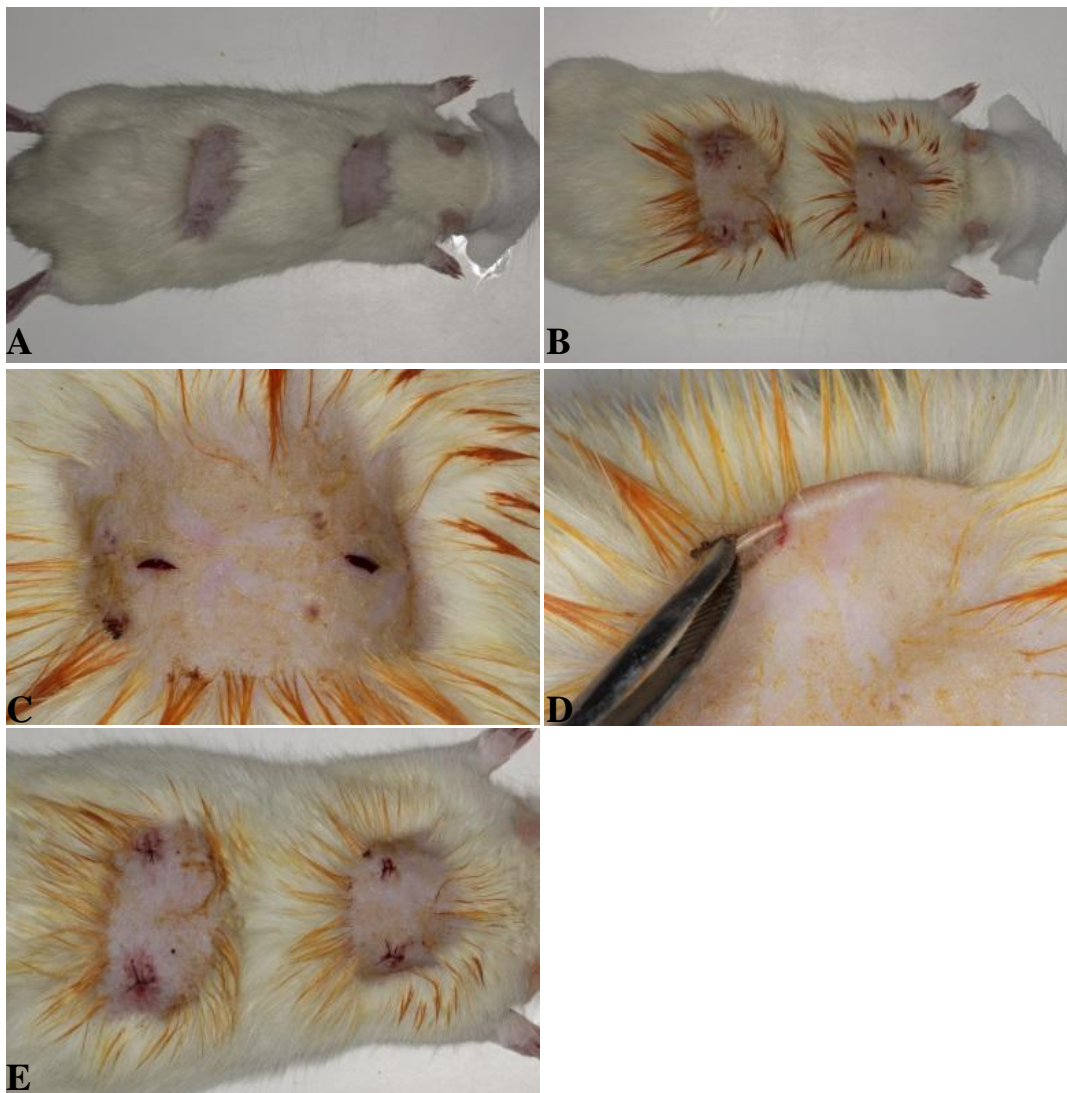


Figura 3. Fotografias do processo cirúrgico realizado nos animais. Em (A) podemos observar o animal após epilção das duas regiões no dorso. Em (B) observam-se as quatro incisões realizadas, sendo duas cefálicas e duas caudais, além da aplicação de iodo tópico como medida antisséptica. Em (C) notam-se as duas incisões cefálicas. Em (D) nota-se o procedimento de inserção do bastão no tecido subcutâneo do animal. Em (E) notam-se as quatro regiões operadas e suturadas com fio de mono-nylon e ponto simples.

6.1. ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS MATERIAIS

A Figura 4 mostra o aspecto microscópico dos compósitos PVA-SC, PVA-SC-HAp e da cânula contendo a HAp pura. Após processamento histológico e coloração com HE, o compósito PVA-SC apresentou-se como um material homogêneo e basofílico, com grau de basofilia variável, quando comparadas as regiões central e periférica do bastão (Figura 4A).

Os bastões de PVA-SC-HAp15 e PVA-SC-HAp20 apresentaram morfologia semelhante, ao microscópio óptico. Em todos os casos houve polarização da hidroxiapatita (Figura 4B, C). Em relação à HAp pura, os grânulos irregulares e de tamanho variável permaneceram, na sua maioria, no interior dos cateteres. Na extremidade da cânula houve extravasamento de grânulos (Figura 4D).

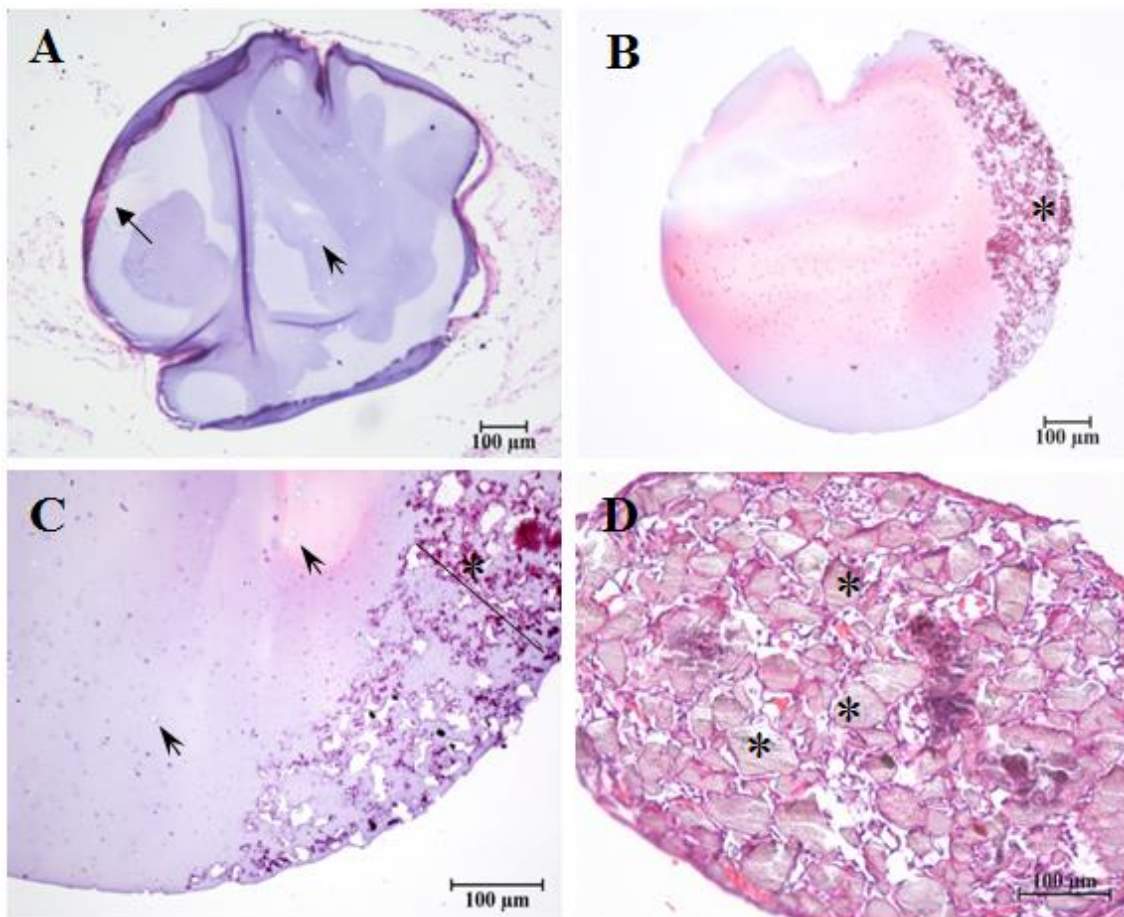


Figura 4. Cortes histológicos de bastões compostos por (A) álcool poli-vinílico - sulfato de condroitina (PVA-SC); (B, C) álcool poli-vinílico - sulfato de condroitina-hidroxiapatita (PVA-SC-HAp); (D) hidroxiapatita pura (HAp), na forma granulada. Em (A) a seta representa, no compósito PVA-SC, a borda mais basofílica em comparação com o centro mais claro; em (A) e (C), a cabeça de seta indica a presença de poros no material; em (B), (C) e (D), o asterisco indica a presença da hidroxiapatita. Coloração: hematoxilina e eosina. Aumento original: (A e B) 10x; (C e D), 20x.

6.2. AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

Durante a etapa pós-cirúrgica nenhuma alteração comportamental dos animais foi verificada ao longo dos 30 dias de acompanhamento.

Aos 7, 15 e 30 dias após o procedimento cirúrgico foram coletadas amostras contendo os bastões inseridos no tecido subcutâneo dos animais. No grupo 7 dias, pôde-se verificar a localização dos materiais por meio de palpação da pele visto que a região epilada ainda era evidente. Nos animais dos demais grupos o crescimento dos pelos dificultou a localização dos bastões.

Após a incisão da pele, divulsão dos tecidos e localização dos materiais, a inspeção visual dos bastões inseridos no subcutâneo (vista do tecido rebatido) confirmou a ausência de edema para todos os grupos. Nos grupos PVA-SC e PVA-SC-HAp (15 e 20%) houve uma proliferação vascular ao redor do bastão. No grupo HAp, a vascularização ocorreu de forma diferente, estando localizada nas extremidades dos bastões, regiões de contato direto da hidroxiapatita com o tecido do animal (Figura 5).

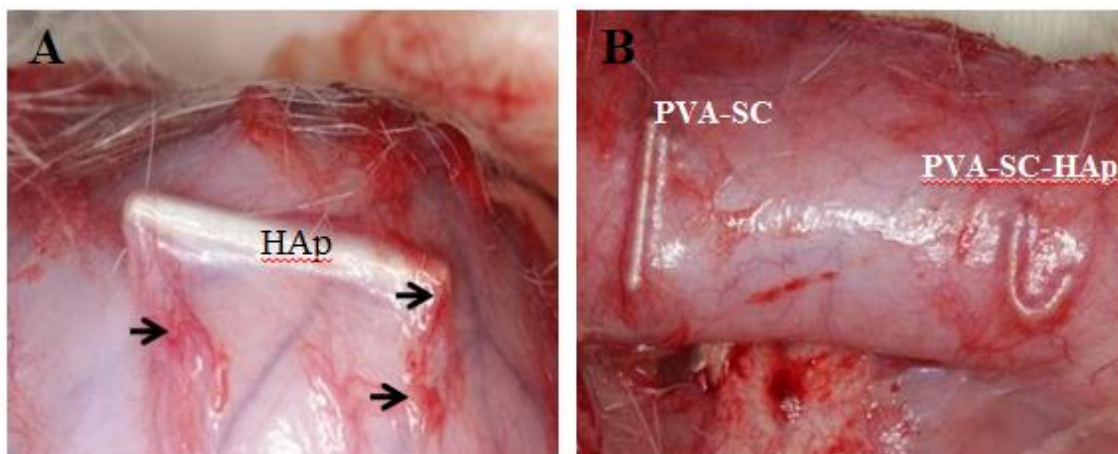


Figura 5. Fotografias do tecido subcutâneo de ratos quinze dias após o implante de (A) cânula plástica contendo hidroxiapatita pura (HAp) granulada ou (B) bastão composto por álcool poli-vinílico - sulfato de condroitina sem hidroxiapatita (PVA-SC) e com hidroxiapatita 15% (PVA-SC-HAp). Em (A) observar a maior concentração de vasos nas extremidades da cânula (setas). Em (B), a proliferação vascular ocorreu ao redor de todo o material implantado.

6.3. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Neste estudo observou-se que a resposta tecidual foi variável no entorno dos bastões, em função da heterogeneidade obtida na construção dos compósitos, e desta forma, a avaliação histopatológica deu destaque para as áreas onde as diferenças eram evidentes.

6.3.1. Avaliação aos sete dias

Sete dias (Figura 6) após o procedimento cirúrgico observou-se um aumento de celularidade ao redor dos materiais implantados, em todos os grupos. Os principais tipos celulares identificados eram fibroblastos (grande maioria), macrófagos e pequeno número de neutrófilos. Essa atividade celular foi maior no grupo HAp, seguida pelos grupos PVA-SC-HAp 20, PVA-SC-HAp 15 e no grupo PVA-SC. Todos os grupos apresentaram aumento de vascularização ao redor do implante, sendo que no grupo PVA-SC notou-se um maior número de vasos sanguíneos circundantes quando comparado aos outros grupos, além da ocorrência de hemácias extravasadas. Houve também a deposição de colágeno, organizado como uma fina cápsula fibrosa com características semelhantes para todos os materiais.

Neste período observou-se, no grupo HAp, o envolvimento de grânulos de hidroxiapatita por macrófagos. Nos grupos PVA-SC-HAp15 e 20 o tecido conjuntivo circundante ora assumia conformação capsular, ora não, apresentando arranjo irregular. Nas áreas onde houve a maior concentração de HAp notou-se maior irregularidade do tecido conjuntivo, enquanto nas demais áreas houve uma tendência à formação de cápsula fibrosa.

No grupo HAp, houve migração de células e vasos sanguíneos para o interior da cânula. Esses tecidos ocuparam os espaços presentes entre os grânulos de hidroxiapatita. No compósito PVA-SC-HAp15 em um grande número de poros foram encontradas células, cerca de uma célula/poro. No compósito com 20% de HAp raras células foram observadas no interior dos poros. As principais características deste período estão representadas na Figura 6.

6.3.2. Avaliação aos 15 dias

Quinze dias após o procedimento cirúrgico, observou-se ainda presente a celularidade encontrada aos 7 dias, porém em quantidade menor, sendo que o grupo HAp apresentou maior número de células, se comparado aos demais grupos, com células dispostas ao redor dos grânulos e secretando matriz de coloração acidófila. O grupo que apresentou menor quantidade de células ao redor do material foi o PVA-SC-HAp15. Os macrófagos foram encontrados em todos os grupos analisados, bem como a presença de vasos sanguíneos circundantes ao material,

esses sempre em maior quantidade no grupo PVA-SC e muitas vezes com um extravasamento de hemácias ao redor do material. Também no grupo PVA-SC a cápsula fibrosa formada ao redor do material era mais espessa se comparada aos demais.

Nos bastões de PVA-SC-HAp onde a hidroxiapatita encontrava-se melhor distribuída, houve a formação de espaços, ou poros, no meio do material, que possibilitaram a migração de células e desenvolvimento de matriz (Figura 7E). Neste período também houve deposição de matriz acidófila, semelhante à matriz óssea (Figura 7F).

6.3.3. Avaliação aos 30 dias

Trinta dias após o implante, houve uma diminuição do número de células em torno dos biomateriais e tendência ao encapsulamento. O grupo PVA-SC se destacou, neste período, pela grande quantidade de vasos sanguíneos presentes na parte mais externa da cápsula (Figura 8C, 8D). O grupo que apresentou a menor celularidade aos 30 dias foi a HAp. Neste grupo a cápsula se formou ao redor do envoltório plástico que continha a hidroxiapatita granulada. Os grânulos, individualmente, foram envolvidos por macrófago, na forma de células epitelióides (Figura 8A). Alguns grânulos foram envolvidos por uma matriz acidófila, semelhante à matriz óssea (Figura 8B).

Em alguns animais, observou-se que imediatamente ao redor dos compósitos PVA-SC-HAp15 e PVA-SC-HAp20 houve deposição de matriz acidófila, semelhante à matriz óssea, assemelhando-se ao tecido ósseo primário (Figura 8E). Ainda no grupo PVA-SC-HAp, observou-se, em alguns locais, o desenvolvimento de um tecido com característica de tecido cartilaginoso (Figura 8F).

6.3.4. Estudo imunohistoquímico

O estudo imunohistoquímico forneceu alguns indícios de deposição de matriz óssea na interface tecido-compósito, aos 7, 15 e 30 dias de observação.

Notou-se em áreas adjacentes ao material a deposição de uma matriz acelular, não colagenosa, semelhante à uma linha de cimento. O endotélio dos vasos sanguíneos localizados nas proximidades do material expressaram marcação positiva para osteocalcina. O conjuntivo adjacente ao compósito apresentou-se bastante celularizado e com importante expressão para esta proteína não colagenosa. Maiores detalhes da imunomarcação estão descritos na legenda da Figura 9.

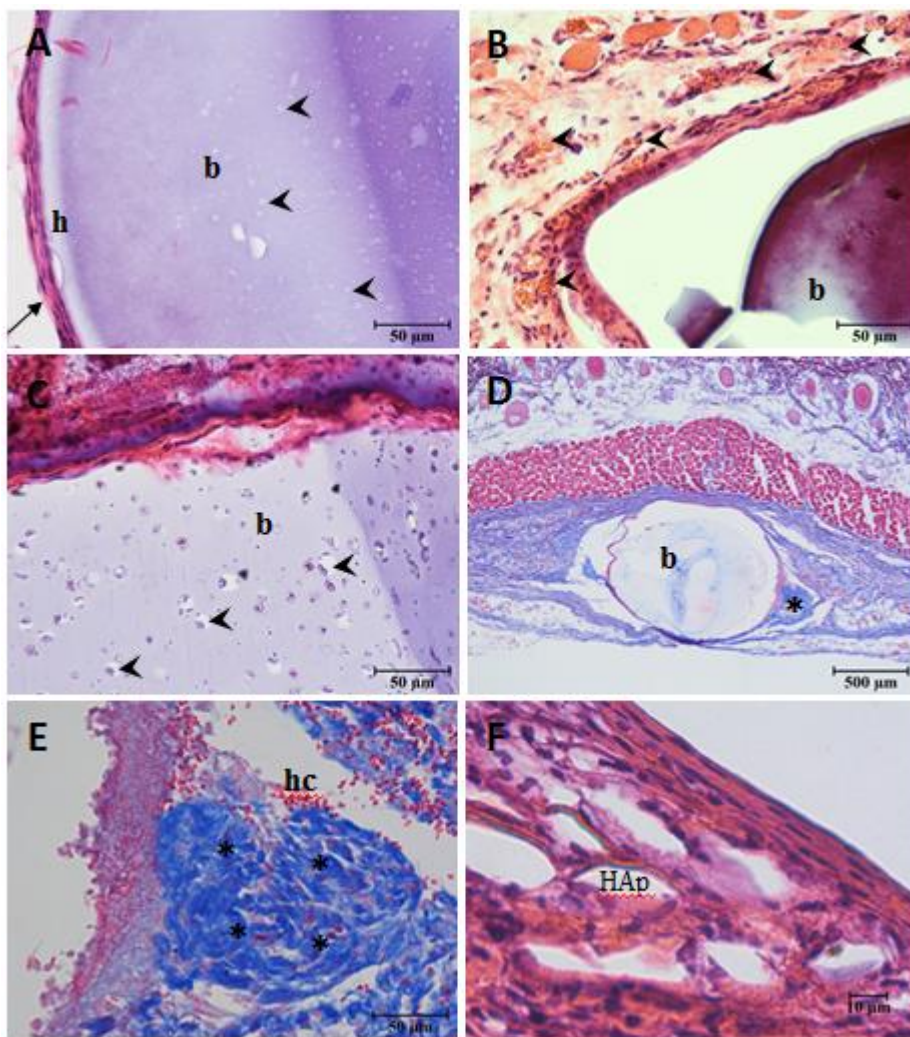


Figura 6. Fotomicrografias do tecido subcutâneo de ratos aos sete dias após o implante de bastões compostos por (A, B) álcool poli-vinílico-sulfato de condroitina (PVA-SC); (C, D e E) álcool poli-vinílico - sulfato de condroitina - hidroxiapatita (PVA-SC-HAp) e de cânula plástica contendo (F) hidroxiapatita pura (HAp). Em (A) observa-se uma fina cápsula fibrosa (seta) ao redor do biomaterial (b). O material apresentou microporos (cabeça de seta) e uma matriz homogênea. A formação de um halo periférico mais claro (h) mostra sua organização bifásica do material. Em (B), nota-se a grande vascularização ao redor do material (cabeças de seta). Em (C) notam-se os poros (cabeças de seta) presentes no biomaterial (b) ocupados em média por uma célula cada. Em(D) nota-se a deposição irregular de colágeno (asteriscos) ao lado do material com semelhança ao tecido ósseo primário. Em (E), o detalhe de (D) em maior aumento. Observar grande quantidade de hemáceas (hc) extravasadas. Em (F) observar a grande quantidade de célula e matriz ao redor dos cristais de hidroxiapatita (HAp). Coloração hematoxilina e eosina (A, B, C e F) e Azan-mallory (D e E). Aumento original: (A,B,C,E), 40x; (D) 4x; (F) 100x.

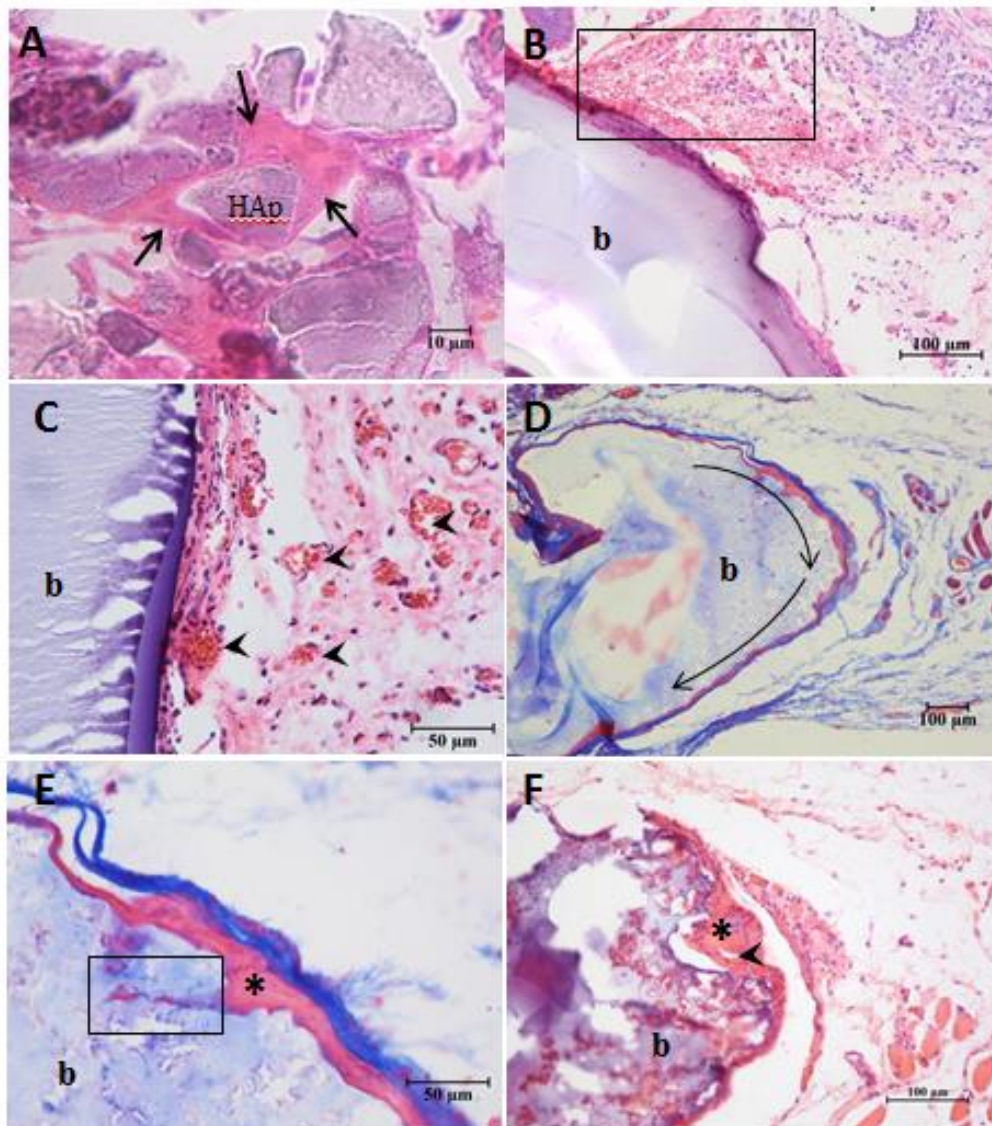


Figura 7. Fotomicrografias do tecido subcutâneo de ratos aos quinze dias após o implante de (A) cânula plástica contendo hidroxiapatita pura (HAp); bastões compostos por (B e C) álcool poli-vinílico - sulfato de condroitina (PVA-SC); (D, E e F) álcool poli-vinílico - sulfato de condroitina - hidroxiapatita (PVA-SC-HAp). Em (A) observa-se os cristais de hidroxiapatita (HAp) circundados por células inseridas em matriz acidófila (setas). Em (B), destaque para uma área com grande quantidade de hemácias extravasadas ao redor do biomaterial (b). Em (C) nota-se a presença de grande quantidade de vasos sanguíneos (cabeças de seta) ao redor do biomaterial (b). Em (D) observa-se a dupla coloração do colágeno (setas) que envolve o biomaterial (b) ao redor de todo o bastão. Em (E) nota-se matriz sugestiva de tecido ósseo (*) e destaque para região de penetração tecidual no biomaterial (b). Em (F) observa-se região sugestiva de tecido ósseo (*) e lacuna (cabeça de seta). Coloração hematoxilina e eosina (A, B, C e F) e Azan-mallory (D e E). Aumento original: (A), 100x; (B, F), 20x; (C, E), 40x; (D) 10x; (E).

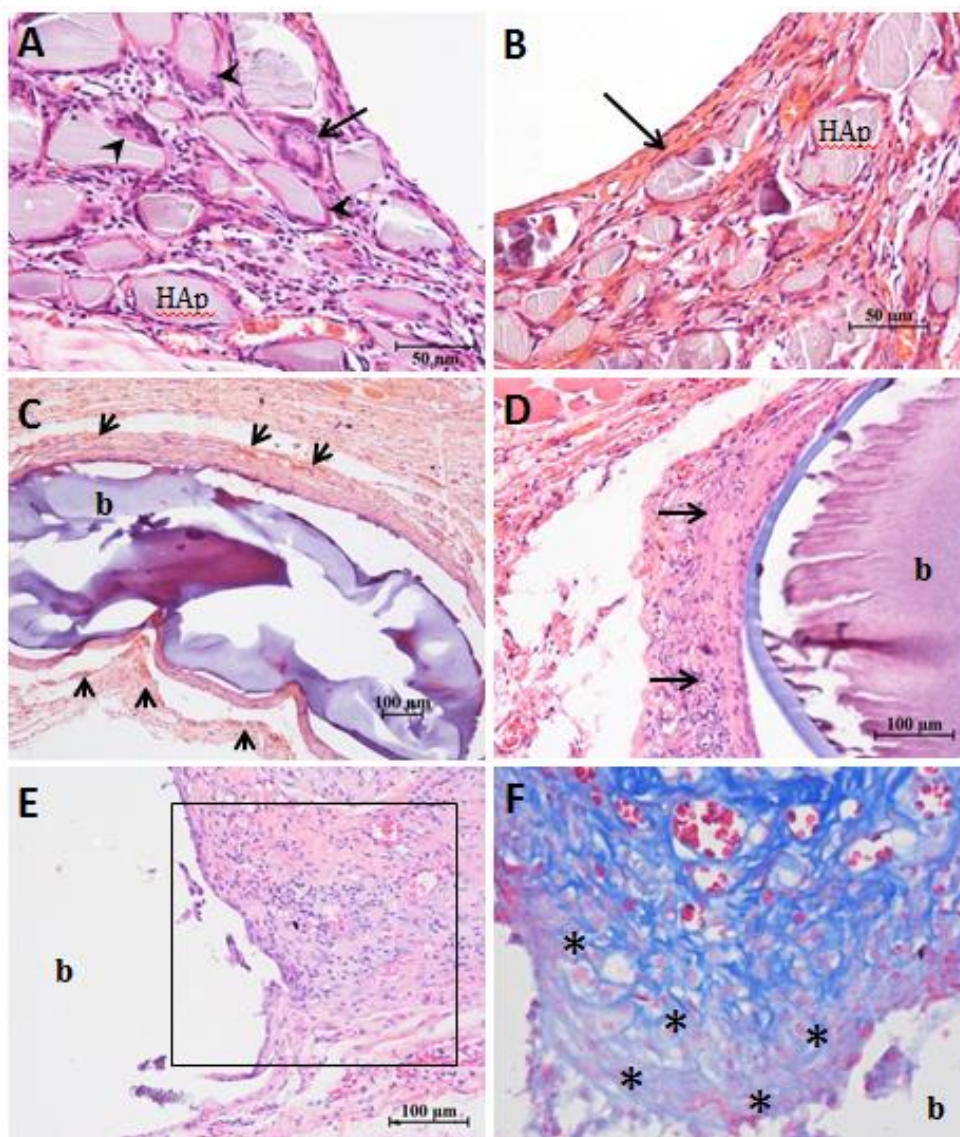


Figura 8. Fotomicrografias do tecido subcutâneo de ratos aos trinta dias após o implante de (A e B) cânula plástica contendo hidroxiapatita pura (HAp) extravasada junto ao tecido; bastões compostos por (C e D) álcool poli-vinílico - sulfato de condroitina (PVA-SC); (E e F) álcool poli-vinílico - sulfato de condroitina - hidroxiapatita (PVA-SC-HAp). Em (A) observa-se os cristais de hidroxiapatita (HAp) circundados por células epitelióides (cabeças de seta). Em (B), nota-se o tecido conjuntivo não modelado (seta) entre os cristais de hidroxiapatita (HAp). Em (C) nota-se a presença de grande quantidade de vasos sanguíneos (cabeças de seta) ao redor do biomaterial (b). Em (D) observa-se a espessa cápsula fibrosa (setas) envolvendo o biomaterial (b). Em (E) destaque para matriz tecidual adjacente ao biomaterial (b) com organização diferente de cápsula fibrosa. Em (F) observa-se região sugestiva de tecido cartilaginoso (*) em formação adjacente ao biomaterial (b). Coloração hematoxilina e eosina (A, B, C, D e E) e Azan-mallory (F). Aumento original: (A, B e F), 40x; (C), 10x; (D, E), 20x.

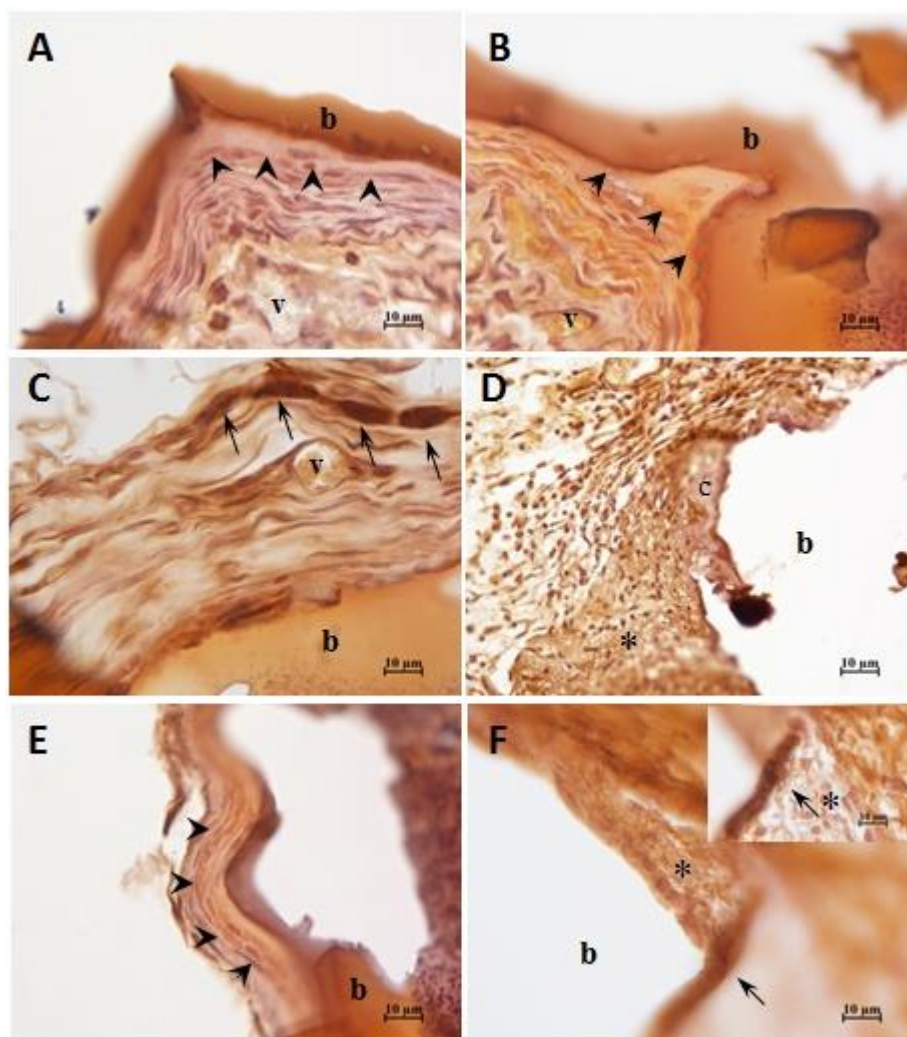


Figura 9. Fotomicrografias do tecido subcutâneo de ratos após o implante de bastões compostos por álcool poli-vinílico - sulfato de condroitina - hidroxiapatita (PVA-SC-HAp). Tempo de observação: (A, B, E), 15 dias; (C, D, F), 7 dias. Em (A e B) observa-se uma região de deposição de matriz acelular, adjacente ao biomaterial (b) semelhante à uma linha de cimento, cujo limite com a cápsula fibrosa está indicado pelas cabeças de seta. Em (C) nota-se forte imunocoloração em células endoteliais (v) e em células localizadas na parte externa da cápsula (setas). Em (D) observa-se a presença de um tecido bastante celularizado, com coloração positiva para as células e para parte da matriz extracelular (*). Em alguns pontos isolados nota-se a presença de uma matriz menos corada (c) sugestiva de matriz óssea em processo de mineralização por apresentar coloração para osteocalcina. Em (E) as cabeças de seta indicam a diferença de imunocoloração no tecido conjuntivo que está se organizando ao redor do compósito (b). Em (F) a expressão de osteocalcina pode ser notada nas células e na matriz (*). O detalhe da figura representa uma área adjacente (desfocada), indicada pela seta, na qual há uma forte coloração para as células e ausência de coloração na matriz (*). Coloração: imunohistoquímica com anticorpo anti-osteocalcina. Aumento original: (D) 40x; (A, B, C, E, F) 100x.

Neste estudo, o modelo de implante em tecido subcutâneo de ratos foi utilizado com a finalidade de avaliar a resposta do tecido subcutâneo frente a um implante de um compósito constituído por álcool poli-vinílico (PVA) – sulfato de condroitina (SC) – hidroxiapatita (HAp) na forma de bastão. A morfologia dos materiais, a resposta tecidual e a expressão de osteocalcina foram avaliadas. Os tempos de observação foram de 7, 15 e 30 dias.

O compósito foi desenvolvido na forma de hidrogel (rede de polímeros altamente hidratada) e os componentes selecionados em função de suas características intrínsecas. O SC foi usado em função de seu potencial de atração celular e efeito anti-inflamatório (Lee *et al.*, 2005), o PVA, com a finalidade de proporcionar resistência ao composto (Lee *et al.*, 2005). A hidroxiapatita, por seu potencial osteogênico (Tsukanaka *et al.*, 2015; Duarte *et al.*, 2006).

O compósito foi formatado como pastilha para a avaliação das propriedades ultraestruturais e físico químicas. A análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que o compósito apresentou estrutura homogênea e porosidade que variou de 300nm a 2µm de diâmetro (Cellet *et al.*, 2015). Para os testes de biocompatibilidade, em animais, foram desenvolvidos bastões, e de acordo com a morfologia observada na microscopia óptica, a distribuição das nanopartículas HAp no corpo do bastão mostrou-se polarizada, descaracterizando a homogeneidade estrutural antes verificada no modelo de pastilha.

No intuito de avaliar se a desigualdade na distribuição dos componentes dos bastões era decorrente do processamento histológico, ou seja, se algum dos componentes químicos utilizados para a confecção das lâminas estaria influenciando na distribuição da HAp, foram avaliadas amostras do compósito (1) sem processamento prévio, diretamente incluídas na parafina; (2) fixadas e processadas até a desidratação; e ainda (3) submetidas ao processamento histológico completo. As diferentes estratégias resultaram em similaridade na distribuição da HAp, independentemente do procedimento adotado, como observado na Figura 10, descartando a possibilidade de ocorrência artefato de técnica e realçando um possível desajuste no processo da confecção dos bastões. Com esta observação constatou-se que os componentes químicos empregados no processamento histológico não interferiram na morfologia do material.

Entretanto a distribuição polarizada da hidroxiapatita parece ter interferido na resposta biológica, visto que os indícios de formação de tecido ósseo sempre foram observados no pólo da hidroxiapatita.

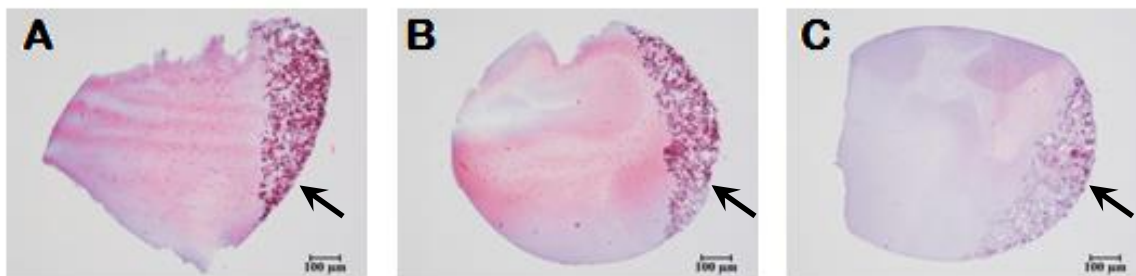


Figura 10. Fotomicrografias dos bastões compostos por poli (álcool vinílico) - sulfato de condroitina - hidroxiapatita (PVA-SC-HAp). (A) sem processamento prévio, diretamente incluído na parafina; (B) fixado e processado até a desidratação, e ainda (C) submetidos ao processamento histológico completo. Nota-se a polarização das nanopartículas de HAp (setas) independentemente do momento do processamento histológico. Coloração: hematoxilina e eosina. Aumento original: 10X.

O experimento *in vivo* foi conduzido empregando-se dois controles positivos, sendo eles o PVA-SC e a hidroxiapatita nanocristalina pura sintética ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) na forma de pó (Cellet *et al.*, 2015), para identificar qual deles seria responsável por uma eventual resposta inflamatória no tecido próximo aos implantes do compósito, caso ocorresse.

A HAp foi inserida em uma cânula plástica, com formato e tamanho semelhante aos demais materiais para que se conseguisse a rigidez e conformidade necessárias para a sua inserção no subcutâneo. Tal processo, no entanto, possibilitou a avaliação histológica somente das regiões das extremidades das cânulas, onde o material extravasou e teve contato direto com o tecido do animal.

A biocompatibilidade e o potencial osteogênico da HAp já são reconhecidos (Duarte *et al.*, 2006). A HAp proporciona um ambiente favorável para a proliferação e diferenciação dos osteoblastos, sendo capaz de estimular a formação de osso novo (Liu e Lun, 2012). Neste estudo, os grânulos de hidroxiapatita localizados na extremidade da cânula foram permeados por células e vasos; não houve desenvolvimento de resposta inflamatória aguda; a presença de macrófagos na forma de células epitelióides, entre os cristais e ao redor dos grânulos sugeriu que um processo de reabsorção estaria em curso.

Algumas amostras apresentaram a deposição de matriz acidófila ao redor dos grânulos de HAp, o que sugere que o material pode estar sendo envolvido por matriz óssea primária, demonstrando assim um caráter osteoindutor, propriedade já descrita (Tsukanaka *et al.*, 2015).

A resposta biológica induzida pelo controle PVA-SC se caracterizou principalmente pelo maior crescimento de vasos ao redor do bastão e a presença de hemácias no tecido conjuntivo, fora de vasos. Este controle também apresentou biocompatibilidade. Lee *et al.*, (2005) demonstraram que um hidrogel de PVA-SC utilizado como meio de cultura promoveu o crescimento de células BHK (*baby hamster kidney cells*), mostrando que este hidrogel tem

potencial uso na engenharia tecidual. Portanto, os controles positivos empregados neste estudo apresentaram características favoráveis ao desenvolvimento de um biomaterial.

Quando os componentes foram unidos para a confecção do compósito, não houve perda da sua estrutura química (Cellet *et al.*, 2015). O compósito foi desenvolvido com composição química e estrutura para funcionar como um *scaffold*, entretanto os maiores poros, encontrados no PVA-SC-HAp15, mediram até 2 μ m. O menor diâmetro observado foi 300nm. Esta porosidade reduzida não permitiu que células ou capilares sanguíneos permeassem os materiais. Apenas no compósito PVA-SC-HAp15 ocorreram células isoladas que conseguiram migrar para o interior dos pequenos poros. É provável que o intumescimento do material tenha ainda, contribuído para reduzir mais ainda o tamanho dos poros. Apesar disso, esse resultado nos mostra que mesmo sem ter poros de tamanho adequado o material permitiu que as células penetrassem no seu interior, mostrando que sua composição e superfície favorecem a migração celular, característica favorável ao biomaterial. Portanto o compósito não funcionou como um *scaffold*, e por essa razão toda a resposta tecidual se concentrou na periferia dos implantes.

O tamanho do poro é considerado fator crucial para a proliferação celular e vascular no interior dos biomateriais e o tamanho mínimo recomendado varia de 70 a 100 μ m, tamanho que permite a migração e transporte celular (Galois e Mainard, 2004) até 300 μ m, tamanho que permite o desenvolvimento de um sistema de capilares, essencial para a neoformação óssea (Teixeira, 2009; Karageorgiou e Kaplan, 2005).

A presença do compósito no tecido subcutâneo induziu uma resposta biológica, não inflamatória, caracterizada por aumento de vascularização e celularidade, com desenvolvimento de cápsula fibrosa em algumas áreas da circunferência dos bastões ou deposição de matriz acidófila, semelhante à matriz óssea, em outras áreas, mais especificamente, no pólo onde havia uma maior concentração de HAp.

A produção de matriz óssea num sítio ectópico demonstra que o material possui propriedade osteoindutora (Tsukanaka *et al.*, 2015; Kellomaki *et al.*, 2000). Os indícios de indução de osteogênese, neste estudo, foram pontuais. Em vários pontos da interface tecido-biomaterial houve a deposição de uma matriz acelular semelhante àquela chamada de linha de cimento ou lâmina limitante (McKee e Nanci, 1996), uma estrutura com 1-5 μ m de espessura, deficiente em colágeno e que contém grandes quantidades de enxofre e baixa quantidade de cálcio e fosfato (Burr *et al.*, 1988). A linha de cimento também contém a osteopontina, uma proteína não colagenosa que participa da adesão matriz-matriz/mineral (McKee e Nanci, 1996). Um segundo indício de formação óssea foi a deposição de matriz de coloração avermelhada, diferente da cápsula, que se cora em azul pela técnica de Azan-Mallory. Além disso em alguns implantes desenvolveram-se massas acidófilas de tecido conjuntivo, permeadas por células, com a mesma irregularidade descrita para o tecido ósseo primário. Essas mesmas estruturas já foram

descritas em modelo de implante em defeitos de tamanho crítico (Candido, 2014) e representaram indícios de formação de tecido ósseo ectópico.

A osteocalcina, proteína não colagenosa produzida pelos osteoblastos, pode ser considerada um bom marcador quando o intuito é avaliar a capacidade osteogênica em estágios iniciais, pois pode ser facilmente medida sem qualquer perda celular e detectada antes do processo de mineralização (Nakamura *et al.*, 2009). Quando depositada na matriz extracelular atua como um sinal específico para a migração e adesão de osteoclastos, processo indicativo de reparo ósseo (Chenu *et al.*, 1994). Existem outras células capazes de produção dessa proteína, sendo elas os odontoblastos e os condrócitos hipertrofiados (Vieira, 1999). Neste estudo observamos positividade para osteocalcina em células e na matrix extracelular. Células endoteliais também expressaram esta proteína. A imunocoloração sempre esteve presente nas regiões próximas ao bastão no pólo onde estava localizada a hidroxiapatita. A positividade para a proteína osteocalcina em células e na matriz adjacente ao implante também são um forte indício do efeito osteoindutor estimulado pelo compósito neste estudo

Por fim, deve-se levar em conta que todos os indícios de osteoindução detectados neste trabalho tiveram como palco o tecido subcutâneo, um sítio com morfologia e composição diferente do leito ósseo, que por sua vez abriga todas as condições favoráveis à regeneração óssea. Portanto, a possibilidade de formação de tecido ósseo em sítio ectópico, ou seja, fora da localidade habitual, pode significar um potencial osteoindutor inerente ao material (Tsukanaka *et al.*, 2015).

8 - CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o biomaterial apresentou morfologia heterogênea e microporosidade que interferiram na resposta biológica. O compósito foi biocompatível e apresentou atividade osteoindutora.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARRADAS, A.M., YUAN, H., VAN DER STOK, J., LE QUANG, B., FERNANDES, H., CHATERJEA, A., HOGENES, M.C., SHULTZ, K., DONAHUE, L.R., VAN BLITTERSWIJK, C., DE BOER, J. The influence of genetic factors on the osteoinductive potential of calcium phosphate ceramics in mice. **Biomaterials**, v.33 (23), p.5696-705, 2012.
2. BAUEROVA, K., PONIST, S., KUNCIROVA, V., MIHALOVA, D., PAULOVICOVA, E., VOLPI, N. Chondroitin sulfate effect on induced arthritis in rats. **Osteoarthritis Cartilage**, v.19 (11), p.1373-9, 2011.
3. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC n. 305, de 14 de novembro de 2012.
4. BRASIL, Ministério da Saúde, Banco de dados do Sistema Único de Saúde, DATASUS, 2003.
5. BRITO, M.K.M., SCHELLINI, S.A., PADOVANI, C.R., PELLIZZON, C.H., NETO, C.G.T. Inclusões de quitosana no subcutâneo de rato: avaliação clínica, histológica e morfométrica. **An Bras Dermatol.**, v.84 (1), p.35-40 2009.
6. BRYAN E. ANDERSON, MD. **The Netter Collection of Medical Illustrations - Integumentary System**. Saunders Elsevier, vol. 4, 2012.
7. BURR, D. B., SCHAFFLER, M. B., FREDERICKSON, R. G. Composition of the cement line and its possible mechanical role as a local interface in human compact bone. **J. Biomechanics**, v.21, n. 11, p. 939-945, 1988.
8. CANDIDO, A. G. Compósito baseado em HA- β TCP-Nb₂O₅ estimula a osteoindução durante o reparo de defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos. [Dissertação de Mestrado]. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. “Prof^a. Luzmarina Hernandes”. 2014.

9. CELLET, T. S. P., PEREIRA, G. M., MUNIZ, E. C., SILVA, R., RUBIRA, A. F. Hydroxyapatite nanowhiskers embedded in chondroitin sulfate microspheres as colon targeted drug delivery systems. **J Mater Chem B**, v. 3, p. 6837-6846, 2015.
10. CHENU, C., COLUCCI, S., GRANO, M., ZIGRINO, P., BARATTOLO, R., ZAMBONIN, G., BALDINI, N., VERGNAUD, P., DELMAS, P. D., ZALLONE, A. Z. Osteocalcin induces chemotaxis secretion os matriz proteins and calcium-mediated intracelular signaling in human osteoclast - likecells. **The Journal of Cell Biology**, v.127, n.4, p. 1149-58, 1994.
11. CHEUNG, H. Y., LAU, K. T., LU, T. P., HUI, D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. **Composites Part B**, v.38, p.291, 2007.
12. DUARTE, T.S., BORGES, A.P.B., LAVOR, M.S.L., FILGUEIRAS, R., TSIOMIS, A.C., OLIVEIRA, F.L., PONTES, K.C.S. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos histológicos. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.58, n.5, p.849-853, 2006.
13. GALOIS, L., MAINARD, D. Bone ingrowth into two porous ceramics with different pore sizes: An experimental study. **Acta Orthopaedica Belgica**, v.70, n. 6, p. 598-603, 2004.
14. GAO, Y., CAO, W.L., WANG, X.Y., GONG, Y.D., TIAN, J.M., ZHAO, N.M., ZHANG, X.F. Characterization and osteoblast-like cell compatibility of porous scaffolds: Bovine hydroxyapatite and novel hydroxyapatite artificial bone. **J Mater Sci Mater Med**, v.17 (9), p.815-23, 2006.
15. JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 12ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
16. KANCZLER, J.M., OREFFO, R.O.C. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. **European Cells and Materials**, v.15, p.10-114, 2008.

17. KARAGEORGIU, V., KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v.26, p.5474-91, 2005.
18. KELLOMAKI, M., NIIRANEN, H., PUUMANEN, K., ASHAMMAKHI, N., WARIS, T., TORMALA, P. Biabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation. **Biomaterials**, v.21, p. 2495-2505, 2000.
19. KIESWETTER, K., SCHWARTZ, Z., DENA, D. D., BOYAN, B. D., The role of implant surface characteristics in the healing of bone, **Crit Rev Oral Biol Med.**, v. 7, p.45, 1996.
20. KURASHINA, K., KURITA, H., WU, Q., OHTSUKA, A., KOBAYASHI, H. Ectopic osteogenesis with bifasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits. **Biomaterials**, v.23, p.407-412, 2002.
21. LEE, C.T., KUNG, P.H., LEE, Y.D. Preparation of poly (vinyl alcohol)-chondroitin sulfate hydrogel as matrices in tissue engineering. **Science Direct Carbohydrate Polymers**, v.61, p.348-354, 2005.
22. LEE, K.Y., MOONEY, D.J. Hydrogels for tissue engineering. **Chemical Rev**, v.101, p.1869–1880, 2001.
23. LEMGRUBER, A. Seminário Produtos para a Saúde: mercado e regulação. Brasília, 2005.
24. LIMA, A.P.A.F., de VASCONCELOS, F.M.N., BEATRICE, L.C.S. Biocompatibilidade dos materiais restauradores estéticos em pacientes infantis e adolescentes. **Int Journal of Dentistry**, v. 2(2), p. 279-285, 2003.
25. LIU, B., LUN, DX. Current application of β -tricalcium phosphate composites in orthopaedics. **Orthopaedic Surgery**, v.4, p. 139-144, 2012.
26. MADIHALLY, S.V., MATTHEW, H.W.T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v.20, p.1133–1142, 1999.

27. MASTROGIACOMO, M., SCAGLIONE, S., MARTINETTI, R., DOLCINI, L., BELTRAME, F., CANCEDDA, R. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. **Biomaterials**, v.27, p. 3230-7, 2006.
28. MCKEE, M. D., NANCI, A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. **Microsc Res Tech**, v.33, p. 141-64, 1996.
29. MIN, E.H., WONG, K. H., STENZEL, M. H. Microwells with patterned proteins by a self-assembly process using honeycomb-structured porous films. **Adv Mater**, v.20, p.3550, 2008.
30. NADERI-MESHKIN H., ANDREAS K., MATIN M. M., SITTINGER M., BIDKHORI H. R. Chitosan-based injectable hydrogel as a promising in situ forming scaffold for cartilage tissue engineering. **Cell Biol Int**, v.38, p.72-84, 2014.
31. NAKAMURA, A., DOHI, Y., AKAHANE, M., OHGUSHI, H., NAKAJIMA, H., FUNAOKA, H., TAKAKURA, Y. Osteocalcin secretion as an early marker of *in vitro* osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering**, v.15, n.22, p.169-180, 2009.
32. ONISHI, H., ISODA, Y., MATSUYAMA, M. In vivo evaluation of chondroitin sulfate-glycyl-prednisolone for anti-arthritis effectiveness and pharmacokinetic characteristics. **Int J of Pharmac**, v.456, p.113-120, 2013.
33. OONISHI, H., KUSHITANI, S., YASUKAWA, E., IWAKI, H., HENCH, L.L., TSUJI, E., SUGIHARA, T. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. **Clin Orthop Related Res**, v.334, p.316-325, 1997.
34. PACHUAU, L., MAZUMDER, B. Colonic drug delivery systems based on natural polysaccharides and their evaluation. **Mini-Rev in Medic Chemistry**, v.13, p.1982-1991, 2013.

35. PERSSON, M., LORITE, G.S., KOKKONEN, H.E., CHO, S.-W., LEHENKARI, P. P., SKRIFVAR, M., TUUKKANEN, J. Effect of bioactive extruded PLA/HA composite films on focal adhesion formation of preosteoblastic cells. **Coll Surf B: Biointerfaces**, v.121, p.409–416, 2014.
36. PRETTO, J.L.B., PAGNONCELLI, R.M. Avaliação por meio de MEV da Região Perrimplantar após irradiação com laser diodo, infravermelho, em implantes de titânio situados em tibia de rato. **Revista de Odontologia da ATO**, v. 5, n.1, p.130-180, 2005.
37. REZWAN, K., CHEN, Q. Z., BLAKER, J. J., BOCCACCINI, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.27 (18), p.3413-31, 2006.
38. SCHIRALDI, C., CIMINI, D., ROSA, M. Production of chondroitin sulfate and chondroitin. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.87, p.1209–1220, 2010.
39. SCHMEDLEN, R.H., KRISTYN, K.S., JENNIFER, J.L. Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering. **Biomaterials**, v.23, p.4325–4332, 2002.
40. SENARATNE, W., ANDRUZZI, L., OBER, C. K., Self-assembled monolayers and polymer brushes in nanotechnology: Present applications and future perspectives, **Biomacromolecules**, v. 6, p. 2427, 2005.
41. SENATOVN, F.S., NIAZA, K.V., ZADOROZHNYI, M. YU., MAKSIMKIN, A.V., KALOSHKIN, S.D., ESTRIN, Y.Z. Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds. **Journal of the mechanical behavior of biomed Mat.**, v.57, p.139-148, 2016.
42. SOARES, G.A., NASSI, C.D. Fórum de Biotecnologia Biomateriais. Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia. 2005.
43. SPILLER, K.L., MAHER, S.A., LOWMAN, A.M. Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. **Tissue Eng. Part B Rev.**, v.17, p 281-299, 2011.

44. SWETHA, M., SAHITHI, K., MOORTHI, A., SRINIVASANB, N., RAMASAMYA, K., SELVAMURUGAN, N. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.47 (1), p.1-4, 2010.
45. TARAFDER, S., BALLA, V.K., DAVIES, N.M., BANDYOPADHYAY, A., BOSE, S. Microwave sintered 3D printed tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 7 (8), p.631–641, 2013.
46. TEIXEIRA, L. J. C. Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos. [Tese de Doutorado]. Duque de Caxias: Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. 2009.
47. TITORENCU, I., PRUNA, V., JINGA, V.V., SIMIONESCU, M. Osteoblast Ontogeny and implications for bone pathology: an overview. **Cell Tissue Research**, v.355, n.1, p. 23-33, 2014.
48. TOLEDO FILHO, J.L., MARZOLA, C., SANCHEZ, R., PILAR, M. Os enxertos ósseos e de biomateriais e os implantes osseointegrados. **BCI**, v.8 (30), p.126-43, 2001 abr./jun.
49. TSUKANAKA, M., FUJIBAYASHI, S., OTSUKI, B., TAKEMOTO, M., MATSUDA, S. Osteoinductive potential of highly purified porous b-TCP in mice. **Journal of materials science Materials in medicine**, v.26 (3), p.132, 2015.
50. UGARTE, J.F.O., SENA, L.A., PÉREZ, C.A.C., AGUIAR, P.F., ROSSI, A.M., SOARES, G.A. Influence of processing parameters on structural characteristics of porous calcium phosphate samples: A study using an experimental design method. **Materials Research**, v.8, No. 1, p.71-76, 2005.
51. VASHIST, A., GUPTA, Y. K., AHMAD S. Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body. **J Mater Chem B**, v.2, p.147, 2014.
52. VÁZQUEZ, J.A., AMADO, I.R., MONTEMAYOR, M.I., FRAGUAS, J., GONZÁLEZ, M.P., MURADO, M.A. Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: characteristics, applications and eco-friendly processes: A Review. **Mar Drugs**, v.11, p.747-774, 2013.

53. VENKATESAN, J., PALLELA, R., BHATNAGAR, I. Chitosan–amylopectin/hydroxyapatite and chitosan – chondroitin sulphate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Int J Biol Macromol**, v.51 (5), p.1033-42, 2012.
54. VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos de metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.43, n.6, p.415-422, 1999.
55. YEONG, K.C., WANG, J., NG, S.C. Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO₄. **Biomaterials**, v.22, p.2705, 2001.
56. ZHU, J., MARCHANT, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. **Expert Rev Med Devices**, v.8, p.607, 2011.

10.1. PROTOCOLO PARA INCLUSÃO EM PARAFINA

DESIDRATAÇÃO

ÁLCOOL 80% -----	1 HORA
ÁLCOOL 90% -----	1 HORA
ÁLCOOL 100% I -----	1 ½ HORA
ÁLCOOL 100% II -----	1 HORA
ÁLCOOL 100% III -----	1 HORA
XILOL -----	2 ½ HORAS
PARAFINA I -----	1 HORA
PARAFINA II -----	DIA SEGUINTE

10.2. PROTOCOLO COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA

ESTUFA -----	15'
XILOL I -----	10'
XILOL II -----	15'
ÁLCOOL 100% I -----	1'
ÁLCOOL 100% II -----	1'
ÁLCOOL 90% -----	1'
ÁLCOOL 80% -----	1'
SUPERCOLA -----	1'

ESTUFA 30''

ÁLCOOL 70% -----	1'
H2O DESTILADA -----	1'
HEMATOXILINA -----	30''

LAVAR
REPOUSAR 5 A 10'

EOSINA ----- 10''

LAVAR
REPOUSAR 5 A 10'

ÁLCOOL 80% ----- PASSAR

ÁLCOOL 90% ----- PASSAR

ÁLCOOL 100% I ----- 5'

ÁLCOOL 100% II ----- 5'

CAPELA

XIOL ALCOOL ----- PASSAR

XIOL I ----- 5'

XIOL II ----- 5'

MONTAR

10.3. PROTOCOLO COLORAÇÃO AZAN-MALLORY

ESTUFA ----- 15'

XIOL I ----- 10'

XIOL II ----- 15'

ÁLCOOL 100% I ----- 1'

ÁLCOOL 100% II ----- 1'

ÁLCOOL 90% ----- 1'

ÁLCOOL 80% ----- 1'

SUPERCOLA ----- 1'

ESTUFA 30''

ÁLCOOL 70% ----- 1'

H2O DESTILADA ----- 1'

AZO CARMIN-----	20'
H2O DESTILADA -----	10'
ÁLCOOL 70%-----	PASSAR
H2O DESTILADA-----	ENXAGUAR
ÁCIDO FOSFOTUNGSTICO -----	15'
AZUL DE ANILINA -----	10'
ÁLCOOL 90% -----	PASSAR
ÁLCOOL 100% I -----	5'
ÁLCOOL 100% II -----	5'

CAPELA

XIOL ALCOOL -----	PASSAR
XIOL I -----	5'
XIOL II -----	5'

MONTAR

10.4. PROTOCOLO IMUNO-HISTOQUÍMICA PADRÃO

DESPARAFINIZAR E HIDRATAR

ESTUFA-----	15'
XIOL 1-----	15'
XIOL 2-----	15'

ESTUFA 36 °C POR 24 HORAS

ÁLCOOL 100% 1-----	5'
ÁLCOOL 100% 2-----	5'
ÁLCOOL 90%-----	5'
ÁLCOOL 80%-----	5'
ÁLCOOL 70%-----	5'
ÁGUA DESTILADA-----	5'

ESTUFA 36 °C POR 72 HORAS

BLOQUEIO PEROXIDASE ENDÓGENA-----10'

*LAVAR EM ÁGUA DESTILADA

*LAVAR EM TRIS – DUAS LAVAGENS DE 7'

*DEMARCAR OS CORTES COM CANETA HIDROFÓBICA

*BLOQUEIO COM BSA (10MINUTOS) – HISTOSTAIN – 2 GOTAS DE SOLUÇÃO
BLOQUEADORA REATIVO A EM CADA CORTE

*ENCUBAR EM ANTICORPO PRIMÁRIO (OVERNIGHT)

*LAVAR EM TRIS DUAS LAVAGENS DE 7'

*INCUBAR EM AC SECUNDÁRIO – HISTOSTAIN – 2 GOTAS DE REATIVO B EM
CADA CORTE POR 10'

*LAVAR EM TRIS DUAS LAVAGENS DE 7'

*INCUBAR EM AB – HISTOSTAIN – ADICIONAR 2 GOTAS DE REATIVO C EM
CADA CORTE E INCUBAR POR 10'

*LAVAR EM TRIS, DUAS LAVAGENS DE 7'

*REVELAR COM DAB (LUZ APAGADA)

*CONTRACOLORAÇÃO COM HEMATOXILINA DE MAYER? (NÃO
NECESSARIAMENTE)

ÁLCOOL 95%-----1'

ÁLCOOL 100%-----5'

XIOL ALCOOL-----PASSAR

XIOL 1-----5'

MONTAR

