

UFBA

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde

GEORGE GONÇALVES DOS SANTOS

PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DO REPARO ÓSSEO APÓS
IMPLANTAÇÃO DE ARCABOUÇOS DE WOLLASTONITA E FOSFATO
DE TRICÁLCIO

Salvador
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



**PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



GEORGE GONÇALVES DOS SANTOS

**ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DO REPARO ÓSSEO APÓS
IMPLANTAÇÃO DE ARCABOUÇOS DE WOLLASTONITA E FOSFATO
DE TRICÁLCIO**

Salvador
2019

GEORGE GONÇALVES DOS SANTOS

**ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DO REPARO ÓSSEO APÓS
IMPLANTAÇÃO DE ARCABOUÇOS DE WOLLASTONITA E FOSFATO
DE TRICÁLCIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadores: Prof.^a Dr.^a Fabiana Paim Rosa
Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo
Coorientador: Prof. Dr. Fúlvio Borges Miguel

Salvador
2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S237 Santos, George Gonçalves dos.
Estudo histomorfométrico do reparo ósseo após implantação de arcabouços de wollastonita e fosfato de tricálcio / George Gonçalves dos Santos. - Salvador, 2019.
91 f. ; il.

Orientadores: Prof.^a Dr^a Fabiana Paim Rosa e Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo.

Coorientador: Prof. Dr. Fúlvio Borges Miguel.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2019.

1. Compósitos. 2. Fosfatos de cálcio. 3. Silicato de cálcio. 4. Regeneração óssea. I. Rosa, Fabiana Paim. II. Araújo, Roberto Paulo Correia de. III. Miguel, Fúlvio Borges. IV. Universidade Federal da Bahia. V. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA PÚBLICA DE TESE

GEORGE GONÇALVES DOS SANTOS

Estudo Histomorfométrico do Reparo Ósseo após Implantação de Scaffolds de
Wollastonita e Fosfato de Tricálcio

Salvador, Bahia 19 de dezembro 2019

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF DR GILDÁSIO DE CERQUEIRA DALTRO (Universidade Federal da Bahia)

PROFA DRA ISABELA CERQUEIRA BARRETO (Universidade Federal da Bahia)

PROF DR FÚLVIO BORGES MIGUEL (Universidade Federal do Recôncavo da Bahia)

PROF/DR MARCUS VINÍCIUS LIA FOOK (Universidade Federal de Campina Grande)

PROFA DRA ELIANA CRISTINA DA SILVA RIGO (Universidade de São Paulo)

Dedico este trabalho à minha querida orientadora, Prof.^a Dr.^a Fabiana Paim Rosa...

Primeiramente, por ter me recebido de braços abertos e acreditado em minha trajetória. Muito grato pela oportunidade, confiança, ensinamentos, conselhos olho no olho, e por ter viabilizado todas as etapas desta longa caminhada. Obrigado por ser referência e espelho para todos os que puderam ter o prazer de conhecê-la de perto.

Parabéns pelo seu trabalho e pelos seus pupilos!

A senhora é uma grande e vitoriosa mulher!

Que Deus esteja com a senhora, hoje e sempre!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado vida em abundância. Pelos inúmeros e inesquecíveis milagres e maravilhas que marcaram minha trajetória acadêmica, testemunhados por familiares, amigos e professores. Sem Ele, eu não seria nada. Que a minha vida nesta Terra seja, apenas, um exemplo do poder de Deus na vida dos seus filhos. Toda a conquista foi por Ele e para Ele.

À minha amada mãe, Marinalva Ramos Gonçalves dos Santos, pelo amor incondicional, intenso e fervoroso. Agradeço por ter me protegido de tudo. Obrigado por ter me dado a alegria de ter uma “mãe de verdade” e sentir o poder do maior amor que um ser humano pode expressar por outro.

Ao meu amado pai, Miguel da Lapa Bispo dos Santos, pelo amor irrefutável, e por todo o apoio dado em todas as minhas escolhas profissionais e pessoais. Agradeço pela educação dada, pelos conselhos, pelo alicerce e ter por acreditado no meu futuro.

Ao querido Prof. Dr. Fúlvio Borges Miguel, por ter acreditado em mim desde o primeiro encontro. Obrigado por ter me ensinado tudo que esteve ao seu alcance, por me ajudar a ser um ser humano melhor e enxergar as situações de uma forma diferente e mais saudável. Grato por ter ajudado e contribuído para a grande mudança da minha vida e da minha história.

Ao Prof. Dr. Roberto Paulo Araújo, pela disposição ímpar, por todo o apoio e colaboração durante minha caminhada. Obrigado pela confiança, e por ter enxergado e valorizado minha dedicação.

Ao Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior, pela dedicação, pela disposição, e pela gentileza durante os valiosos ensinamentos durante as etapas finais desta trajetória.

Ao Prof. Dr. Raúl García Carrodegus, pela ousada concepção científica deste trabalho, síntese e concessão dos biomateriais.

Aos pesquisadores do CERTBIO, em especial, Dr. Willams Teles Barbosa, e Dr.^a Katilayne Vieira de Almeida pela síntese, caracterização e concessão dos biomateriais.

À Renata dos Santos Almeida, pelo apoio e ensinamentos nas análises histomorfométricas.

À Luisa Queiroz Vasconcelos, pela presença constante, por todo o cuidado e disposição em ajudar sempre que necessitei de apoio.

À querida Prof.^a Dr.^a Isabela Barreto, pela confiança, pelo incentivo diário e constante, e pelas palavras de cuidado e amizade.

Ao meu irmão, Miguel Gonçalves dos Santos, pelo apoio durante as inúmeras e cansativas, porém alegres, viagens entre Salvador e Santo Antônio de Jesus, sempre disposto a ajudar quando precisasse.

À minha amada Thailany de Almeida Magalhães, pelo apoio, paciência, companheirismo, amor, carinho e cuidado ímpares e fundamentais.

À querida Isadora Nadinne, pelas orações, preocupação, cuidado, presença e apoio diários, durante toda a minha trajetória.

Ao amigo Júnior Brandão, do Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana, pela parceria, profissionalismo, paciência e dedicação.

Ao amigo Izamir Resende Junior Borges Miguel, pela ajuda nas etapas fundamentais para a conclusão deste trabalho. Obrigado pela paciência, pela calma e pelas leves palavras.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais.

À Elisângela Ribeiro dos Santos, pelas orações, cuidado, dedicação e profissionalismo no processamento histológico.

Aos colegas e secretários do programa de pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia.

Aos meus familiares, pelas orações, pelas palavras de apoio, pelo carinho e por terem

acreditado em meu potencial.

Aos meus amigos e amigas, pelo toque de leveza, alegria, descontração e emoção durante minha trajetória.

Aos amigos, professores e colegas do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelos fomentos.

Aos animais, seres fundamentais para a viabilidade técnica deste trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desta jornada.

SANTOS, George Gonçalves dos. **Estudo Histomorfométrico do Reparo Ósseo após Implantação de Arcabouços de Wollastonita e Fosfato de Tricálcio**. Orientadores: Fabiana Paim Rosa e Roberto Paulo Correia de Araújo. 2019. 91 f. il. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

RESUMO

Introdução: Na busca de fornecer condições favoráveis à regeneração óssea e restabelecer estética e funcionalmente as lesões/defeitos ósseos críticos, diferentes biomateriais têm sido desenvolvidos e avaliados, em especial os biocerâmicos. Dentre estes, a wollastonita (W) tem se destacado, nos últimos anos, devido à sua bioatividade e capacidade de estabilização em meios úmidos. Além desta biocerâmica, o fosfato de tricálcio (TCP) vem sendo largamente utilizado durante décadas devido à biocompatibilidade, osteocondutividade e osteoindutividade. Todavia, a biodegradação desta biocerâmica, assíncrona ao mecanismo de neoformação óssea, limita sua aplicação em perdas ósseas extensas. Diante disto, os biomateriais compósitos têm se destacado, pois combinam propriedades desejáveis de cada material isolado. Sendo assim, associar as propriedades favoráveis do W e do TCP torna-se promissor para o reparo ósseo. **Objetivo:** O propósito deste trabalho foi investigar, por meio de revisão sistemática e metanálise, e avaliar, mediante estudo experimental, o potencial osteogênico de biomateriais compósitos contendo W e TCP, após implantação *in vivo*. **Metodologia:** Elaborou-se uma revisão sistemática e metanálise de estudos *in vivo* que avaliaram histomorfometricamente o percentual de neoformação óssea após implantação de biomateriais compósitos de W/TCP. Paralelamente, procedeu-se o estudo histomorfométrico do reparo de defeito ósseo crítico na calvária de rato mediante implantação de arcabouços de compósitos contendo W e fosfato de β -tricálcio (β -TCP), em diferentes percentuais de associação: 20W/80 β -TCP (% m/m), 60W/40 β -TCP (% m/m) e 80W/20 β -TCP (% m/m), avaliados nos pontos biológicos de 15 e 45 dias de pós-operatório. **Resultados:** A partir da investigação dos estudos, a metanálise evidenciou que os biomateriais compósitos de W/TCP processados no formato de arcabouço, apresentam maior percentual de neoformação óssea, *in vivo*, em relação ao formato de microesferas. Ao longo do estudo experimental, os arcabouços de compósitos contendo 20W/80 β -TCP (% m/m) apresentaram maior potencial osteogênico (51%) e características promissoras para aplicações clínicas. **Conclusão:** Conclui-se que os arcabouços de compósitos de W/ β -TCP, nos seus mais variados percentuais de associação, apresentaram potencial osteogênico promissor para a regeneração óssea em casos de perdas extensas.

Palavras-chave: Compósitos. Fosfatos de cálcio. Silicato de cálcio. Regeneração óssea.

SANTOS, George Gonçalves dos. **Histomorphometric Study of Bone Repair after Implantation of Scaffolds of Wollastonite and Tricalcium Phosphate**. Tutors: Fabiana Paim Rosa and Roberto Paulo Correia de Araújo. 2019. 91 f. il. Thesis (Ph.D. degree in Interactive Processes of Organs and Systems) – Health Science Institute, Federal University of Bahia, Salvador, 2019.

ABSTRACT

Introduction: In the search to provide favorable conditions for bone regeneration and to restore aesthetically and functionally critical bone lesions/defects, different biomaterials have been developed and evaluated, especially bioceramics. Among these, wollastonite (W) has stood out, in recent years, as a consequence of its bioactivity and ability to stabilize in wet environments. In addition to this bioceramics, tricalcium phosphate (TCP) has been widely used for decades as a result of presenting biocompatibility, osteoconductivity and osteoinductivity. However, the biodegradation of this bioceramic, asynchronous to the bone neoformation mechanism, limits its application in extensive bone losses. In view of this, composite biomaterials have stood out, as they combine desirable properties of each isolated material. Thus, associating the favorable properties of W and TCP becomes auspicious for bone repair. **Objective:** The purpose of this work was to investigate, through systematic review and meta-analysis, and to evaluate, through experimental study, the osteogenic potential of composite biomaterials containing W and TCP, after *in vivo* implantation. **Methodology:** A systematic review and meta-analysis of *in vivo* studies that histomorphometrically evaluated the percentage of bone neoformation after implantation of composite biomaterials of W/TCP. In parallel, a histomorphometric study of the repair of critical bone defect in rat calvaria was carried out by implanting composite frameworks containing W and β -tricalcium phosphate (β -TCP), in different association percentages: 20W/80 β -TCP (wt. %), 60W/40 β -TCP (wt. %) and 80W/20 β -TCP (wt. %), evaluated at the biological points of 15 and 45 days postoperatively. **Results:** Based on the investigation of the studies, the meta-analysis showed that the composite W/TCP biomaterials processed in the scaffold format, present a higher percentage of bone neoformation, *in vivo*, in relation to the microsphere format. Throughout the experimental study, composite scaffold containing 20W/80 β -TCP (wt. %) showed greater osteogenic potential (51%) and promising characteristics for clinical applications. **Conclusion:** In conclusion, the scaffolds containing W/ β -TCP composites, in their most varied percentages of association, presents promising osteogenic potential for bone regeneration in cases of extensive losses.

Keywords: Composites. Calcium phosphates. Calcium silicate. Bone regeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

- Fig. 1 -** Flowchart of the search and selection of articles in the databases..... 38

ARTIGO 2

- Fig. 1 -** (a) FTIR of wollastonite powder. (b) FTIR of β -TCP powder..... 48
- Fig. 2 -** 3D Scaffolds production using the polyurethane sponge impregnation method..... 49
- Fig. 3 -** SEM of the 3D scaffolds. (a) 20W/80 β -TCP (wt. %), (b) 60W/40 β -TCP (wt. %) and (c) 80W/20 β -TCP (wt. %)...... 50
- Fig. 4 -** XRD of the scaffolds. (a) 20W/80 β -TCP (wt. %), (b) 60W/40 β -TCP (wt. %) and (c) 80W/20 β -TCP (wt. %)...... 52
- Fig. 5 -** Photomicrograph of the W-20, after 15 days of implantation of the biomaterials..... 55
- Fig. 6 -** Photomicrograph of the W-60, after 15 days of implantation of the biomaterials..... 57
- Fig. 7 -** Photomicrograph of the W-80, after 15 days of implantation of the biomaterials..... 59
- Fig. 8 -** Photomicrograph of the W-20, after 45 days of implantation of the biomaterials..... 61
- Fig. 9 -** Photomicrograph of the W-60, after 45 days of implantation of the biomaterials..... 63
- Fig. 10 -** Photomicrograph of the W-80, after 45 days of implantation of the biomaterials..... 65
- Fig. 11 -** Photomicrograph of the defect filling up in the three experimental groups, throughout the experiment..... 67

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tab. 1 - <i>In vivo</i> studies of W/TCP composites.....	39
Tab. 2 - Statistical analysis according to the shape of the biomaterial.....	40
Tab. 3 - Statistical analysis according to the percentage (wt. %) of W/TCP association and the format of the biomaterial.....	41

ARTIGO 2

Tab. 1 - Linear extension (mm) of defect filling up by neoformed bone in relation to the total linear extension of the defect. Means, standard deviation and percentage.....	68
Tab. 2 - Area (mm ²) of defect filling up by neoformed bone in relation to the total defect. Means, standard deviation and percentage.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS, EXPRESSÕES, FÓRMULAS E SIGLAS

3D -	Tridimensional
<i>ad libitum</i> -	Expressão latina que significa “à vontade”
ANOVA -	<i>Analysis of Variance</i>
BE -	<i>Bone edge</i>
BM -	<i>Bone marrow</i>
BVS -	Biblioteca Virtual em Saúde
Ca -	Cálcio
Ca(AlO ₂) ₂ -	Aluminato de cálcio
Ca(OH) ₂ -	Hidróxido de cálcio
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ -	Fórmula química da hidroxiapatita
Ca ²⁺ -	Íon(s) de cálcio
CaP -	Fosfato(s) de cálcio
CAPES -	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CaSiO ₃ -	Metassilicato(s) de cálcio
CI -	<i>Chronic granulomatous inflammation</i>
CL -	<i>Cementing lines</i>
CS -	<i>Calcium silicate(s)</i>
CSIC -	Instituto de Cerámica y Vidrio
CV -	<i>Central vein</i>
DeCS -	Descritores em Saúde
DM -	<i>Duma mater region</i>
ECM -	<i>Extracellular matrix</i>
<i>et al.</i> -	Expressão latina que significa “e outros”
FCT -	<i>Fibrous connective tissue</i>
FTIR -	<i>Fourier Transform Infrared Spectrophotometer</i>
H ₃ PO ₄ -	<i>Orthophosphoric acid</i>
HA -	Hidroxiapatita
HE -	<i>Hematoxylin-Eosin</i>

HS -	<i>Haversian systems</i>
IBM -	<i>International Business Machines</i>
JCPDS -	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
LAS -	<i>Leica Application Suite</i>
LBTB -	Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais
LCT -	<i>Less connective tissue</i>
LTDA -	Limitada
MeSH -	<i>Medical Subject Headings</i>
NB -	<i>Neoformed Bone</i>
NIH -	<i>National Institute of Health</i>
OM -	<i>Osteoid matrix</i>
P -	Fósforo
PIFG -	<i>Picrosirius red</i>
PO ₄ ³⁻ -	Fosfato
S/C -	Sociedades civis
SC -	Silicato(s) de cálcio
SCF -	<i>Scaffold</i>
SciELO -	<i>Scientific Electronic Library Online</i>
SEM -	<i>Scanning electron microscopy</i>
Si -	Silício
SiO ₃ ²⁻ -	Silicato(s)
Si-OH -	Silanol
SPSS -	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCP -	Fosfato de tricálcio
v. -	Volume
VC -	<i>Vascular channel</i>
VHL -	<i>Virtual Health Library</i>
W -	Wollastonita
W/TCP -	Wollastonita/Fosfato de tricálcio
W/ β -TCP -	Wollastonita/Fosfato de β -tricálcio
XRD -	<i>X-ray diffraction</i>
α -TCP -	Fosfato de α -Tricálcio
β -TCP -	Fosfato de β -tricálcio

LISTA DE ESCALAS, NOTAÇÕES E SÍMBOLOS

μm -	Micrômetro(s)
cm -	Centímetro(s)
$\text{Cu}\alpha$ -	Tipo de radiação
KBr -	Brometo de potássio
m/m % -	Massa massa
mm^2 -	Milímetros quadrados
ppi -	Poros por polegada
ppm -	Partes por milhão
s -	Segundo(s)
wt. %	<i>Percentage by weight</i>
α -	Alfa
β -	Beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA.....	20
2.2	SILICATOS DE CÁLCIO (SC).....	21
2.2.1	Wollastonita (W)	23
2.3	FOSFATOS DE CÁLCIO (CaP).....	24
2.3.1	Fosfato de tricálcio (TCP)	24
2.4	COMPÓSITOS BIOCERÂMICOS.....	25
2.5	COMPÓSITOS DE W/TCP.....	26
2.6	ARCABOUÇOS DE COMPÓSITO DE W/TCP.....	27
3	JUSTIFICATIVA	29
4	HIPÓTESES	31
5	OBJETIVOS	33
5.1	OBJETIVO GERAL.....	34
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
6	ARTIGOS	35
6.1	ARTIGO 1.....	36
6.2	ARTIGO 2.....	45
7	DISCUSSÃO	78
8	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	84
	ANEXO	90

1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, nota-se, em nível mundial, a necessidade de ampliar a acessibilidade aos recursos e/ou tratamentos que utilizam as novas tecnologias da saúde, diante do aumento na incidência das morbidades associadas ao fenômeno de globalização. Dentro deste cenário, os pesquisadores e profissionais da área da bioengenharia tecidual têm buscado alternativas para a reabilitação física, melhoria da qualidade de vida e autoestima dos indivíduos acometidos por traumas, ressecções, infecções, neoplasias, doenças congênitas e outras afecções que resultam em perdas ósseas extensas, condições em que a regeneração óssea espontânea torna-se limitada. Estas situações, de modo geral, provocam deformidades significativas e até disfunções de membros por completo, o que gera a necessidade da realização de múltiplos procedimentos cirúrgicos reparadores a longo prazo. Além disto, estes problemas acarretam em comprometimento das funções laborais rotineiras e, em casos mais graves, geram invalidez que, direta e/ou indiretamente, oneram o sistema público de saúde, além de causar outros problemas de natureza sanitária e socioeconômica.

Durante a realização dos procedimentos cirúrgicos reparadores do tecido ósseo, a utilização do osso autógeno seria a abordagem ideal, pois este enxerto, considerado padrão-ouro, é biocompatível e osteogênico. No entanto, em especial nas perdas ósseas extensas, sua disponibilidade está limitada, tendo em vista que sua obtenção e oferta estão associadas à morbidade do sítio doador e risco de infecções cruzadas. Sendo assim, torna-se premente o desenvolvimento de biomateriais que mimetizem as características morfofuncionais do tecido ósseo, modulem os eventos fisiológicos envolvidos no mecanismo de regeneração óssea, sejam reprodutíveis em larga escala e economicamente viáveis.

Neste contexto, nas últimas décadas, em todo o mundo, os cientistas da bioengenharia tecidual óssea, área interdisciplinar e multiprofissional, têm focado na produção e no aperfeiçoamento de biomateriais, principalmente no formato de arcabouços, materiais artificiais com estrutura tridimensional (3D) utilizados para apoiar/sustentar a neoformação tecidual.¹ Estes materiais são promissores para aplicações no tecido ósseo devido à sua estrutura 3D com poros interconectados, essencial para os eventos celulares e mecanismos envolvidos na angiogênese, histogênese e osteogênese. Além disto, os arcabouços, ao contrário do enxerto ósseo autógeno, não requerem nenhuma cirurgia adicional nos pacientes, pois podem ser obtidos a partir de materiais biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis.

Dentre os materiais utilizados para a síntese dos arcabouços, a wollastonita (W), um silicato de cálcio (SC) composto essencialmente de silício (Si) e íons de cálcio (Ca^{2+}), tem se destacado nos últimos anos, em função da sua bioatividade e capacidade de estabilização em meios úmidos. Além da W, o fosfato de tricálcio (TCP), da família dos fosfatos de cálcio

(CaP), tem sido amplamente utilizado, devido à sua osteocondutividade, osteoindutividade, por ser composta basicamente de íons de fosfato (PO_4^{3-}) e Ca^{2+} , componentes da fase inorgânica do tecido ósseo, e por ser biodegradável e/ou biorreabsorvível. Estas últimas características, de modo geral, ocorrem de forma acentuada *in vitro* e *in vivo*, assíncrona ao mecanismo de regeneração óssea.

Tendo em vista as suas composições iônicas e às propriedades físico-químicas destas duas biocerâmicas, propícias para a osteogênese, os pesquisadores têm associado a W com o TCP para a síntese de compósitos, capazes de unir as características de cada material em um único biomaterial. Além destas vantagens, a concepção de compósitos possibilita uma gama de misturas e percentuais de associação que viabilizam adequações no comportamento biológico dos biomateriais em comparação àquelas apresentadas quando aplicados de forma individual. Desta forma, obter-se-á, arcabouços de compósitos de W/TCP promissores para a regeneração óssea.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

O esqueleto humano adulto, em condições fisiológicas, é composto de 206 ossos, com diferentes formas, tamanhos e densidades.² Estas estruturas, além de exercer funções mecânicas, participam da hematopoese; do armazenamento de Ca^{2+} e fósforo (P); da regulação do pH sanguíneo; e do acúmulo e excreção de metais pesados e substâncias tóxicas do organismo.²

O tecido ósseo é um tipo de conjuntivo especializado composto, principalmente, por fibras de colágeno do tipo I, em sua porção orgânica, associadas a cristais inorgânicos de hidroxiapatita (HA) – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.² Este tecido apresenta capacidade remodelativa e reparativa que, em condições fisiológicas, consolida-se por regeneração. Durante estes eventos, a angiogênese e a neovascularização são fatores críticos que, além de fornecer nutrientes, viabilizam diversas atividades celulares complexas que estão implicadas, diretamente, no mecanismo de reparo ósseo, tais como migração, fixação, proliferação e diferenciação.²⁻⁶ Estes mecanismos fisiológicos dependem, dentre outros fatores, da interação entre alguns elementos interdependentes, tais como fatores de crescimento, células osteoprogenitoras, células-tronco mesenquimais e derivadas da medula óssea. Estas últimas, são capazes de diferenciar-se em células de linhagem osteogênica e promover a síntese de colágeno e proteínas específicas, fundamentais para a mineralização óssea.⁷

Todavia, o mecanismo de reparo de lesões ósseas extensas e/ou defeitos ósseos de dimensões críticas – definidos originalmente por Schmitz e Hollinger⁸ como “menor lesão intra-óssea, em um osso e espécie em particular, que não se regenera espontaneamente durante toda a vida do animal” – consolida-se por fibrose, devido à falta de um arcabouço que viabilize os eventos celulares e de suprimento sanguíneo adequado.^{4,6,9} Nestas situações, torna-se indispensável restaurar a estrutura e as funções metabólicas do tecido ósseo natural, em um menor intervalo de tempo possível.^{6,7} Sendo assim, nas situações em que há perda óssea volumosa, resultantes de acidentes, ressecções cirúrgicas, doenças e infecções graves, torna-se necessária a utilização de substitutos ósseos nas áreas comprometidas ou destruídas.²

Em algumas situações, durante o reparo ósseo, para adequar-se e atender às diferentes aplicações clínicas, faz-se necessária a utilização de biomateriais bioativos e/ou biodegradáveis, haja vista que o enxerto autógeno é considerado o padrão-ouro, por possuir todas as características indispensáveis para a neoformação óssea, tais como osteocondutividade e osteoindutividade.¹⁰⁻¹² Contudo, sua utilização está restrita a algumas aplicações, devido à disponibilidade limitada e morbidade do sítio doador. Assim, a projeção

de biomateriais tornou-se a alternativa promitente, em vista à possibilidade de controlar e adequar suas propriedades físico-químicas de acordo com cada tipo de aplicação.^{10,11}

Neste contexto, onde a utilização dos biomateriais tornou-se indispensável, os arcabouços surgiram como alternativa promissora.^{5,13-15} Estes materiais apresentam geometria estrutural que favorece a angiogênese e a neovascularização, além de possibilitar maior controle das propriedades físico-químicas, tais como biodegradação e/ou biorreabsorção. Além do mais, são reprodutíveis e estão associados a baixas taxas de complicações cirúrgicas.³⁻⁵ Apesar disto, o desenvolvimento de arcabouços considerados apropriados ainda representa um desafio para os cientistas.

Dentre os materiais utilizados para a síntese de arcabouços, as biocerâmicas à base de SC, como W, e de CaP, como o TCP, têm sido testados nos últimos anos e apresentado resultados promissores devido, principalmente, à bioatividade e osteocondutividade, respectivamente. A associação destes materiais para a síntese dos chamados compósitos, além de unir as propriedades da W e do TCP em um único biomaterial, possibilita uma variedade de misturas e proporções que podem viabilizar o controle da taxa de biodegradação e, conseqüentemente, adequações nas interações entre o biomaterial e o tecido ósseo.^{3,5,10,16}

2.2 SILICATOS DE CÁLCIO (SC)

Os vidros bioativos (biovidros) têm sido considerados biomateriais promissores para regeneração óssea na atualidade,¹⁷ notadamente devido às possibilidades de obter composições variadas e de aprimorar suas propriedades por meio de alterações na composição química inicial. Desta forma, tendo em vista a complexidade da composição química dos vidros bioativos, têm-se optado por materiais cerâmicos binários, tais como os SC.¹⁷

Embora o Si seja um componente importante do solo, no ambiente, esse oligoelemento está presente, também, nos tecidos humanos e de outros animais, distribuído de forma mais abundante nos ossos, nos tendões, nos músculos, nos cabelos, nas penas e na derme.¹⁸ O Si constitui certos glicosaminoglicanos e poliuonídeos, onde se encontra firmemente ligado à matriz polissacarídica. No organismo humano, as concentrações de Si variam de 0,6 ppm para soro a 41 ppm para músculo, e a 57 ppm para o tecido pulmonar. Em outras espécies de animais, como ratos e macacos, as concentrações de Si são semelhantes às dos seres humanos, cerca de 25 ppm no fêmur e <1 ppm no soro.¹⁸

Os SC são materiais binários compostos, principalmente, por partículas hidrofílicas de silicato de dicálcio e silicato de tricálcio.^{17,19-21} Quando hidratados, estes materiais sofrem uma

série de reações físico-químicas que resultam na formação de um gel nano-poroso de hidratos de SC, uma fração solúvel de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ou portlandita, e aluminato de cálcio ($\text{Ca}(\text{AlO}_2)_2$) hidratado. Estes materiais possuem a propriedade de se estabelecer em ambientes úmidos, como água, sangue e outros fluidos corpóreos, sendo, portanto, promissores para cirurgias odontológicas e ortopédicas.¹⁹⁻²¹ Além destas propriedades químicas, físicas e biológicas, os SC são capazes de liberar Ca^{2+} e de formar apatita na presença de fluidos corporais simulados contendo PO_4^{3-} ²² e demonstraram ser melhores ao promover a regeneração óssea *in vivo* quando comparado com o TCP.²³ Por isto, estes materiais surgem como novos tipos de biocerâmicas propícias para diferentes aplicações na regeneração do tecido ósseo.^{3,20,24-27}

Alguns materiais que contêm Si são biodegradáveis, biorreabsorvíveis e demonstraram maior bioatividade do que os materiais à base de CaP.^{20,22,23,28} Além disso, o Si há muito tempo foi reconhecido por ter papel na formação óssea²⁰, podendo ser comparado ao Carbono, por exemplo. Este íon está situado em locais ativos de ossificação e, diretamente, incluído no processo de mineralização e crescimento ósseo.²⁶ Muito embora os mecanismos exatos relacionados à ação do Si no tecido ósseo ainda não estejam totalmente elucidados, tanto um papel estrutural quanto metabólico tem sido proposto.²⁷ Estes materiais apresentaram maior taxa de dissolução do que outros tipos de biocerâmicas, o que levaria a uma maior atividade iônica da apatita em determinadas soluções.^{17,21,22}

De acordo com o mecanismo de formação de apatita na superfície dos SC, os íons de Ca^{2+} inicialmente se desprendem da superfície do material, causam supersaturação nos fluidos onde estão imersos e dão origem à formação de grupos silanol (Si-OH) na superfície do material, a qual se torna propícia para nucleação e cristalização da apatita.^{17,22,28,29} A presença dos grupos Si-OH parece promover a adesão e o crescimento das células ósseas.^{21,28,29} Deste modo, assim que os núcleos de apatita são formados, crescem espontaneamente integrando os íons de Ca^{2+} e de PO_4^{3-} do fluido circunjacente.¹⁷

Os cimentos à base de SC, por exemplo, foram utilizados em diferentes aplicações na odontologia.^{19,21,24} Todavia, o uso destes materiais nesta área apresenta algumas desvantagens, principalmente em relação ao manuseio.^{19,21} Estas limitações têm despertado interesse no desenvolvimento de compósitos, que mimetizam, em algum grau, a estrutura do tecido ósseo.⁴

A inclusão de compostos químicos adicionais nos cimentos à base de SC produz pequenas alterações no tempo de endurecimento e expansão destes biomateriais, de modo que podem ser adicionados na sua composição para adequar as propriedades biológicas dos cimentos.¹⁹

Dentre os SC, a W se destacou, nos últimos anos, devido à sua estabilização em meios úmidos e bioatividade, que a torna adequada para utilização em técnicas regenerativas ósseas.¹⁹⁻²¹

2.2.1 Wollastonita (W)

A W é um mineral, de origem natural ou sintética, acicular, não metálico, pertencente à classe dos metassilicatos de cálcio (CaSiO_3) que foi utilizado, por muito tempo, na síntese de materiais cerâmicos tradicionais, tais como tijolos, tubos e preenchimentos de pinturas e plásticos.³⁰⁻³³ Este material possui elevada ação fundente, o que possibilita a diminuição do ponto de maturação dos corpos cerâmicos. Além disto, não libera gases durante o processo de combustão.³⁰ Desta forma, a W propicia rápido resfriamento durante a queima sem tensionamentos na sua microestrutura, tendo em vista que não sofre transformações de fases.³⁰

Para fins biomédicos, a W tem sido sintetizada, processada e utilizada em diferentes formatos e formas geométricas de apresentação, tais como revestimentos de materiais metálicos, grânulos, ou arcabouços sinterizados ou não-sinterizados.^{14,15} Isto, devido ao fato de que, quando comparada com os outros materiais de substituição óssea, utilizados clinicamente, tais como o CaP, a W apresenta maior bioatividade por efeito da liberação de Ca^{2+} e silicato (SiO_3^{2-}), substanciais durante o mecanismo de osteogênese.^{15,17,34} Destaca-se, porém, que diferentes concentrações iônicas de Si, para além do Ca^{2+} e do SiO_3^{2-} , podem ser responsáveis pela disparidade na proliferação celular em resposta aos biomateriais.²³

O Si promove a neovascularização, por meio da indução, direta ou indireta, da liberação de fatores angiogênicos pelos fibroblastos, que ativam seus receptores nas células endoteliais e iniciam a cascata de reações químicas envolvidas no mecanismo de angiogênese.^{4,7,9} Sendo assim, embora o Si, documentadamente, promova de diferenciação celular, a relação entre a concentração deste íon e a resposta celular ainda não está totalmente esclarecida.¹⁶ Além disto, concentrações muito altas de Si parecem causar morte celular.^{27,35}

Quando utilizada para compor arcabouços e vidros bioativos, a W possibilita a obtenção de materiais biocompatíveis, biodegradáveis, osteocondutores, com notória bioatividade, e propriedades mecânicas favoráveis à utilização como implantes.^{31,33} Por isto, a utilização da W na síntese de novos biomateriais vem sendo amplamente proposta na área da bioengenharia tecidual óssea, com vistas a melhorar o potencial osteogênico e a osteointegração, o que pode ser modulado à medida que as quantidades e proporções dos materiais que compõem os compósitos são ajustadas.^{31,37}

2.3 FOSFATOS DE CÁLCIO (CaP)

As biocerâmicas de CaP, em especial a HA e o TCP, são materiais que, durante décadas, foram extensivamente utilizados para a síntese e processamento de diferentes biomateriais para regeneração óssea.^{7,27,38} Isto, principalmente, em razão da sua biocompatibilidade, similaridade com a composição química inorgânica da matriz óssea, osteocondutividade, ou seja, possibilitar a adesão, diferenciação e proliferação de células osteoprogenitoras, e a ausência de rejeição imunomediada.^{7,28,34,38}

Dentre os CaP, a HA, além das propriedades supracitadas, não é imunogênica, contudo, quando obtida de forma sintética e submetida ao tratamento térmico em altas temperaturas, apresenta baixa taxa de biodegradação, de modo que limita a consolidação do mecanismo de regeneração óssea, em consequência do longo tempo de permanência no sítio de implantação que pode durar meses e até anos.^{7,34} Além disto, em algumas situações, esta cerâmica possui resistência mecânica limitada,³⁴ atribuída à morfologia aglomerativa dos pós-crus.²⁰ Diante destas limitações, nas últimas décadas os pesquisadores focaram-se, também, na busca de adequações das propriedades físico-químicas do TCP, para melhor aproveitamento das características promissoras deste CaP.

2.3.1 Fosfato de tricálcio (TCP)

O TCP é um CaP que tem sido amplamente utilizado como substituto ósseo devido, principalmente, à sua similaridade química com a apatita biológica presente nos tecidos duros e, também, ao fato de ser um biomaterial osteoindutor.^{4,17,20,23-25,27,28,34} Esta biocerâmica pode ser preparada pelos métodos de reação de precipitação ou estado sólido a partir de precursores de cálcio (Ca) e P, e pode estar disponível em diferentes formas de apresentação, tais como blocos ou grânulos sinterizados a temperaturas elevadas.³⁴

Existem três polimorfos do TCP, o de baixa temperatura, β -TCP, e as duas formas de alta temperatura, α e α' -TCP. Este último tem despertado pouco interesse prático, pois só existe em temperaturas acima de $\cong 1465 \pm 5$ °C e reverte-se para α -TCP pelo resfriamento abaixo da temperatura de transição. Contudo, o β -TCP é estável à temperatura ambiente e transforma-se de forma reconstitutiva à $\cong 1115 \pm 10$ °C em α -TCP, que pode ser retido durante o arrefecimento até à temperatura ambiente.^{27,39,40} Além da temperatura, a biodegradação destes biomateriais está condicionada a outros fatores como pH, concentração iônica do meio,

composição físico-química e cristalinidade. Desta forma, o TCP tem sido obtido a partir de diferentes técnicas como centrifugação, autoclave, a seco e por calcinação.⁴⁰

A estrutura polimorfa do TCP tem recebido destaque em virtude da sua bioatividade, osteocondução e, principalmente, solubilidade e alta taxa de biodegradação e/ou biorreabsorção, *in vitro* e *in vivo*.^{36,38} Estas características favorecem o crescimento celular e a substituição óssea no interior dos materiais à base de TCP. Entretanto, a taxa de reabsorção desta biocerâmica é tão alta que o material é reabsorvido antes mesmo da consolidação do mecanismo de regeneração óssea, embora ainda promova uma integração tecidual pela precipitação de HA, seguida de crescimento ósseo no cristal neoformado.³⁴ Além do mais, o TCP é um biomaterial com baixa resistência mecânica, por isto, de alguma forma, deve ser reforçado antes da implantação *in vivo*.^{4,20,34} Consequentemente, esta biocerâmica tem sido pouco utilizada em aplicações clínicas, de forma individual.^{4,20,23,38} Portanto, torna-se imprescindível a busca por substitutos ósseos mais apropriados, que forneçam suporte para que células osteoprogenitoras depositem matriz osteoide que será, posteriormente, mineralizada, e que exibam uma taxa de biodegradação ideal, compatível e proporcional à velocidade do mecanismo de neoformação óssea.^{4,5,7,28,38}

2.4 COMPÓSITOS BIOCERÂMICOS

Dentre os diferentes materiais utilizados para a síntese de substitutos ósseos, nas últimas décadas, as biocerâmicas representam um dos mais promissores³, principalmente devido sua biocompatibilidade, osteocondutividade e semelhança com a fase inorgânica do tecido ósseo.¹⁶ Além destas propriedades, evidências recentes demonstraram que as biocerâmicas bioativas, ou seus produtos de dissolução, não apenas aumentam a formação óssea, mas também podem estimular a expressão de genes relacionados à angiogênese.⁷ No entanto, estes materiais apresentam algumas desvantagens, principalmente a baixa resistência mecânica e a fragilidade⁴, e as propriedades mecânicas das biocerâmicas porosas diminuem notavelmente à medida que aumenta a sua porosidade.⁴

Neste cenário, o principal desafio da bioengenharia tecidual óssea tem sido a concepção de biomateriais bioativos e com biodegradação proporcional à regeneração óssea.⁷ Isto tem despertado o interesse dos pesquisadores em desenvolver compósitos, capazes de apresentar em um único biomaterial as principais propriedades físico-químicas de cada material, que mimetizem a estrutura tecidual óssea.³ Em soma, a projeção estrutural dos compósitos biocerâmicos traz como vantagem adicional o ajuste da distribuição das fases que

os compõe, a biodegradação controlada e a bioatividade, o que promove a regeneração óssea de forma mais rápida e eficiente.^{5,10,11} Nota-se, assim, que o desenvolvimento de novos compósitos possibilita a abertura de novos horizontes para a síntese de biomateriais com estruturas porosas 3D interconectadas favoráveis ao reparo de lesões e defeitos ósseos, principalmente, extensos.⁵

2.5 COMPÓSITOS DE W/TCP

Recentemente, os pesquisadores da bioengenharia tecidual óssea têm buscado unir diferentes materiais, tais como os CaP e os SC, para obter biomateriais compósitos destas duas biocerâmicas em um único biomaterial^{7,10,27}, em função das principais propriedades físico-químicas da W e do TCP.^{7,14} Esta combinação pode atribuir maior funcionalidade em comparação ao SC e ao TCP isolados.^{20,28}

Estudos recentes têm buscado aprimorar as propriedades físico-químicas dos biomateriais à base de SC, principalmente a W, no que se refere ao seu tempo de endurecimento relativamente lento. Para reduzir o tempo de endurecimento e ampliar seu uso clínico, novos biomateriais de SC podem ser projetados por meio da adição de diferentes matérias-primas, para obter os compósitos.¹⁹ Materiais que apresentam SC em sua constituição apresentam biocompatibilidade e bioatividade, e promovem a formação de uma camada de revestimento de apatita quando imersos em soluções contendo PO_4^{3-} .^{17,19-21,28} Esta camada de apatita associada aos biomateriais promove a adsorção de proteínas e a formação de um revestimento protéico que favorece a adesão e diferenciação dos osteoblastos e promove osteointegração,²¹ muito embora esta camada reduza a bioatividade do material pelo retardo na formação da apatita. Neste sentido, enfatiza-se que osteointegração entre os implantes e o tecido ósseo depende, em grande parte, dos eventos envolvidos nos mecanismos que ocorrem após a adesão inicial das células com substitutos ósseos.

Nos últimos anos, estudos evidenciaram que a presença da W no compósito adequa as propriedades mecânicas do TCP, tal como a resistência ao estresse de compressão, bem como possibilita a consolidação da neoformação óssea de forma mais rápida no interior dos arcabouços à base de W/TCP.^{7,14,34,36} Apesar disto, a resistência à compressão destes compósitos diminui com o aumento do teor de SC.²⁵ Assim, salienta-se que se faz necessário evitar cargas excessivas sobre estes biomateriais, durante os estágios iniciais do reparo ósseo.⁷

Uma das principais mudanças resultantes da substituição da apatita por SiO_3^{2-} , nos compósitos à base de TCP e W, relaciona-se à carga elétrica superficial dos biomateriais que

se torna mais negativa em relação à HA estequiométrica, o que pode ser responsável pelo aumento da atividade dos osteoclastos,⁷ células responsáveis pela biodegradação e/ou biorreabsorção da matriz óssea. Estes materiais também são capazes de facilitar a migração e proliferação de células nativas ao sítio de implantação e sofrer biodegradação numa velocidade quase proporcional ao mecanismo de neoformação óssea.^{7,27} No entanto, ainda não está claro se a W pura, ou nos compósitos, poderia regular a expressão de genes e proteínas relacionadas à osteogênese e promover a diferenciação celular.²³ Apesar disto, já foi documentado que os biomateriais compósitos contendo Si induzem maior expressão e liberação de osteopontina, fosfatase alcalina, colágeno tipo I e osteocalcina.^{7,23,27,28} Sendo assim, as características físico-químicas destes biomateriais, tais como porosidade, teor de Si, bem como a capacidade de atrair osteoclastos pela secreção de osteopontina, semelhante às proteínas osteoindutivas; em combinação, podem aprimorar o mecanismo de biodegradação e/ou biorreabsorção.⁷

2.6 ARCABOUÇOS DE COMPÓSITO DE W/TCP

Os arcabouços têm se mostrado promissores na área da bioengenharia tecidual óssea, pois estes materiais possuem estrutura 3D que serve de suporte necessário à migração, à adesão, à diferenciação e à proliferação celular, de forma a induzir a neoformação tecidual, de acordo com as funções apropriadas.^{4,5,14,15,24,36,41} Quando um arcabouço é implantado, individualmente, as células nativas migram para o seu interior para sintetizarem novas matrizes teciduais.^{7,27} No tecido ósseo, contudo, se a taxa de biodegradação do arcabouço não corresponder à velocidade de migração das células osteoprogenitoras, o tecido fibroso será formado.⁷ Na busca de minimizar esta limitação, alguns estudos têm utilizado a semeadura de células-tronco derivadas da medula óssea no interior dos arcabouços, para se diferenciarem em células osteogênicas, antes mesmo da implantação, o que reduziria a necessidade de migração e espraiamento de células osteoprogenitoras nativas para o interior da estrutura.^{4,7,27} Em relação à morfologia das células que crescem nas biocerâmicas contendo Si associado ao TCP, notou-se uma tendência à disseminação, com digitações citoplasmáticas e membranas celulares homogêneas e lisas. Como benefício adicional, as células previamente semeadas podem proliferar e produzir, de forma mais eficiente, sua própria matriz osteoide no arcabouço, o que diminui o tempo de biossíntese e mineralização *in situ*.^{7,27} Entretanto, apesar da combinação de células com arcabouços e biomoléculas derivadas do hospedeiro ser uma prática comum, em particular nos estudos *in vitro*, sua viabilidade ainda é limitada,

especialmente nas aplicações em lesões ósseas extensas ou defeitos ósseos de dimensão crítica.⁷ Desta maneira, estratégias baseadas no uso de biomateriais, de forma individual, para melhorar a angiogênese, oferecem algumas vantagens em comparação com outras abordagens, tais como controle favorável, diminuição da taxa de complicações e redução de custos.³ Diante disto, os arcabouços tornaram-se um componente chave determinante na consolidação das novas tecnologias da bioengenharia tecidual óssea.^{3,7}

Durante a síntese e processamento dos arcabouços, é necessário ter poros interconectados, para maximizar o espaço para a adesão, proliferação e migração celulares, angiogênese, liberação de micronutrientes e neoformação tecidual.^{25,36} Entretanto, vale salientar que a porosidade e a resistência mecânica são propriedades inversamente proporcionais, ou seja, quanto maior a porosidade, menor é a resistência.³⁶ Neste contexto, a fim de melhorar as propriedades mecânicas dos arcabouços, alguns pesquisadores têm discutido e proposto, por exemplo, o uso de aditivos na composição destes arcabouços, tais como fibras, géis, dentre outros.^{24,36}

Inseridos na grande variedade de materiais estudados e utilizados para síntese e processamento dos arcabouços, os vidros bioativos têm ganho notoriedade.¹⁴ Estes biomateriais são promissores para serem incorporados ao TCP devido, especialmente, à sua bioatividade. Por isto, o uso de vidros bioativos na produção de arcabouços contendo TCP pode resultar em materiais mais resistentes e com melhores propriedades biológicas do que o TCP puro.³⁴ Ademais, foi demonstrado que a área superficial específica dos arcabouços compósitos de W e TCP aumenta com o percentual de Si na mistura.²⁵

Estes compósitos têm sido desenvolvidos com o objetivo de modular a taxa de biodegradação e melhorar as interações dos biomateriais com os tecidos vivos,²⁸ em especial, os compósitos eutéticos à base de SC, como a W, e de CaP, como o TCP.^{7,14,28} Assim, nos últimos anos, a biocompatibilidade, a bioatividade e a biodegradabilidade, bem como as propriedades ópticas deste composto eutético binário, têm sido amplamente estudadas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.¹⁴

3 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, junto às melhorias das condições socioeconômicas da população, do aumento da expectativa de vida, e da facilidade de acesso a bens duráveis – como veículos automotores – nota-se a exposição dos indivíduos ao acometimento por lesões orgânicas causadas por doenças crônico-degenerativas e perdas teciduais decorrentes de acidentes automobilísticos com aumento na incidência de traumas, lesões, infecções, ressecções cirúrgicas, neoplasias, e outras afecções do tecido ósseo que, na maioria dos casos, acarretam no comprometimento funcional e/ou estético dos sítios acometidos e, assim, interferem na qualidade de vida. Isto gera a necessidade de múltiplos tratamentos que utilizam enxertos ósseos em grandes volumes durante os procedimentos cirúrgicos reparadores. Diante do exposto, torna-se premente o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos biomateriais, com potencial osteogênico notório capazes de auxiliar em perdas ósseas extensas, que possam ser produzidos em larga escala e que tenham custo reduzido em relação aos biomateriais importados utilizados na atualidade.

Frente ao exposto, neste estudo propor-se-á avaliação de biomateriais compósitos de W/TCP como alternativa perspicaz para a regeneração óssea, visto que estas duas biocerâmicas, individualmente, têm apresentado propriedades físico-químicas favoráveis à regeneração óssea. Deste modo, os resultados alcançados neste trabalho contribuirão para o desenvolvimento de novas tecnologias e novos substitutos ósseos.

4 HIPÓTESES

A associação da W com o TCP poderá resultar em um biomaterial compósito com potencial osteogênico promitente para a regeneração óssea.

Diferentes percentuais de associação de W/TCP possivelmente influenciarão no comportamento biológico e, conseqüentemente, no potencial osteogênico dos compósitos após implantação *in vivo*.

Tendo em vista, principalmente, à sua estrutura 3D, os arcabouços de compósito de W/TCP poderão demonstrar potencial osteogênico promissor para o uso clínico, em especial para aplicação em perdas ósseas extensas, condição cada vez mais presente na sociedade atual, em todo o mundo.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e avaliar o potencial osteogênico de biomateriais compósitos de W/TCP após implantação *in vivo*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar revisão sistemática e metanálise de estudos *in vivo* que avaliaram, histomorfometricamente, o percentual de neoformação óssea após implantação de compósitos de W/TCP.

Avaliar, histomorfometricamente, o reparo de defeito ósseo crítico na calvária de rato após implantação de arcabouços de compósitos de W/ β -TCP, em diferentes percentuais de associação.

6 ARTIGOS

6.1 ARTIGO 1

Formatado nas normas do periódico: Cerâmica (*Qualis A4*).

Wollastonite/TCP Composites for Bone Regeneration: Systematic Review and Meta-analysis

(Compósitos de Wollastonita/TCP para a Regeneração Óssea: Revisão Sistemática e Metanálise)

G. G. dos Santos^{1*}, E. C. A. Meireles², F. B. Miguel²

¹*Federal University of Bahia, Health Sciences Institute, Laboratory of Tissue Bioengineering and Biomaterials (LBTB), Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela, 1º andar, 40110-902, Salvador, BA, Brazil*

**geo.ccs@gmail.com*

²*Federal University of Recôncavo da Bahia, Health Sciences Center, Av. Carlos Amaral, Rua do Cajueiro, 1015, 44430-622, Santo Antônio de Jesus, BA, Brazil*

Abstract

Composite biomaterials have gained notoriety in recent decades due to the ability to combine desirable properties of each material. Thus, associating wollastonite (W) with biodegradation of the tricalcium phosphate (TCP) becomes promising for bone repair. In this way, this study investigated, through systematic review and meta-analysis, *in vivo* studies that evaluated, histomorphometrically, the bone repair after implantation of W/TCP composites. The searches were performed in the PubMed/MEDLINE, LILACS/BIREME/Virtual Health Library (VHL) and Scientific Electronic Library Online (SciELO) databases. Of the 312 studies found, six were included. In comparing the data it was considered the percentage of neoformed bone (NB). Composites with higher percentage of W (wt. %) and/or in the scaffold format presented higher NB. These results suggest that the association of these two materials as well as the porous scaffold format were determinant in NB, which makes these new composites profitable for clinical use.

Keywords: biomaterials, calcium phosphates, bone regeneration, systematic review, calcium silicates.

Resumo

*Biomateriais compósitos têm ganhado notoriedade nas últimas décadas, devido à capacidade de combinar propriedades desejáveis de cada material. Assim, associar a bioatividade da wollastonita (W) com a biodegradação do fosfato de tricálcio (TCP) torna-se promissor para o reparo ósseo. Deste modo, este trabalho investigou, por meio de revisão sistemática e metanálise, estudos *in vivo* que avaliaram, histomorfometricamente, o reparo ósseo após implantação de compósitos de W/TCP. As buscas foram realizadas nas bases de dados PubMed/MEDLINE, LILACS/BIREME/Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e Scientific Electronic Library Online (SciELO). Dos 312 estudos encontrados, seis foram incluídos. Na comparação dos dados considerou-se o percentual de neoformação óssea (NB). Compósitos com maior percentual de W (% m/m) e/ou no formato de arcabouços apresentaram maior NB. Estes resultados sugerem que a associação destes dois materiais bem como o formato de arcabouço poroso foram determinantes na NB, o que tornam estes novos compósitos profícuos para o uso clínico.*

Palavras-chave: biomateriais, fosfatos de cálcio, regeneração óssea, revisão sistemática, silicatos de cálcio.

INTRODUCTION

Traumas, surgical resections, infections, neoplasms, congenital diseases and other disorders of bone tissue, often result in extensive tissue loss [1]. These situations, beyond causing morbidity, generate high costs for the public health sector, as they require multiple long-term surgical repair procedures [2, 3] and, consequently, burden the public health and social security system. In these situations, considering the excellent osteogenic potential of the autogenous graft, this would be the first choice. However, in some cases its use is restricted, particularly in the absence and/or limited extension of the donor area; risk of cross infection; dimensions and morphology of bone loss. Thus, in recent decades, researchers in bone tissue engineering have developed new techniques and biomaterials for different applications in bone tissue. This has demanded extensive experimental studies, *in vitro* and *in vivo*, and preclinical and clinical trials, to highlight the interactions of biomaterials with cells and tissues, their biocompatibility, mechanical stability, osteogenic potential, safety and efficacy.

In this context, composite biomaterials have been extensively studied, considering that they combine the desirable physicochemical properties of each material individually. Among the bioceramic substrates most used for the synthesis of composites, wollastonite (W) has recently stood out due to its biocompatibility, osteoconductivity, biodegradability and, especially, bioactivity [3, 4, 5]. In addition to this material, TCP has been widely used for decades for the synthesis of bioceramic composites, due to its similarity with bone tissue, biocompatibility and biodegradability. Although this material presents a very fast rate of biodegradation in comparison to the speed of bone neof ormation [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14], which has limited its use in extensive losses.

Therefore, the synthesis of W/TCP composites has become promising, considering that it unites fundamental characteristics of W and TCP in a single bioactive, osteoconductive, osteoinductive and biodegradable biomaterial, favorable to bone regeneration. In addition, this association enables the control of biodegradation, as well as promoting improvements in the interactions between biomaterials and bone tissue [2, 15, 16, 17]. In view of the above, in this work it was carried out a systematic review and meta-analysis of the results obtained by experimental studies, published in the last 10 years, which quantitatively analyzed, through histomorphometry, bone repair after implantation of composite biomaterials containing W/TCP, *in vivo*.

MATERIAL AND METHOD

SEARCH STRATEGY

The search was performed in the PubMed/MEDLINE, LILACS/BIREME/Virtual Health Library (VHL) and Scientific Electronic Library Online (SciELO) databases. The search terms used, according to the MeSH (Medical Subject Headings) and the DeCS (Health Sciences Descriptors) were: “wollastonite AND beta-tricalcium phosphate”, “wollastonite AND beta-TCP”, “wollastonite AND tricalcium phosphate”, “wollastonite AND TCP”, “calcium silicate AND beta-tricalcium phosphate”, “calcium silicate AND beta-TCP”, “calcium silicate AND tricalcium phosphate” and “calcium silicate AND TCP”. The choice of these terms, sometimes abbreviated, sometimes unabbreviated, with or without the β symbol, was based on the lack of standardization of this information observed in the titles of the articles that refer to the same biomaterial.

INCLUSION AND EXCLUSION CRITERIA

The inclusion criteria used were articles that presented: 1) scope aimed at bone regeneration; 2) *in vivo* studies, after implantation of biomaterials in animal models; 3) experimental conditions involving the implantation of W/TCP composites.

The following parameters were adopted as exclusion criteria: 1) clinical studies; 2) *in vitro* studies; 3) literature reviews, thesis and dissertations; 4) experimental conditions involving only the use of TCP or W, in individualized way; 5) implantation of biomaterials in other tissues; 6) insufficient data. Duplicate publications, which are common among search terms within each database, were excluded, and then duplicate works, which are common among databases, were excluded.

RESULTS

The search in the electronic databases found 857 papers. After reading the titles, duplicate works, common to more than one search term, were identified and excluded within each database, generating a total of 312 studies. Then, the results of the searches between the databases were compared, excluding 81 duplicate works, common among the databases, selecting 231 studies for analysis. After reading the titles and abstracts, take into consideration the exclusion criteria, previously described, 190 papers were excluded, leaving 41 articles for the complete reading. Finally, after a thorough analysis of the experimental conditions of the studies, taking into consideration the inclusion criteria, 35 articles were excluded and six papers were selected to compose the systematic review and meta-analysis, as illustrated in the flowchart in Fig. 1.

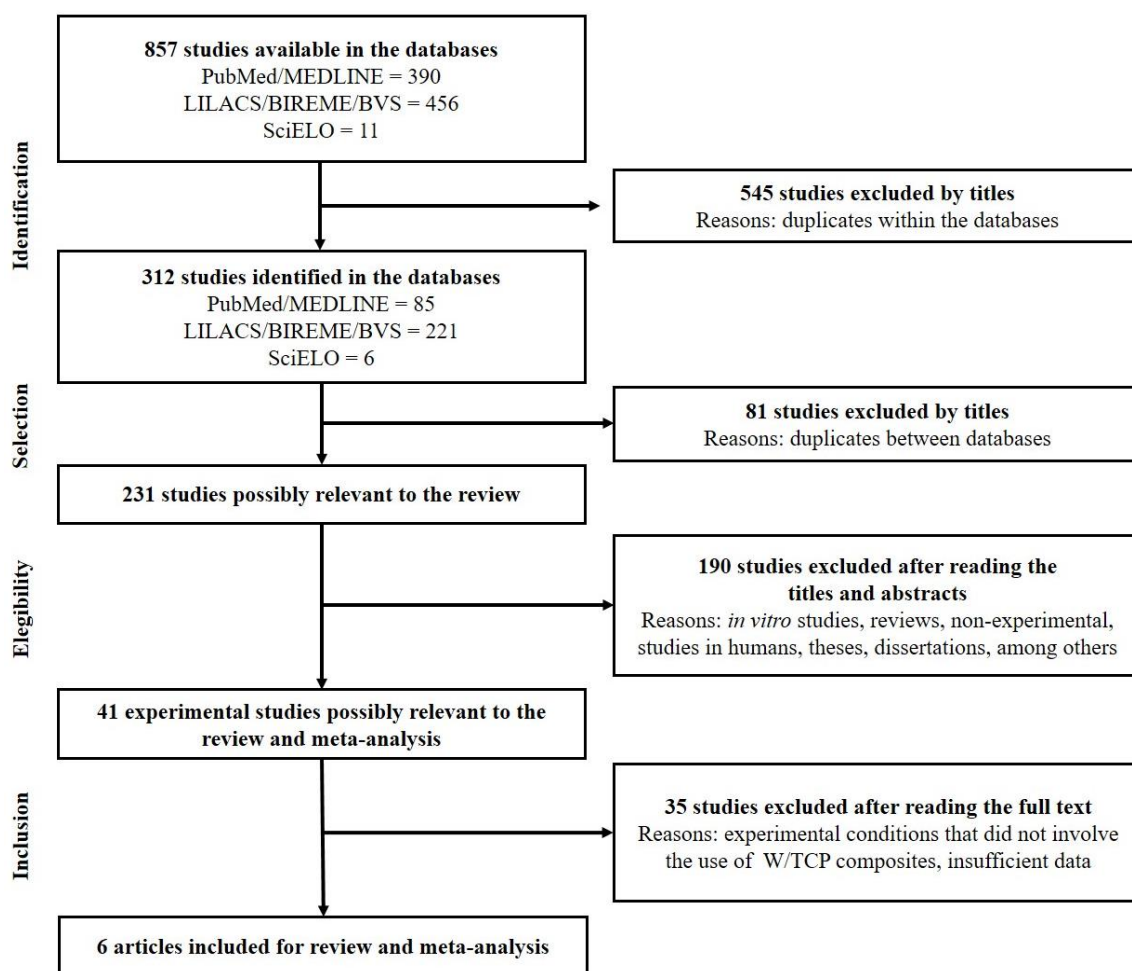


Figure 1: Flowchart of the search and selection of articles in the databases.

All six studies (100%) included employed the rabbit as an experimental animal model and performed histomorphometric evaluation of bone repair. Of these, in relation to the type of bone defect, three studies (50%) used the femur, two (33.3%) the tibia, and one (16.7%) the calvaria. Regarding the diameter of the bone defect, two studies (33.3%) used the bone defect of 8 mm, two (33.3%) used the defect of 6 mm, one (16.7%) used the defect of 5 mm, and one (16.7%) used the defect of 2 mm. Regarding the shape of the biomaterial, four articles (66.7%) evaluated scaffolds and two (33.3%) analyzed microspheres (Tab. I).

Table I – *In vivo* studies of W/TCP composites.

Study	Animal	Defect type (Diameter)	Biomaterial	Composite W/TCP (wt. %)	Follow-up (weeks)	NB %
Barbosa <i>et al.</i> [18]	Rabbit	Tibia (2 mm)	Scaffold	W/ β -TCP (60/40)	4	39.542.12 \pm 13.641.78 [#]
					8	73.132.43 \pm 5.942.10 [#]
Parrilla-Almansa <i>et al.</i> [19]	Rabbit	Tibia (5 mm)	Scaffold	CSP (45/55)	4	4.79*
					12	9.58*
					20	23.49*
Xu <i>et al.</i> [1]	Rabbit	Calvaria (8 mm)	Microsphere	CaP/CaSi/CaP (26/73.9)	6	7.5
					12	16.47
					18	23.43
					6	~11
					12	19.66
					18	29.65
Ke <i>et al.</i> [2]	Rabbit	Femur (8 mm)	Microsphere	CaP/CaSi (79.7/20.3)	6	~8
					12	20
					18	~27
					6	11
					12	~24
					18	~34
Liu <i>et al.</i> [13]	Rabbit	Femur (6 mm)	Scaffold	50%CS (50/50)	4	~20
					12	~23
					26	~28
					4	~30
					12	~33
					26	~33.5
Wang <i>et al.</i> [12]	Rabbit	Femur (6 mm)	Scaffold	β -CS/ β -TCP (80/20)	4	15.50
					12	27.62
					26	21.9
					4	19.54
					12	30.0
					26	23.55

W, CS and CaSi = Calcium silicate or wollastonite.

CaP and TCP = Calcium phosphate or tricalcium phosphate.

CSP = Calcium phosphate and Silicate.

*Values calculated based on the percentages of bone neoformation and total of the bone defect made available by the authors.

#Values not subject to percentage calculation, due to insufficient data made available by the authors.

~Values obtained in graphs.

For quantitative analyzes, in view of the great variability in the percentages (wt. %) of association of W/TCP in the chemical compositions of the biomaterials used in the reviewed experiments, a categorical variable called “grouping” was defined to represent three experimental conditions and compare the results (percentage of NB) of the studies: 1) W>TCP – composites with a higher percentage of W, regardless of the proportion (wt. %); 2) W<TCP – composites with a higher percentage of TCP, regardless of the proportion (wt. %); and 3) W=TCP – composites with the same proportion as W and TCP (wt. %). When considering these three groups and summarizing all associations of W with TCP, within each study, in all biological points adopted, it was observed that W>TCP (wt. %) was evaluated 4 times (44.4%); W<TCP (wt. %), evaluated three times (33.3%) and W=TCP (wt. %) evaluated twice (22.2%). One of the 6 studies did not present the percentage of NB, nor it did present sufficient data to obtain this measure, thus, 5 studies were summarized in the statistical analysis.

STATISTICAL ANALYSIS

The data obtained and summarized in table II do not satisfy the requirements and the assumptions for the application of parametric tests of comparison of means, like the *Student's t test*. Thus, to assess the existence of significant differences ($p < 0.05$), a non-parametric equivalent, the *Mann-Whitney's test*, was applied

Table II – Statistical analysis according to the shape of the biomaterial.

Follow up (Weeks)	Biomaterial format	Assessment frequency	NB % Mean and SD
4	Scaffold	5	17.97 ± 9.10
	Microsphere	----	----
6	Scaffold	----	----
	Microsphere	4	9.38 ± 1.89
12	Scaffold	5	24.64 ± 9.18
	Microsphere	4	20.03 ± 3.09
18	Scaffold	----	----
	Microsphere	4	28.52 ± 4.45
20	Scaffold	1	23.49 ± ----
	Microsphere	----	----
26	Scaffold	5	26.09 ± 4.73
	Microsphere	----	----

SD = Standard deviation.

Taking as a reference the biological point of 12 weeks, the only common among all studies in the evaluation of the two formats of biomaterials, a higher percentage of bone neoformation was observed after implantation of the scaffolds in relation to the microspheres, 24.64%±9.18% and 20.03%±3.09%, respectively (Table II). Although the *Mann-Whitney's test* result indicated that there was no statistically significant difference ($p = 0.286$).

For the comparison of the results in the intragroup evaluation (format of the biomaterials), in relation to the three previously defined W/TCP (wt. %) groupings (W>TCP, W<TCP and W = TCP), it was not possible to use the *Analysis of Variance (ANOVA)*. Therefore, its non-parametric equivalent, the *Kruskal-Wallis's test* (Table III), was applied.

Table III – Statistical analysis according to the percentage (wt. %) of W/TCP association and the format of the biomaterial.

Scaffold				
Follow up (Weeks)	Experimental condition (wt. %)	Assessment frequency	NB % Mean and SD	<i>Kruskal-Wallis</i>
4	W>TCP	2	22.70 ± 10.25	<i>p</i> = 0.368
	W<TCP	1	4.79 ± ----	
	W=TCP	2	19.77 ± 0.32	
12	W>TCP	2	30.31 ± 3.80	<i>p</i> = 0.301
	W<TCP	1	9.58 ± ----	
	W=TCP	2	26.50 ± 4.94	
26	W>TCP	2	27.70 ± 8.20	<i>p</i> = 0.741
	W<TCP	1	23.49 ± ----	
	W=TCP	2	25.77 ± 3.14	
Microsphere				
Follow up (Weeks)	Experimental condition (wt. %)	Assessment frequency	NB % Mean and SD	<i>Kruskal-Wallis</i>
6	W>TCP	2	11.00 ± ----	<i>p</i> = 0.333
	W<TCP	2	7.75 ± 0.35	
	W=TCP	----	----	
12	W>TCP	2	21.83 ± 3.06	<i>p</i> = 0.667
	W<TCP	2	18.23 ± 2.49	
	W=TCP	----	----	
18	W>TCP	2	31.82 ± 3.07	<i>p</i> = 0.333
	W<TCP	2	25.21 ± 2.52	
	W=TCP	----	----	

SD = Standard deviation.

In all the biological points evaluated, it was observed that, regardless of the shape of the biomaterial, composites containing W>TCP (wt. %) presented a higher percentage of NB in relation to the other defined experimental conditions, although this difference has not been statistically significant ($p > 0.05$).

DISCUSSION

Aiming to gather scientific data and current evidence on the performance of composite biomaterials containing W and TCP, the present study investigated, through systematic review and meta-analysis, *in vivo* studies that evaluated, histomorphometrically, the bone repair after implantation of these composites. All works included in the meta-analysis of this paper used rabbits as an experimental animal model. The choice of this animal has as its main advantage the greater similarity with the human bone anatomy and physiology, mainly regarding the macro and microstructure of the bone tissue of the femur in relation to the human maxillary bone [20], in relation to rodents. These latter, despite they present some differences between human bone anatomy and physiology, have been widely used in experimental research and have contributed significantly to the development of new biomaterials and regenerative techniques, especially those aimed at bone regeneration [21, 22], which make them models of choice for research that investigate biocompatibility and safety in the use of materials [23, 24] biodegradation and bioresorption; carrying of drugs and/or active substances; osteoinduction, osteoconduction and osteostimulation; osteogenic potential; and cell therapies associated with biomaterials. Despite the differences between rabbits and rodents, it is known that the use of small animals has numerous advantages over large ones, such as better cost-benefit; time of observation and rehabilitation relatively shorts; easy handling and manipulation of animals; standardization of experimental conditions among genetically similar individuals; easy reproducibility of study methods; and greater control of experimental conditions [21, 22, 23].

Regarding the experimental surgical model, the studies included in our meta-analysis used different sites of bone defect's confection – femur, calvaria and tibia – with varying dimensions, 8 mm, 6 mm, 5 mm and 2 mm [1, 2, 12, 13, 18, 19]. Despite of the variety of experimental models available and used to assess bone repair, defects made in

calvaria present morphological characteristics that enable the generation of data essential to understanding of the mechanisms involved in the associated tissue response after the implantation of biomaterials, especially the osteogenic potential. In this surgical site, due to the predominant compact and tiny spongy portion, the regenerative capacity of bone tissue is limited, which shows the osteogenic potential of biomaterials or regenerative techniques, especially in critical bone defect [25]. Moreover, the calvaria presents anatomical location that facilitates the surgical access and transoperative manipulation; bone structure that enables the establishment of uniform, reproducible and standardized defects, easily assessed by imaging, histomorphological and morphometric examinations; and fixation of the biomaterial by the repositioned flap [21, 26], although biomaterials in the microsphere format move more easily from the bone defect [27].

Nevertheless, there is no consensus in the literature on the exact diameter of the bone defect to be confectioned, neither in relation to the periods of analysis during the studies. Thus, having as reference the biological point of 12 weeks, the only one common to all studies in the evaluation of the two formats of biomaterials, a higher percentage of NB was noticed after implantation of the scaffolds in relation to the microspheres (Table II). In addition, when comparing the NB averages between the conditions W>TCP (wt. %) and W<TCP (wt. %), a greater discrepancy was noticed in the percentages obtained with scaffolds than with microspheres. These differences can be justified by the influence of the 3D structural characteristics of the scaffolds that are decisive in the biological behavior and, consequently, in the regenerative potential of the biomaterials [2, 18, 21, 28, 29]. This microarchitecture enables the adhesion, migration, proliferation and differentiation of different cell types, beyond promoting neovascularization at the implantation site, which favors osteogenesis inside its 3D structure [1, 2, 12, 14, 23, 30, 31]. For this, they need to present pores with at least 100 μm , although 300 μm is the most appropriate size for the aforementioned events, during bone neoformation inside of the scaffolds [29]. For beyond these properties, scaffolds can also modulate the inflammatory response at the implantation site [19, 31], which reduces the chances of rejection of the biomaterial by the body.

The contrast noticed between the percentage of NB as a function of the percentage (wt. %) of association of W and TCP may be related to the fact that, as some studies have shown that the presence of W associated with TCP can adapt the chemical and mechanical properties of the biomaterial, which makes it possible to consolidate bone neoformation more quickly inside of these composites [2, 6, 28, 32, 33]. On the other hand, Liu and collaborators [13] observed a decrease in compressive strength in biomaterials with the highest percentage of W. These authors suggested that smaller amounts of W keep the scaffold with stable density. Thus, in relation to the aforementioned findings, it is emphasized that excessive loads should be avoided in ceramic biomaterials during the initial stages of regeneration [32].

Bioactive biomaterials containing silicon (Si) are capable of nuclear the precipitation and the formation of an layer of CaP (apatite) amorphous on the surface of these materials and, thus, amplify the mechanism of bone neoformation *in vivo* [1, 6, 8, 9, 10, 12, 32]. In addition to this factor, the higher percentage of NB of composites containing W> TCP (wt. %) can be attributed to the fact that, when compared to other bone substitutes, W presents greater bioactivity by the effect of the release of calcium ions (Ca^{2+}) and silicate (SiO_3^{2-}), substantial during the osteogenesis mechanism [1, 2, 3, 6, 8]. Moreover, the presence of SiO_3^{2-} also induces proliferation, differentiation and increased activity of osteoblasts and, consequently, promotes biomineralization, elementary events during bone repair [10, 13, 14, 31, 32, 34]. However, high concentrations of Si appear to cause cell death [10, 24]. Thus, the relationship between concentration and response to SiO_3^{2-} is still debated and many questions remain unanswered so far [15].

The main limitation found in our study was the fact that none of the studies included had a percentage of NB with mean and standard deviation, which made it impossible to construct the *Forest plot* graph, recommended in the scientific literature during the elaboration of meta-analysis [35]. One of the studies selected for the review did not compose the statistical analysis, since it did not present a percentage of NB.

Despite the different methodological approaches observed in the works analyzed in this paper, it is noticed that the W/TCP composites have shown promising osteogenic potential. Given this, it is evident that further studies need to be carried out in order to elucidate the uncertain points that still exist about the ideal Si content and the best percentage of association between W and TCP as well as to assess the potential of these biomaterials in extensive bones losses. For that, it is essential that these studies share the same biological points of observation, in order to facilitate the understanding and enable a better comparison of results, especially in relation to the inflammatory response, bone neoformation and the maturation of mineralized tissue associated with these composites.

CONCLUSIONS

The results observed in this paper demonstrated that the porous structure of the scaffolds was determinant in the NB of the composites containing W and TCP, higher than the percentage of NB obtained with the use of the composites in the form of microspheres. The association of these two bioceramics showed promising osteogenic potential for clinical use.

REFERENCES

- [1] A. Xu, C. Zhuang, S. Xu, F. He, L. Xie, X. Yang, Z. Gou, *Sci. Rep.* **8** (2018) 1. DOI:10.1038/s41598-018-21778-z.
- [2] X. Ke, C. Zhuang, X. Yang, J. Fu, S. Xu, L. Xie, Z. Gou, J. Wang, L. Zhang, G. Yang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9** (2017) 24497. DOI: 10.1021/acsami.7b06798.
- [3] X. Yu, T. Zhao, Y. Qi, J. Luo, J. Fang, X. Yang, X. Liu, T. Xu, Q. Yang, Z. Gou, X. Dai, *Sci. Rep.* **8** (2018) 1. DOI:10.1038/s41598-018-36200-x.
- [4] H. Sun, C. Wu, K. Dai, J. Chang, T. Tang, *Biomaterials* **27** (2006) 5651. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.07.027.
- [5] M.A. Encinas-Romero, J. Peralta-Haley, J.L. Valenzuela-García, F.F. Castellón-Barraza, *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **4** (2013) 327. DOI: 10.4236/jbnb.2013.44041.
- [6] S. Hesarakı, M. Safari, M.A. Shokrgozar, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **91** (2009) 459. DOI: 10.1002/jbm.b.31422.
- [7] K. Lin, J. Chang, R. Shen, *Biomed. Mater.* **4** (2009) 1. DOI: 10.1088/1748-6041/4/6/065009.
- [8] S. Ni, J. Chang, *J. Biomater. Appl.* **24** (2009) 139. DOI: 10.1177/0885328208094745.
- [9] L. Fei, C. Wang, Y. Xue, K. Lin, J. Chang, J. Sun, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **100** (2012) 1237. DOI: 10.1002/jbm.b.32688.
- [10] L. Meseguer-Olmo, S. Aznar-Cervantes, P. Mazón, P.N. De Aza, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **23** (2012) 3003. DOI: 10.1007/s10856-012-4742-z.
- [11] R. Osorio, M. Yamauti, S. Sauro, T.F. Watson, M. J. Endod. **38** (2012) 1227. DOI: 10.1016/j.joen.2012.05.011.
- [12] C. Wang, Y. Xue, K. Lin, J. Lu, J. Chang, *J. Acta Biomater.* **8** (2012):350. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.08.019.
- [13] S. Liu, F. Jin, K. Lin, J. Lu, J. Sun, J. Chang, K. Dai, Fan C, *Biomed. Mater.* **8** (2013) 1. DOI: 10.1088/1748-6041/8/2/025008.
- [14] Y. Deng, C. Jiang, C. Li, T. Li, M. Peng, J. Wang, K. Dai, *Sci. Rep.* **7** (2017) 1. DOI:10.1038/s41598-017-05196-1.
- [15] P.N. De Aza, D. García-Bernal, F. Cragnolini, P. Velasquez, L. Meseguer-Olmo, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **33** (2013) 4009. DOI: 10.1016/j.msec.2013.05.043.
- [16] C. Wang, K. Lin, J. Chang, J. Sun, *Biomaterials* **34** (2013) 64. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.021.
- [17] C.T. Kao, T.H. Huang, Y.J. Chen, C.J. Hung, C.C. Lin., M.Y. Shie, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **43** (2014) 126. DOI: 10.1016/j.msec.2014.06.030.
- [18] W.T. Barbosa, K.V. de Almeida, G.G. de Lima, M.A. Rodriguez, M.V. Lia Fook, R.G. Carrodegua, V. Amaro da Silva Junior, F.A. de Sousa Segundo, M.J.C. de Sá, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* (2019) 1. DOI: 10.1002/jbm.b.34462. [Epub ahead of print]
- [19] A. Parrilla-Almansa, N. García-Carrillo, P. Ros-Tárraga, C.M. Martínez, F. Martínez-Martínez, L. Meseguer-Olmo, P.N. De Aza, *Materials (Basel)* **11** (2018) 1. DOI: 10.3390/ma11091580.
- [20] K. Lin, Y. Liu, H. Huang, L. Chen, Z. Wang, J. Chang, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **26** (2015) 1. DOI: 10.1007/s10856-015-5523-2.
- [21] P.S. Gomes, M.H. Fernandes, *Lab. Anim.* **45** (2014) 14. DOI: 10.1258/la.2010.010085.
- [22] K. Eldesoqi, D. Henrich, A.M. El-Kady, M.S. Arbid, B.M. Abd El-Hady, I. Marzi, C. Seebach, *PLoS ONE* **9** (2014) 1. DOI: 10.1371/journal.pone.0087642
- [23] M. Tumedei, P. Savadori, M. Del Fabbro, *Int. J. Mol. Sci.* **20** (2019) 1. DOI: 10.3390/ijms20174221.
- [24] J.A McGovern, M. Griffin, D.W. Hutmacher, *Dis. Model. Mech.* **11** (2018) dmm033084. DOI: 10.1242/dmm.033084.

- [25] Y.C. Por, C.R. Barceló, K.E. Salyer, D.G. Genecov, K. Troxel, E. Gendler, M.E. Elsalanty, L.A. Opperman, *Ann. Acad. Med. (Singapore)* **36** (2007) 911. PMID: 18071597.
- [26] J.P. Schmitz, J.O. Höllinger, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **225** (1986) 299. PMID: 3084153.
- [27] I.I.A. Ribeiro, R.S. Almeida, D.N. Rocha, M.H. Prado da Silva, F.B. Miguel, F.P. Rosa, *Rev. Ciênc. Méd. Biol.* **13** (2014) 298. DOI: 10.9771/cmbio.v13i3.12934.
- [28] L. Siqueira, C.G. Paula, R.F. Gouveia, M. Motisukea, E.S. Trichêsa, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **90** (2019) 635. DOI:10.1016/j.jmbbm.2018.11.014.
- [29] V. Karageorgiou, D. Kaplan, *Biomaterials* **26** (2005) 5474. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
- [30] F.B. Miguel, A de A. Barbosa Junior, F.L. de Paula, I.C. Barreto, G. Goissis, F.P. Rosa, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **24** (2013) 2567. DOI: 10.1007/s10856-013-4980-8.
- [31] T. Li, M. Peng, Z. Yang, X. Zhou, Y. Deng, C. Jiang, M. Xiao, J. Wang, *Acta Biomater.* **71** (2018) 96. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.03.012.
- [32] M.B. Nair, H.K. Varma, K.V. Menon, S.J. Shenoy, A. John, *Acta Biomater.* **5** (2009) 1742. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.01.009.
- [33] D. Sola, L. Grima, *Materials* **11** (2018) 1. DOI:10.3390/ma11010125.
- [34] M. H. Huang, C.T. Kao, Y.W. Chen, T.T. Hsu, D.E. Shieh, T.H. Huang, M.Y. Shie, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **26** (2015) 161. DOI: 10.1007/s10856-015-5484-5.
- [35] E. Santos, M Cunha, *Millenium* **44** (2013) 85.

6.2 ARTIGO 2

Formatado nas normas do periódico: *Biomaterials Science* (Qualis A1).

Bone Regeneration After Implantation of 3D Scaffolds Containing Wollastonite/ β -TCP Composites in Critical Bone Defect in Rat Calvaria

*George Gonçalves dos Santos,^{*a,b,g} Izamir Resende Junior Borges Miguel,^b Aryon de Almeida Barbosa Junior,^c Willams Teles Barbosa,^d Katilayne Vieira de Almeida,^d Miguel A. Rodríguez,^e Raúl García Carrodeguas,^f Fúlvio Borges Miguel,^{a,b} Roberto Paulo Correia de Araújo,^g Fabiana Paim Rosa^{a,g}*

^a Laboratory of Tissue Bioengineering and Biomaterials, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

E-mail: geo.ccs@gmail.com

^b Laboratory of Science and Technology of Health, Health Sciences Center, Federal University of Recôncavo of Bahia, Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brazil.

^c Institute of General and Cutaneous Pathology S/C LTDA, Salvador, Bahia, Brazil.

^d Laboratory of Evaluation and Development of Biomaterials of the Northeast, Federal University of Campina Grande, Campina Grande, Paraíba, Brazil.

^e Instituto de Cerámica y Vidrio (CSIC), Madrid, Spain.

^f Noricum S. L., San Sebastián de los Reyes, Madrid, Spain.

^g Postgraduate Program in Interactive Processes of Organs and Systems, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

Keywords: biomaterials, calcium phosphates, calcium silicate, rat calvaria, bone regeneration

Abstract

The complete aesthetic and functional restoration of critical bone defects/lesions remains as major challenge for the tissue bioengineering, medicine and odontology areas, despite the scientific and technological advances observed in recent decades. In order to provide favorable conditions for bone regeneration, different biomaterials have been developed and evaluated, worldwide. Composite biomaterials have gained notoriety, as they combine desirable properties of each isolated material. Thus, in this work, bone repair was evaluated, histomorphometrically, after implantation of wollastonite (W) and β -tricalcium phosphate (β -TCP) composites in three different association percentages (wt. %), in the scaffolds format. Thirty *wistar* rats were randomly assigned to three experimental groups: W-20 (20W/80 β -TCP wt. %), W-60 (60W/40 β -TCP wt. %) and W-80

(80W/20 β -TCP wt. %), evaluated by optical microscopy at biological points of 15 and 45 days. Throughout the study, the histological results evidenced that the scaffolds remained at the implantation site, were biocompatible and presented osteogenic potential. The percentage of neoformed mineralized tissue was more evident in the W-20 group (51%), at 45 days. The composite of the W-80 group showed more evident biodegradation than the biomaterials of the W-20 and W-60 groups. Thus, it is concluded that the scaffold containing 20W/80 β -TCP (wt. %) promoted more evident bone formation, but all composites evaluated in this study showed notorious bioactivity and promising characteristics for clinical application.

Introduction

Experimental and preclinical studies have been developed over the years with the purpose of evaluating new biomaterials capable of stimulating the restoration of impaired function and aesthetics after extensive tissue losses and/or lesions.¹ In these inhospitable situations, although bone tissue has excellent regenerative capacity, the repair consolidates by fibrosis, due to the lack of a three-dimensional (3D) scaffold fundamental to the cellular events that occur during tissue neoformation and to the limited vascularization.^{2,3}

According to the principles of biomimesis, these biomaterials must present structural, mechanical and functional characteristics similar to those of natural tissues.^{1,3-5} In this context, scaffolds with interconnected pores are promising, as they enable the diffusion of substances and micronutrients, the angiogenesis and cellular events involved in the synthesis of a new extracellular matrix (ECM) inside the biomaterial,⁶⁻⁸ making them versatile for various applications.

Among the materials used for the synthesis of scaffolds, β -TCP has attracted interest for many years due to its similarity with biological apatite, osteoconductivity and, mainly, *in vitro* and

in vivo solubility.^{8,9} However, this calcium phosphate (CaP) exhibits speedy biodegradation and/or bioresorption that occurs asynchronously to the bone regeneration mechanism, which limits its clinical application.⁹⁻¹¹ Wollastonite (W) is a calcium metasilicate that has stood out, in recent years, due to its stabilization in wet environments and bioactivity *in vitro*, which makes it suitable for use in bone regenerative techniques.¹²⁻¹⁶ Thus, several studies have associated these materials for the synthesis of new composites that evidenced better biodegradation and bioresorption compared to W and β -TCP used in isolation.^{7,17,18} Therefore, the objective of the present study was to evaluate, histomorphometrically, bone repair after implantation of 3D scaffolds containing W/ β -TCP composites, in three different percentages of association, in critical defect in rat calvaria. For this purpose, in an inedited way, the critical bone defect (8 mm) was used as an experimental surgical model.

Materials and Method

Biomaterials: Synthesis and physicochemical characterization

The biomaterials evaluated in this study were synthesized, processed and characterized at the Biomaterials Evaluation and Development Laboratory of the Northeast, at Federal University of Campina Grande, Campina Grande, Paraíba, Brazil and at the Instituto de Cerámica y Vidrio, (CSIC), Madrid, Spain.

For the synthesis of the W/ β -TCP composites, were used, as raw materials, the W (*NYAD M400 – Nyco minerals*[®], New York, U.S.A.) of natural origin and β -TCP obtained by the wet method in which there is neutralization of hydroxyapatite (Tribasic Calcium Phosphate P. A. – *LabSynth*[®], São Paulo, Brazil) using orthophosphoric acid (H₃PO₄ 85% P. A. – *Panreac*[®], Barcelona, Spain) to obtain a calcium/phosphorus (Ca/P) ratio of 1.5. This mixture was dried at

60°C (140°F) for 24 hours and the final product was ground using a mortar and pestle. The obtained powder was sintered at 1100°C (2012°F) for 15 hours. The W and β -TCP powders were analyzed on the Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR) (*FT-IR/FT-NIR Spectrum 400 – Perkin Elmer*[®], Massachusetts, U.S.A.) which evidenced the presence of Si-O-Si stretch bands, at the peaks at 681, 897 and 931 cm^{-1} and Si-O vibration bands at 1010 and 1069 cm^{-1} ; asymmetric stretching bands CO_2^{3-} , close to 1500 cm^{-1} , inherent to the W sample (Fig. 1a); and phosphate bands (PO_4^{3-}) in the regions of 945, 973, 1017 and 1132 cm^{-1} , specific to the β -TCP sample (Fig. 1b).

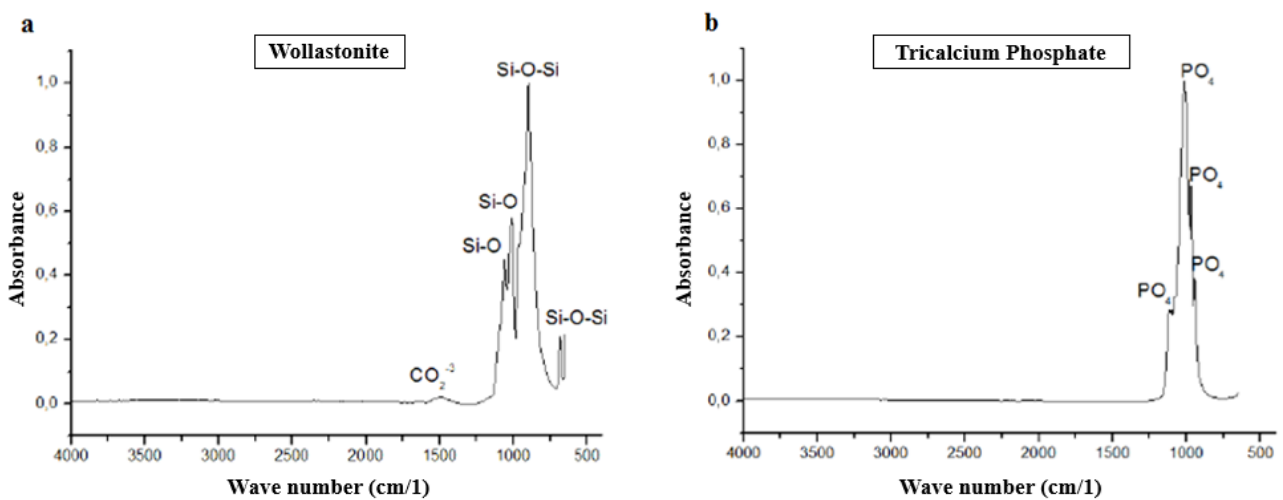


Fig. 1 (a) FTIR of wollastonite powder. (b) FTIR of β -TCP powder.

Then, three bioceramic suspensions containing W and β -TCP in different proportions were obtained: **1)** 20W/80 β -TCP (wt. %) – 10 mL of distilled water, 0.078g of polyacrylate-based dispersant (*Dolapix*[®] PCN – *Zschimmer & Schwarz GmbH*, Lahnstein, Germany), 5.2g of W and 20.8g of β -TCP; **2)** 60W/40 β -TCP (wt. %) – 10 mL of distilled water, 0.078 g of polyacrylate-based dispersant (*Dolapix*[®] PCN – *Zschimmer & Schwarz GmbH*, Lahnstein, Germany), 15.6g of W and 10.4g of β -TCP; **3)** 80W/20 β -TCP (wt. %) – 10 mL of distilled water, 0.078g of polyacrylate-based dispersant (*Dolapix*[®] PCN – *Zschimmer & Schwarz GmbH*, Lahnstein, Germany), 20.8g W and 5.2g of β -TCP. At the end, after combining the raw materials, all composites presented a total

composition of 100%. The percentage of W and β -TCP, for each suspension, was determined using the eutectic point of the binary system W/ β -TCP, corresponding to the mixture of 60% (wt. %) of W and 40% (wt. %) of β -TCP.

For the 3D scaffolds production, was used the 60 ppi (*Bulpren*[®] – *Reticel*, Brussels, Belgium) open cell polyurethane sponge impregnation method, in the shape of a disk with 8 mm in diameter and 2 mm in thickness. The aqueous suspension used in this stage consisted of a solid content of 30% by volume, corresponding to the bioceramic solutions described above, 0.3% by volume of the dispersant (*Dolapix*[®] PCN – *Zschimmer & Schwarz GmbH*, Lahnstein, Germany) and 0.5% by volume of the binder (*Optapix*[®] PAF35 – *Zschimmer & Schwarz GmbH*, Lahnstein, Germany). After impregnation, the sponges were burned in a thermal cycle sequence started with heating of 2°C (35.6°F)/min until a temperature of 600°C (1112°F), to remove the polymer; followed by heating from 5°C (41°F)/min until 1275°C (2327°F) and remaining for 2 hours for sintering the 3D scaffolds (Fig. 2).

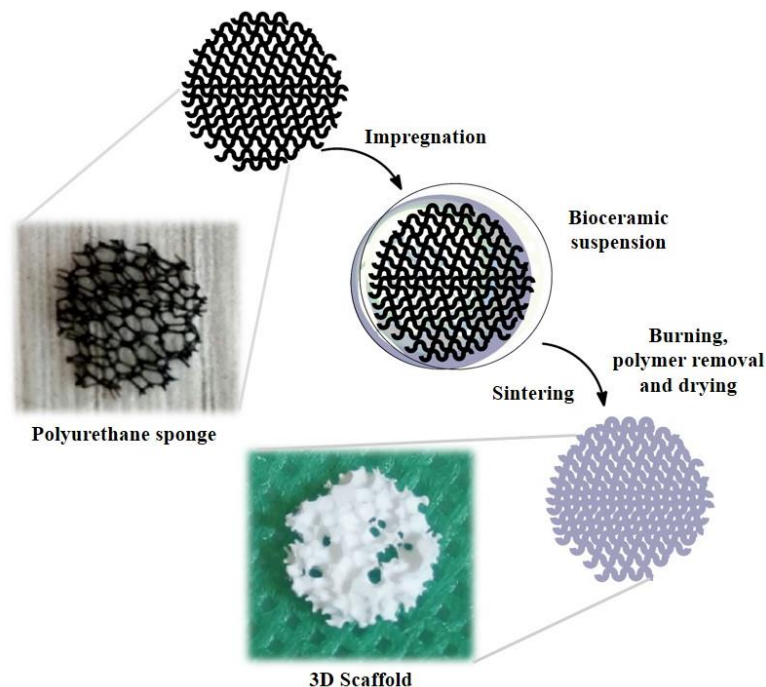


Fig. 2 3D Scaffolds production using the polyurethane sponge impregnation method.

After that, the materials were cooled at 2°C (35.6°F)/min until 1000°C (1832°F); and finished through cooling to 5°C (41°F)/min to room temperature. At the end, 3D scaffolds with interconnected pores and different roughness between biomaterials were obtained, as can be seen by scanning electron microscopy (SEM) (*TM-1000 – Hitachi*[®], Tokyo, Japan) in figure 3.

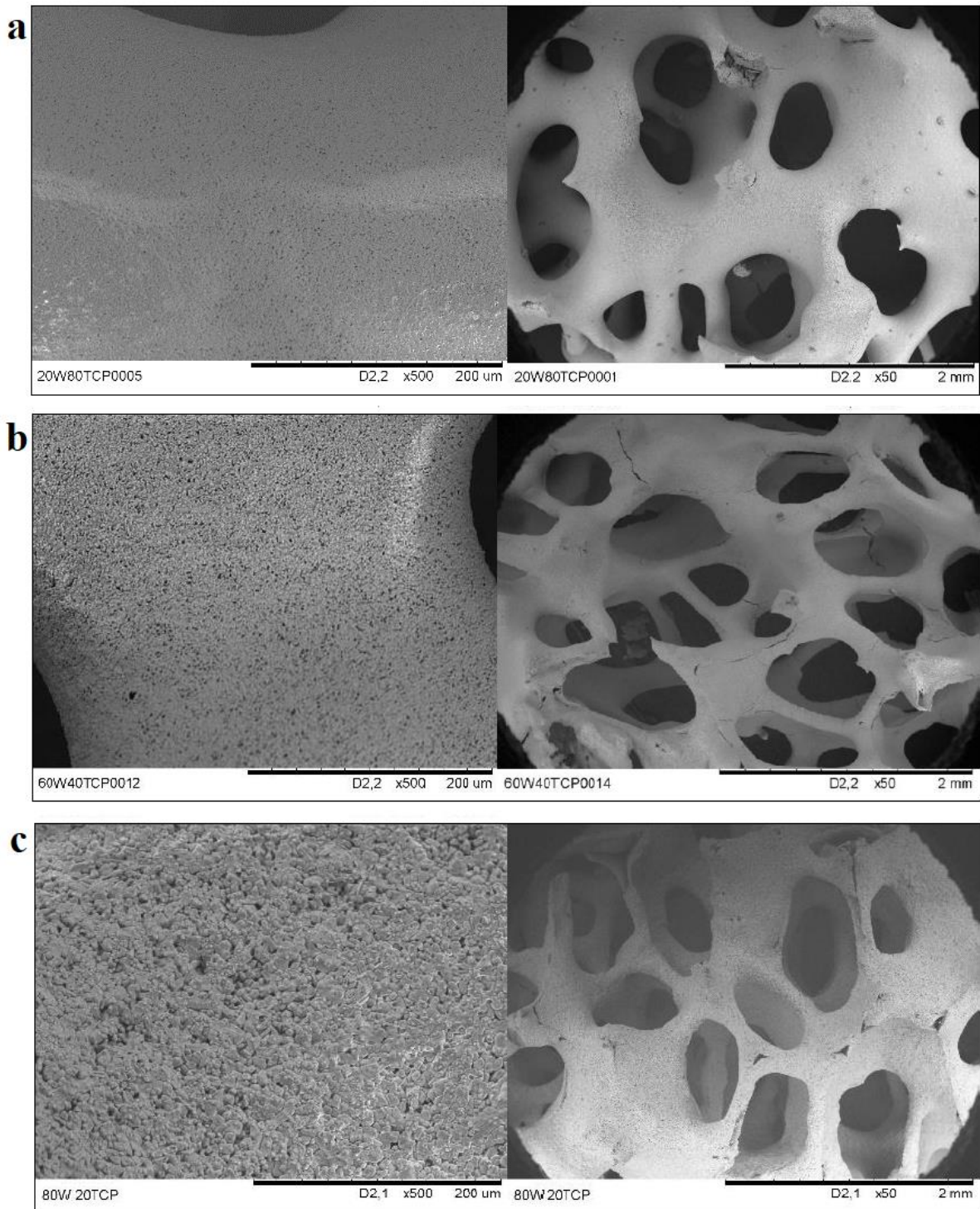


Fig. 3 SEM of the 3D scaffolds. (a) 20W/80 β -TCP (wt. %), (b) 60W/40 β -TCP (wt. %) and (c) 80W/20 β -TCP (wt. %). In “a”, there is a less rough surface with smaller pores, in relation to the other scaffolds; in “b”, superficial roughness and pore size are intermediate; in “c”, the surface is rougher and the pores larger.

The analysis of the superficial area (*Monosorb Surface Area Analyzer MS13* – *Quantachrome*[®], Florida, U.S.A.) of the scaffolds revealed similarity between the materials: 20W/80 β -TCP (wt. %) – 0.012 m²/g; 60W/40 β -TCP (wt. %) – 0.014 m²/g; 80W/20 β -TCP (wt. %) – 0.015 m²/g. The X-ray diffraction (XRD) (*Advance D8* – *Bruker*[®], Massachusetts, U.S.A.) evidenced high peaks with narrow bases, with similar sizes, in the sample 20W/80 β -TCP (wt. %), corresponding to the crystalline phase of the β -TCP (*JCPDS card number 9-169*)¹⁹; in the 60W/40 β -TCP (wt. %) sample the height of the peaks were similar between α -W (wollastonite or pseudowollastonite congener) and β -TCP and the widths of the bases, with lower intensity, more evident, reveal less crystallinity and greater heterogeneity of the crystals of α -W and β -TCP; in the sample 80W/20 β -TCP (wt. %) high peaks with narrow bases corresponding to the homogeneity of the crystals of α -W (*JCPDS card number 10-486*)²⁰ (Fig. 4).

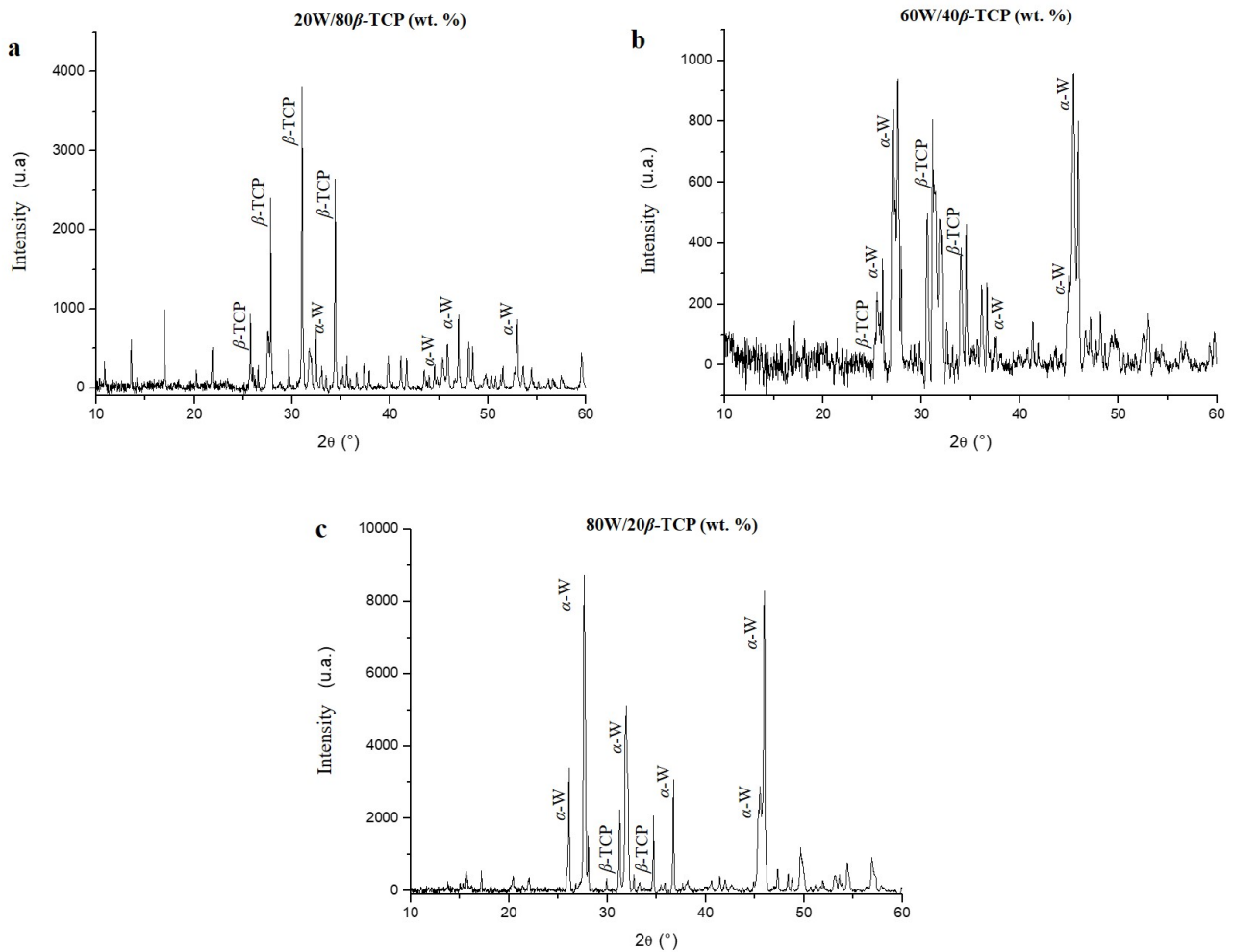


Fig.4 XRD of the scaffolds. (a) 20W/80 β -TCP (wt. %), (b) 60W/40 β -TCP (wt. %) and (c) 80W/20 β -TCP (wt. %).

Experimental surgical procedures

The experimental procedures were carried out in accordance with the Ethical Standards for Research on Animals (Law number 11,794, 2008) and Guidelines of the National Institute of Health for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication number 85–23, rev. 1985), after approval by the Ethics Committee on the Use of Animals, from the Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, protocol 129/2017.

Thirty male adult albino *Wistar* rats with body weight between 350–400g were randomly distributed in three experimental groups, with five animals in each: W-20 (20W/80 β -TCP wt. %),

W-60 (60W/40 β -TCP wt. %) and W-80 (80W/20 β -TCP wt. %), evaluated by optical microscopy at the biological points of 15 and 45 days. Throughout the experiment, the animals were kept in individual plastic boxes, identified according to the experimental group and biological point; and received feed and water *ad libitum*.

After general anesthesia (ketamine hydrochloride 0.1 mL/100g) and analgesia (xylazine hydrochloride 0.04 mL/100g), the surgical procedure was performed to make the critical bone defect (8 mm in diameter), as described by Miguel *et al.*²¹ and illustrated in Santos *et al.*²². Then, the scaffolds was implanted in the bone defect according to the experimental group.

At the biological points of 15 and 45 days, the animals were euthanized with a lethal dose of the anesthetic. Posteriorly, the upper portion of the calvaria was removed, followed by removal of the soft tissue and fixation in 4% formaldehyde for 72 hours. The specimens were decalcified in 7% nitric acid (2 hours) and included in paraffin. The blocks were cut with 5 μ m thick, in the transversal direction of the calvaria, and stained with Hematoxylin-Eosin (HE) and Picrosirius red (PIFG) to identify collagen fibers. Histological images were obtained by a digital camera (*DFC310FX – Leica*[®], Wetzlar, Germany) coupled to the optical microscope (*DM6 B – Leica*[®], Wetzlar, Germany). In the histomorphometric analysis, the software Leica Application Suite (*LAS v. 4.12 – Leica*[®], Wetzlar, Germany) was used to quantify the linear filling (mm) and the area (mm²) of the critical bone defect by the neoformed bone. In order to compare the differences between the experimental groups, fixing the biological point and testing different groups, the *Kruskal-Wallis's test* (between three groups) and the *Mann-Whitney's test* (between two groups) were used. To compare the differences between the experimental groups fixing the group and testing different biological points, the *Wilcoxon Signed Ranks test* was used. The analysis were performed using the International Business Machines Statistical Package for the Social Sciences (*IBM SPSS*[®] v. 20 for Windows 2010, New York, U.S.A.), with a 5% significance level ($p < 0.05$).

Results

Histomorphological analysis

15 days biological point

In the three experimental groups, neoformation of osteoid matrix associated with the bone edges of the defect (reactional aspect) and in a centripetal direction was evidenced. This finding was more evident in the W-20 group, which presented areas of osteoid matrix with active osteoblasts along the defect, sometimes at the interface with the biomaterial (Fig. 5). In the W-60 (Fig. 6) and W-80 groups (Fig. 7), this neoformation was moderate compared to the W-20. In the three experimental groups, the spaces occupied by the scaffolds before histological processing showed varied morphology and size, permeated by fibrous septa, more evident in the W-80 (Fig 8). Surrounding these spaces, granulation tissue rich in collagen fibers and blood capillaries was noted. The inflammatory response observed in the three experimental groups was chronic granulomatous type with mononuclear cells, some neutrophils and multinucleated giant cells. At W-80, more neutrophils were observed in relation to the other groups.

W-20 15 days

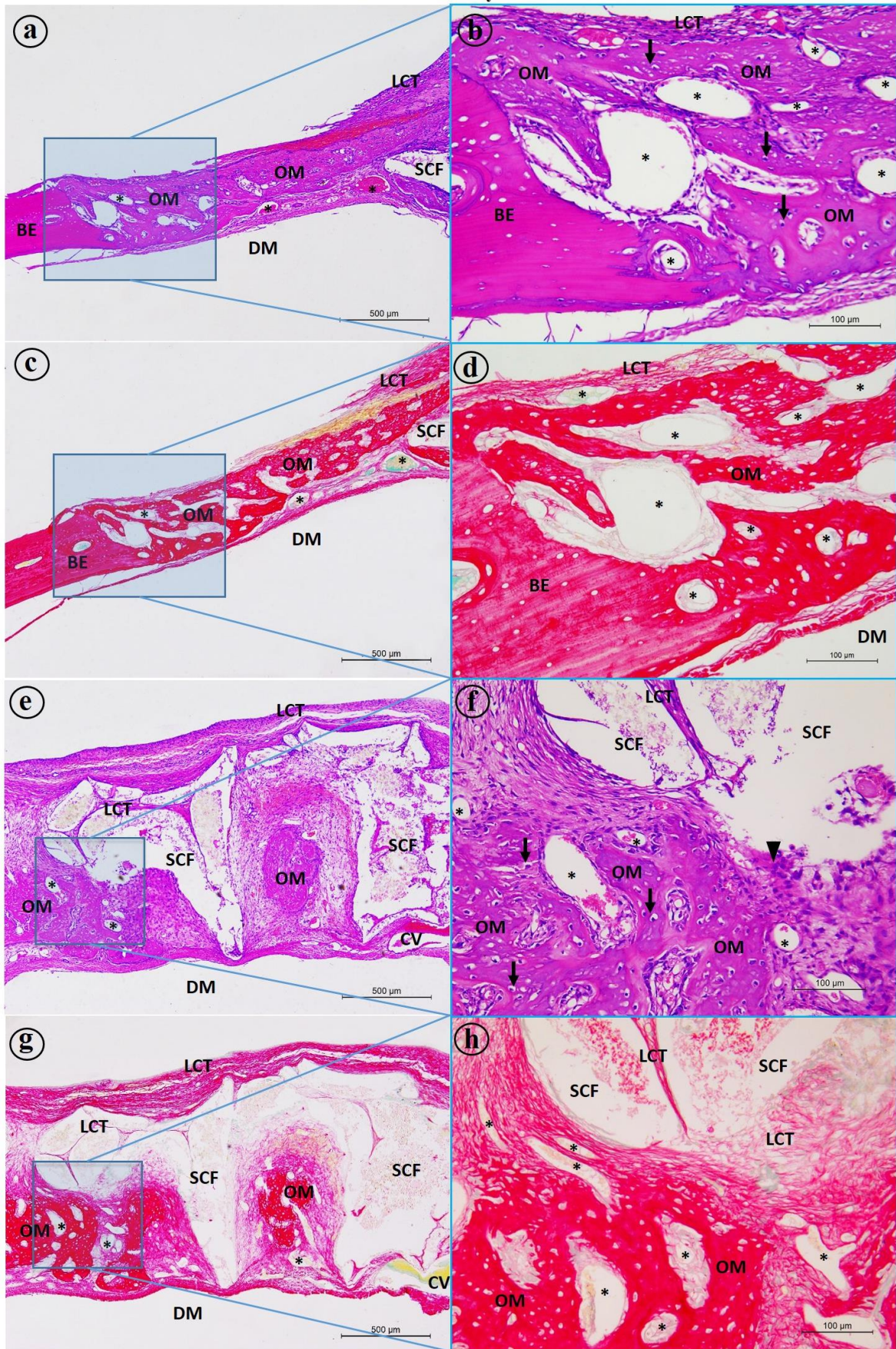


Fig. 5 Photomicrograph of the W-20, after 15 days of implantation of the biomaterials. Neoformation of abundant osteoid matrix (OM), with osteocytes (black arrow) and thickness proportional to the bone edges (BE) and presence of blood vessels (*) (b and d). Central region of the defect with osteoid matrix, large amount of osteocytes and blood vessels (f and h). Central vein (CV), dura mater region (DM), loose connective tissue (LCT), scaffold (SCF), multinucleated giant cell (arrow head). Colorations: HE (a, b, e and f) and PIFG (c, d, g and h).

W-60 15 days

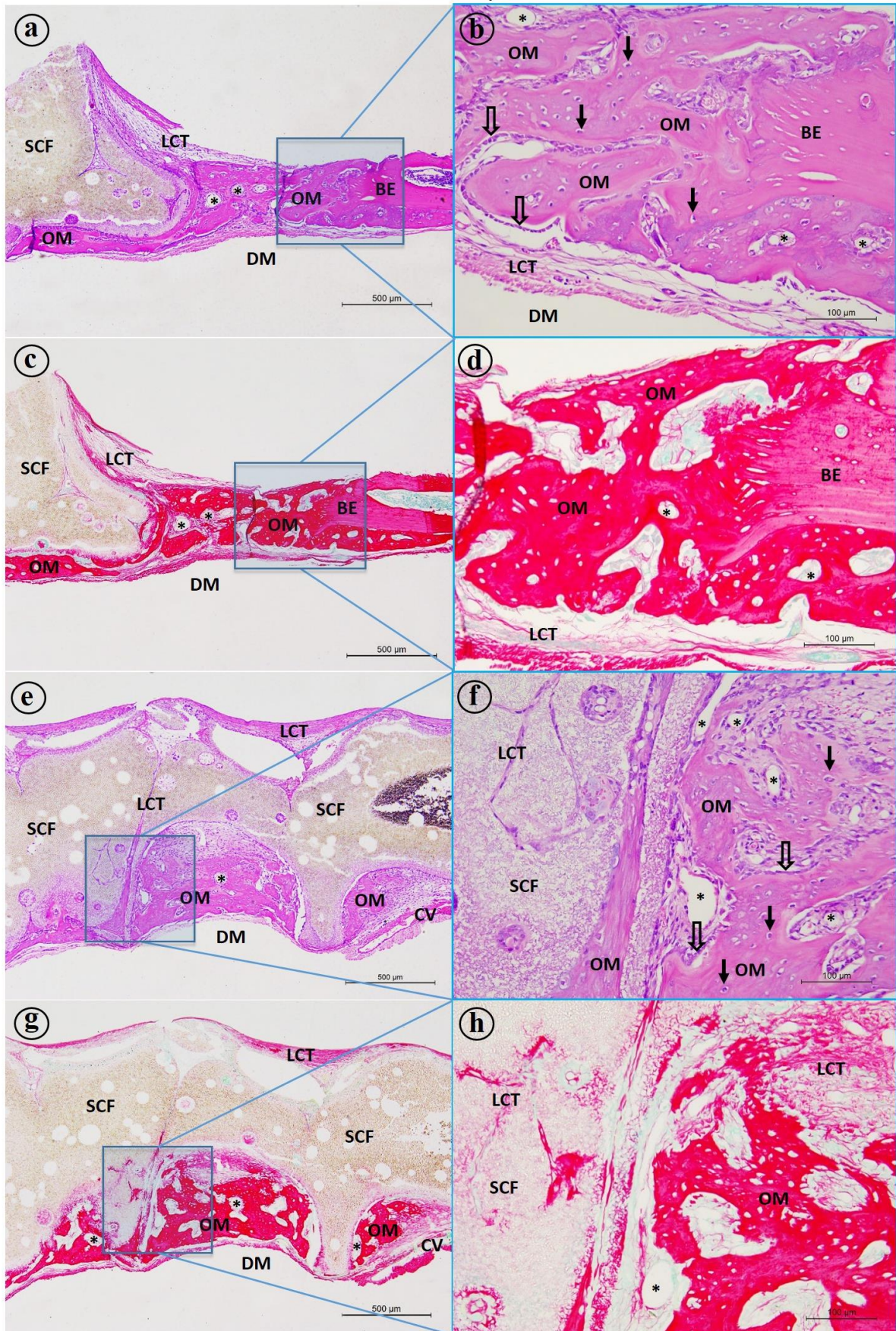


Fig. 6 Photomicrograph of the W-60, after 15 days of implantation of the biomaterials. It is noticed osteointegration between the bone tissue remaining from the edge and the neoformed osteoid matrix with proportional thickness (b and d), visibly active osteoblasts (colorless arrow) and a large number of osteocytes. Central region of the defect, it is noticed osteoid matrix and blood vessels associated to the biomaterial (f and h). Colorations: HE (a, b, e and f) and PIFG (c, d, g and h).

W-80 15 days

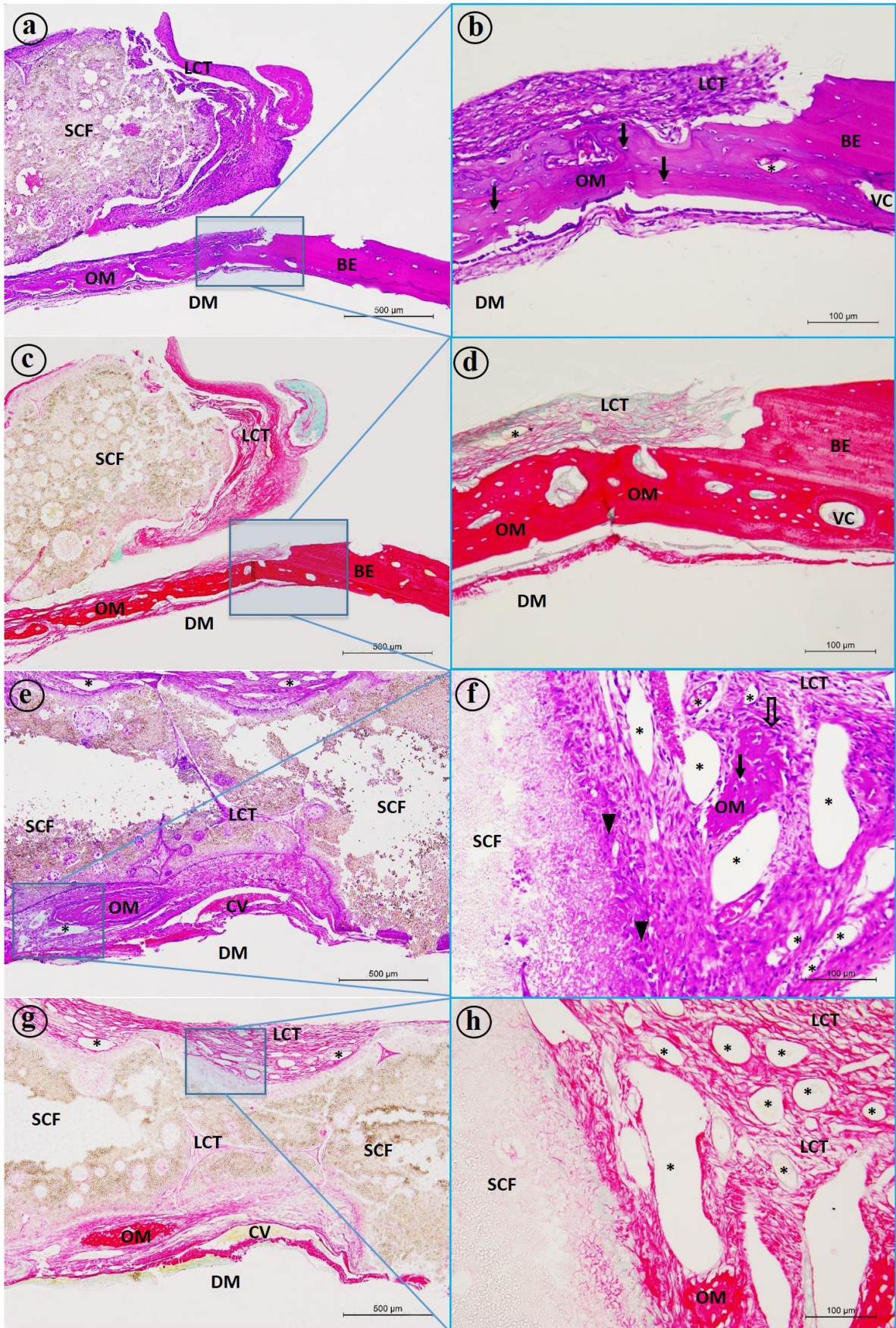


Fig. 7 Photomicrograph of the W-80, after 15 days of implantation of the biomaterials. Neoformed osteoid matrix associated to the bone edges (b and d). Central region, it is remarked the integration of the scaffold with the newly formed connective tissue surrounding the biomaterial, foci of osteoid matrix, blood vessels and few multinucleated giant cells (f and h). Vascular channel (VC). Colorations: HE (a, b, e and f) and PIFG (c, d, g and h).

45 days biological point

At 45 days, compared to the previous biological point, the neoformed osteoid matrix was more evident in the three experimental groups, both in the bone edge and central regions. In the W-20 group, bone marrow formation, cementation lines, *Havers* and *Volkman* channels, and *Haversian systems* were observed in almost the entire linear extent of the defect (Fig. 9). These findings were less evident in the other groups (Fig. 10 and 11). The spaces previously filled up with the scaffolds, in the three groups, sometimes appeared to be filled with an osteoid matrix, most notably in the W-20 group (Fig. 9), sometimes infiltrated or surrounded by loose connective tissue and mesenchymal cells, more evident in the W-80 group (Fig. 11). The chronic granulomatous inflammatory response was regressive in relation to the 15 days. In the W-80, this reaction was more prominent, mainly in the middle of biomaterials.

W-20 45 days

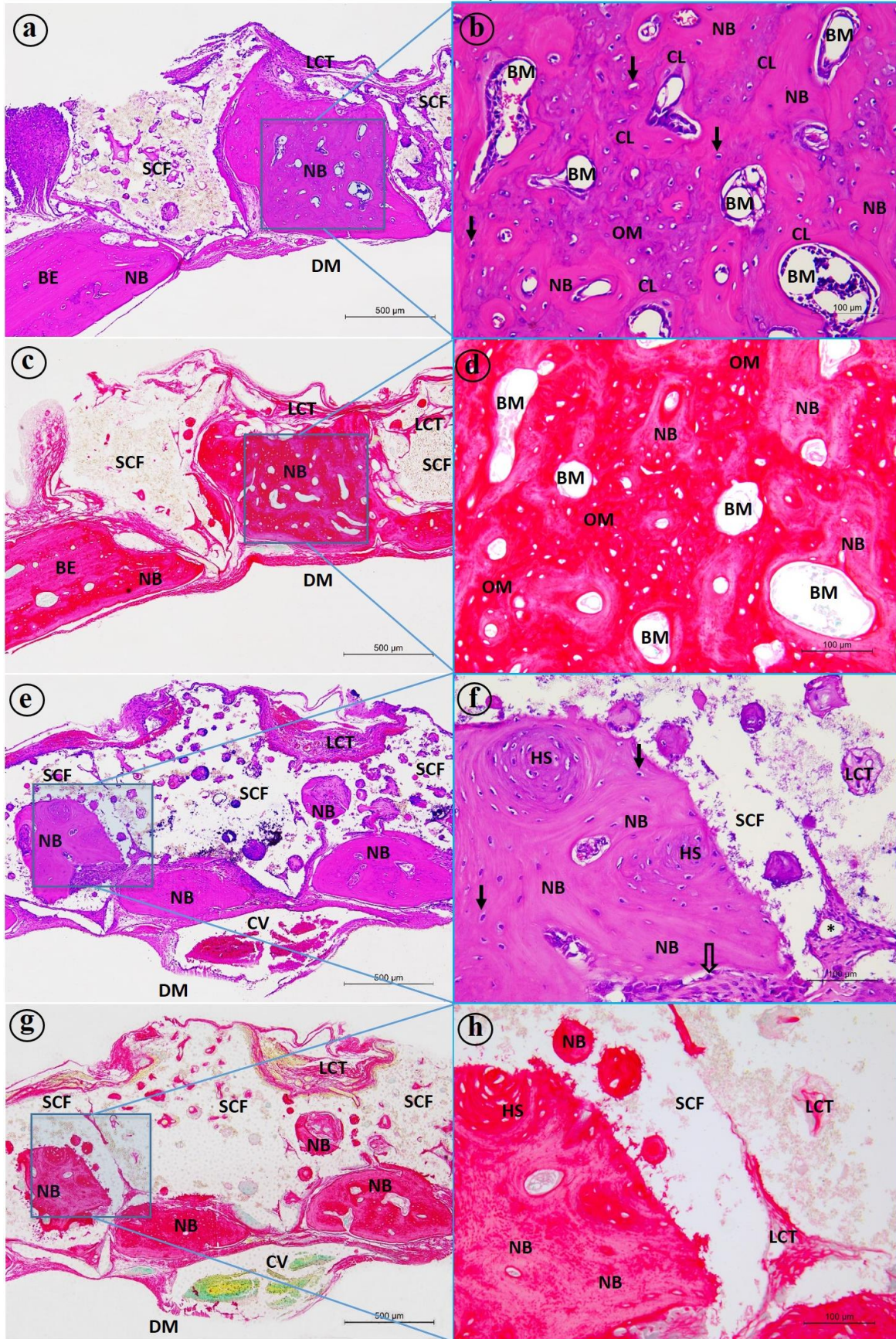


Fig. 8 Photomicrograph of the W-20, after 45 days of implantation of the biomaterials. It is noticed, in the areas of neofomed bone (NB) in the bone edge region (b and d), bone marrow (BM), cementing lines (CL) and osteocytes. Central region (f and h) it is observed large amount of osteocytes and *Haversian systems* (HS) in the newly formed bone matrix, evidence of the organization of this tissue. Colorations: HE (a, b, e and f) and PIFG (c, d, g and h).

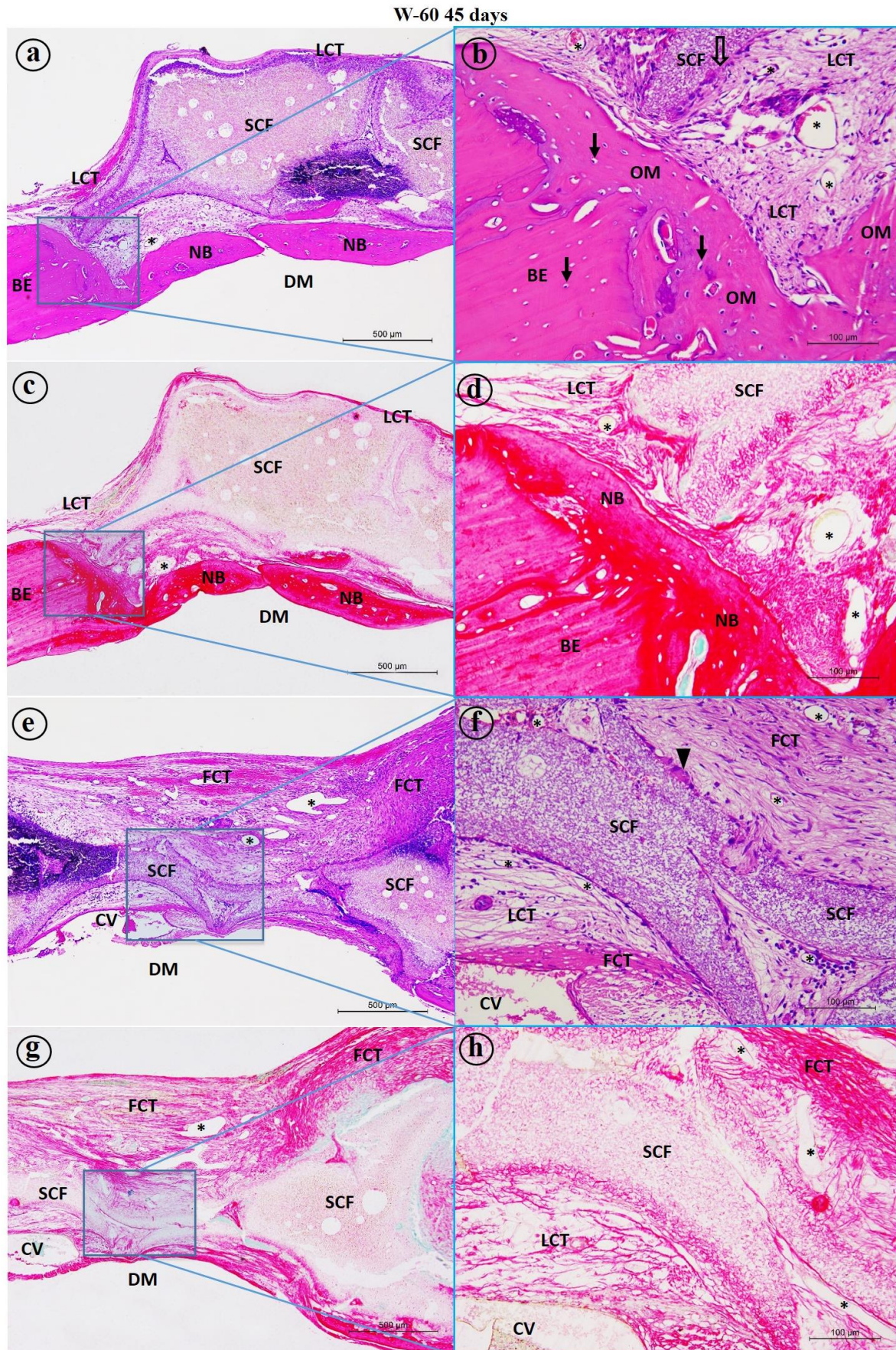


Fig. 9 Photomicrograph of the W-60, after 45 days of implantation of the biomaterials. In the bone edge regions, osteoid matrix integrated to the bone edge, with the presence of osteocytes, associated with loose vascularized connective tissue, in which osteoblasts surrounding to the scaffold (b and d). In the central region it is evidenced formation of loose conjunctive tissue with multinucleated giant cells on the surface of the biomaterials and blood vessels, and some areas of fibrous conjunctive tissue (FCT) (f and h). Colorations: HE (a, b, e and f) and PIFG (c, d, g and h).

W-80 45 days

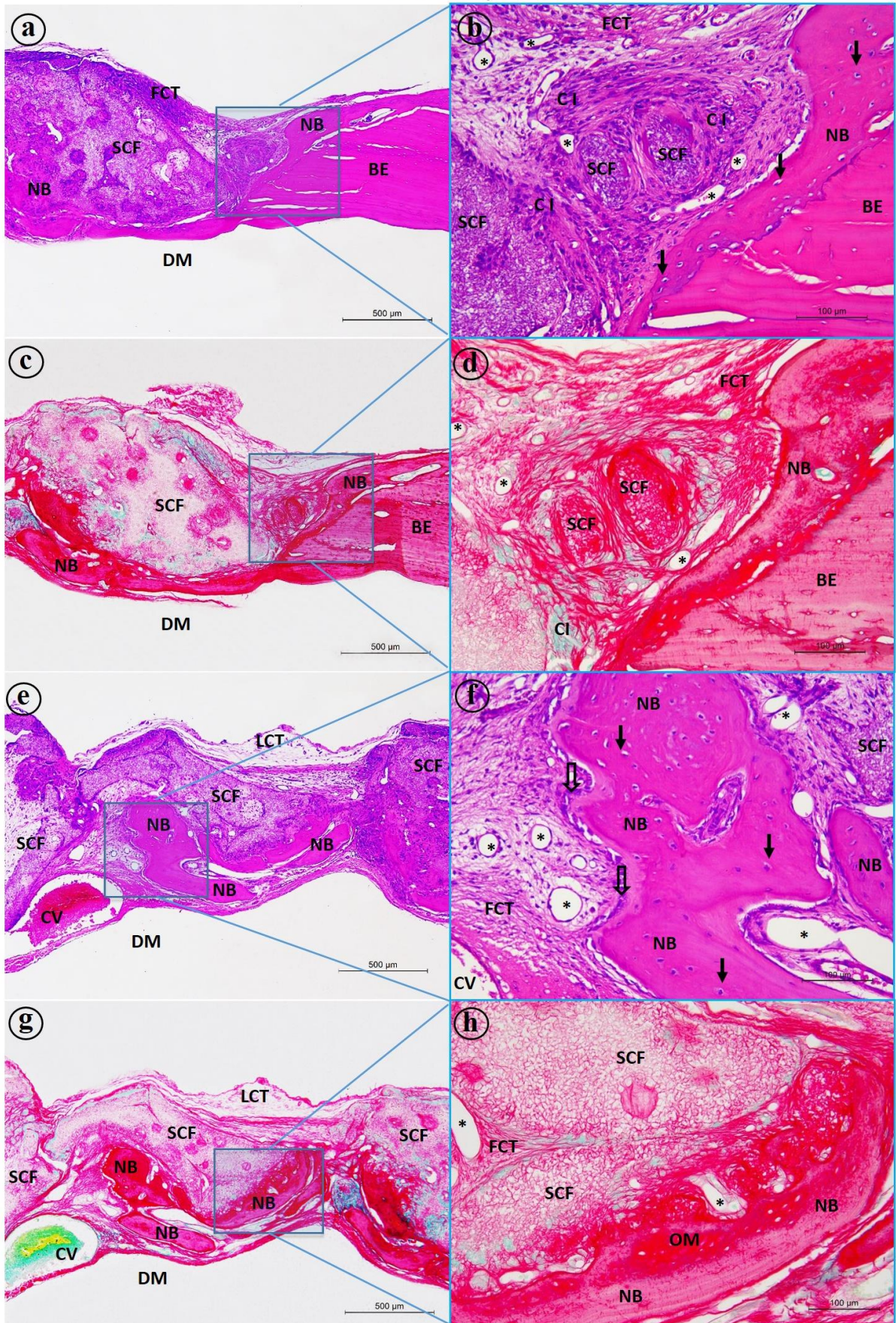


Fig. 10 Photomicrograph of the W-80, after 45 days of implantation of the biomaterials. It is evidenced an osteoid matrix associated with the bone edge, chronic granulomatous inflammation (CI) surrounding the biomaterial (b and d). In the central region, it is observed areas of neoformed bone with active osteoblasts and osteocytes, surrounded by loose conjunctive tissue rich in blood vessels (f and h). In h, it is noticed a deposition of an osteoid matrix in a centripetal form in the scaffold and the organization of neoformed bone tissue in layers. Colorations: HE (a, b, e and f) and PIFG (c, d, g and h).

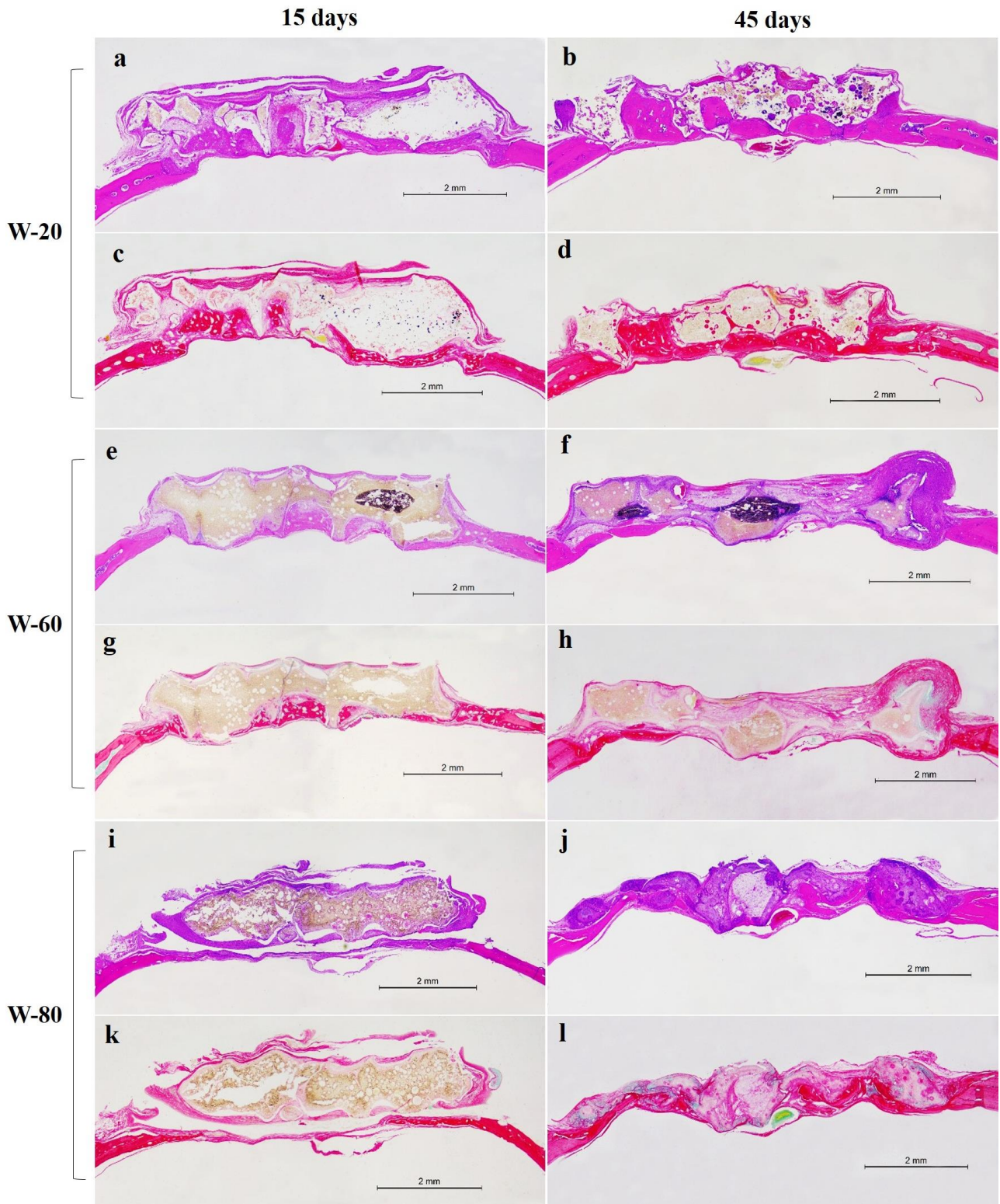


Fig. 11 Photomicrograph of the defect filling up in the three experimental groups, throughout the experiment. It is noticed that the scaffolds remained at the implantation site. Colorations: HE (a, b, e, f, i and j) and PIFG (c, d, g, h, k and l).

Histomorphometric and statistical analysis

The linear extension analysis of the neoformed osteoid matrix, among groups, pointed to statistically significant difference between the means of the W-60 and W-80 groups (*Mann-Whitney* $p = 0.044$), only at the biological point of 15 days, as shown in the Table 1. Throughout the experiment, it was detected a statistically significant increasing in neoformed bone only in the W-80 group (*Wilcoxon* $p = 0.028$).

Biological points				
Group	15 days		45 days	Wilcoxon
W-20	2.6 ± 1.1 (33%)		3.8 ± 1.5 (51%)	$p = 0.173$ NS
W-60	3.3 ± 0.2 (43%)		2.0 ± 0.9 (23%)	$p = 0.080$ NS
W-80	1.6 ± 0.1 (20%)		2.9 ± 1.5 (37%)	$p = 0.028$ S
		15 days		45 days
<i>Kruskal-Wallis</i>	W-20 x W-60 x W-80	$p = 0.079$ NS	W-20 x W-60 x W-80	$p = 0.159$ NS
	W-20 x W-60	$p = 0.359$ NS	W-20 x W-60	$p = 0.068$ NS
<i>Mann-Whitney</i>	W-20 x W-80	$p = 0.109$ NS	W-20 x W-80	$p = 0.337$ NS
	W-60 x W-80	$p = 0.044$ S	W-60 x W-80	$p = 0.273$ NS

Tab. 1 Linear extension (mm) of defect filling up by neoformed bone in relation to the total linear extension of the defect. Means, standard deviation and percentage.

NS = Not significant. S = Significant.

Regarding the area of neoformed bone that was measured, the analysis pointed to a

statistically significant increasing, throughout the experiment, only in the W-20 group (*Wilcoxon* $p = 0.046$). The comparison of the area averages obtained, among the groups, did not evidence any statistically significant difference, in any of the biological points evaluated (*Kruskal-Wallis* $p > 0.05$ and *Mann-Whitney* $p > 0.05$) (Table 2).

Biological points					
Group	15 days		45 days		Wilcoxon
W-20	0.6 ± 0.3 (19%)		1.5 ± 0.5 (47%)		$p = 0.046$ <i>S</i>
W-60	0.7 ± 0.4 (22%)		0.5 ± 0.2 (14%)		$p = 0.686$ <i>NS</i>
W-80	0.4 ± 0.3 (11%)		0.8 ± 0.6 (26%)		$p = 0.173$ <i>NS</i>

		15 days		45 days	
Kruskal-Wallis	W-20 x W-60 x W-80	$p = 0.295$ <i>NS</i>	W-20 x W-60 x W-80	$p = 0.159$ <i>NS</i>	
	W-20 x W-60	$p = 0.271$ <i>NS</i>	W-20 x W-60	$p = 0.068$ <i>NS</i>	
Mann-Whitney	W-20 x W-80	$p = 0.200$ <i>NS</i>	W-20 x W-80	$p = 0.337$ <i>NS</i>	
	W-60 x W-80	$p = 0.271$ <i>NS</i>	W-60 x W-80	$p = 0.273$ <i>NS</i>	

Tab. 2 Area (mm²) of defect filling up by neoformed bone in relation to the total defect. Means, standard deviation and percentage.

NS = Not significant. *S* = Significant.

Discussion

Composites have attracted the attention of scientists worldwide, in view of the broad possibility of association among different raw materials and the perspective of obtaining biomaterials with superior characteristics to those observed when the material is used individually.

Therefore, this study was developed with the purpose of evaluating, *in vivo*, the potential for bone neoformation of W/ β -TCP composites, in different proportions, in the 3D scaffolds format with interconnected pores. For this, differently of all *in vivo* studies found in the literature, performed previously, which used rabbits as an experimental animal model,^{7,23-27} this research brings as a differential and novelty the evaluation of these scaffolds in critical-size bone defect (8 mm), in rat calvaria, gold standard surgical model in the evaluation of the osteogenic potential of biomaterials for bone regeneration²⁸. In this condition, tissue repair occurs through fibrosis with reduced thickness due to the absence of 3D scaffold, essential to regeneration.² In this study, no control group with bone defect was used without implantation of the scaffold, in consonance with the principles of the *3R's (Replacement, Reduction and Refinement)* and with results established in the literature,^{26,29,30} and found by our group.^{2,22,31,32}

Our study evidenced that the composites, regardless of the percentage (wt. %) of association between the raw materials (W and β -TCP), remained at the implantation site throughout the experiment and enabled bone neoformation, in almost all extension of the bone defect, most evident in the W-20 (51%) and W-60 at 15 days, and W-20 and W-80 at 45 days. The findings found at W-20 were similar to those found by Miguel *et al.*², who evidenced 66% of bone neoformation at 45 days, although these authors used natural collagen-based scaffolds. This demonstrates that the scaffolds have physicalchemical characteristics, topography, 3D architecture and porosity favorable to tissue neoformation, as proposed by Karageorgiou and Kaplan⁶ and Tumedei, Savadori and Del Fabbro¹ and demonstrated in previous studies.^{23,24,27} In addition, throughout the experiment, our scaffolds were not encapsulated, differently of studies that evaluated particulate biomaterials or microspheres^{22,31-34} which presented limited regenerative potential, with the formation of fibrosis in way circumjacent to biomaterials.

The scaffolds triggered a granulomatous chronic inflammatory response, presumed after

implantation of any type of biomaterial *in vivo*.^{2,35,36} This finding corroborates with those found in the studies by Wang *et al.*²³, Liu *et al.*²⁴ and Xu *et al.*²⁶, who also used calcium silicate (CS) composites associated with β -TCP, which reported a scarce chronic inflammatory response after implantation of biomaterials. In our study, this reaction was more noticeable on the W-80, at the two biological points, possibly due to the more evident superficial roughness in this scaffold (Fig. 3), which influences the cellular response adjacent to the biomaterial.^{22,35-39} Another factor that can explain this difference is the ionic concentration of calcium (Ca^{2+}) and silicon (Si) at the implantation site.¹⁰ However, this interrelation is still unclear, which limits to affirm the influence of Si on cellular behavior.⁴⁰

Parallel to the inflammatory response, it was noticed formation of blood capillaries in the interstice of the three experimental groups, throughout the experiment. This angiogenesis is essential for the distribution of oxygen and nutrients, indispensable for the formation, maturation and maintenance of bone tissue.^{2,41} These findings suggest that the Si present in W, and the scaffold shape, contributed to neovascularization, considering that this ion directly or indirectly induces the release of angiogenic factors by fibroblasts, which activate specific endothelial cell receptors and initiate to the cascade of chemical reactions involved in the angiogenesis mechanism.^{11,42,43}

The composites evaluated in this study enabled the cellular events of adhesion, migration, proliferation and differentiation cellular, and neoformation of osteoid matrix followed by areas of mineralization, throughout the extension of the scaffolds, in the three experimental groups, throughout the experiment. These findings were more conspicuous in the W-20 group (51%), especially at 45 days. At this biological point, it was possible to evidence cement lines, *Havers* and *Volkman* canals, *Haversian systems* and bone marrow (Fig. 9b and 9f). These findings indicate that Si may have induced the differentiation and proliferation of cells of the osteogenic lineage, as well as increased osteoblast activity, as observed during bone regeneration seen under

physiological conditions.^{11,15,24,42-45} In addition, it has been reported that composites containing Si induce greater expression and release of osteopontin, alkaline phosphatase, type I collagen and osteocalcin within scaffolds.^{10,23,42,44} However, in groups W-60 and W-80, which presented a higher percentage of W, these findings were not as evident as in W-20, at the end of the experiment. In addition, at W-60, as observed by Wang *et al.*,²³ there was a regression in the percentage of neoformed osteoid matrix throughout the experiment. This may have occurred due to the high concentrations of Si, harmful to the cells.^{4,44,46} Despite this, in the studies by Wang *et al.*,²³ Liu *et al.*,²⁴ and Xu *et al.*,²⁶ who used scaffolds containing 80% (wt.), 50% (wt.) and 70.1% (wt.) of CS, respectively, bone matrix neoformation, rich in osteocytes, was notorious. This finding was attributed by these authors to bioactivity and osteostimulatory capacity, which is fundamental for clinical use. However, in these works, the experimental models used were non-critical bone defects, in femur^{23,24} and in calvaria²⁶ of rabbits.

For beyond of the influence of chemical composition on bone neoformation, the roughness is a physicalchemical characteristic that determines cellular behavior when in contact with biomaterial, insofar as it influences adhesion, spreading and proliferation cell, and the synthesis of osteoid matrix by osteogenic cells.^{37,39} In our study, the scaffolds of W-60 and W-80, scaffolds with more evident roughness on the SEM, demonstrated less bone neoformation compared to the W-20, which showed less evident roughness (Fig. 3). The bone neoformation observed in our study, in the three experimental groups, was seen both circumjacent and within the scaffolds, in proportion to the biodegradation and/or bioresorption of the composites.^{42,44} If the speed of biodegradation did not correspond to the migration of osteoprogenitor cells, would occur, predominant, deposition of fibrous conjunctive tissue, which does not exercise the physiological functions of natural bone. Our findings confirm the results of Wang *et al.*,²³ Liu *et al.*²⁴ and Ke *et al.*,⁷ who evidenced superior performance in the balance between biodegradation/bioresorption/neoformation in the composites

compared to CS and β -TCP, when used individually.

Although β -TCP is a characteristically biodegradable and/or bioresorbed material long before the consolidation of the bone regeneration mechanism,^{7,9-11,14,23,47} this fact was not observed in the W-20 group, where the composites presented a higher percentage of β -TCP (80% wt.). In the W-80 group, which had a lower percentage of β -TCP 20% (wt.), biodegradation occurred more noticeable. This can be attributed to the presence of Si associated with TCP, which decreases the temperature of the phase transition from β -TCP to α -TCP, stabilizing the α -TCP phase at room temperature.⁴⁰⁻⁴⁴ Another factor that may justify these findings is the presence of the neoformed osteoid matrix on the surface of the W-20 scaffolds, which reduced the exposure of the biomaterial to body fluids and multinucleated cells, making it difficult the biodegradation of material mediated by body fluids and the bioresorption mediated by cells²⁴. In the W-80, the greater porosity (fig. 3), too, may have favored greater biodegradation in relation to the others, as this characteristic influences, in the same way, on biodegradation and/or bioresorption⁶. This variation in porosity among the scaffolds can be attributed to the different maturation points of the ceramic bodies and different melting actions of W and β -TCP and to the variation in the concentrations of these bioceramics in the three samples.¹⁹⁻⁴⁸

The association of W with β -TCP, in the shape of scaffolds, with interconnected pores, proposed in our study, indicated the potential use of these new biomaterials in future clinical applications. New experimental studies are needed to determine the influence of Si on cellular behavior during bone repair, as well as the osteogenic and angiogenic potential of these compounds at long-term.

Conclusion

The W/ β -TCP composites evaluated in this work, in the three percentages of association, were biocompatible, osteoconductive and acted as bioactive scaffolds favorable to bone repair.

In the three experimental groups, the evident osteointegration of biomaterials with the mature bone tissue remaining at the edges and with neoformed bone along the bone defect, throughout the experiment, demonstrated the remarkable bioactivity of the scaffolds.

Histomorphometrically, the W-20 (20W/80 β -TCP wt. %) presented more evident osteogenic potential in relation to other composites, imminent for clinical use.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

We greatly appreciate the financial support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- (1) M. Tumedei, P. Savadori, M. Del Fabbro, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, **20**, 1-20. DOI: 10.3390/ijms20174221.
- (2) F. B. Miguel, A. A. Barbosa Junior, F. L. de Paula, I. C. Barreto, G. Goissis, F. P. Rosa, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2013, **24**, 2567-75. DOI: 10.1007/s10856-013-4980-8.
- (3) G. Wang, S. I. Roohani-Esfahani, W. Zhang, K. Lv, G. Yang, X. Ding, D. Zou, D. Cui, H. Zreiqat, X. Jiang, *Sci Rep.*, 2017, **7**, 1-11. DOI: 10.1038/srep41135.
- (4) K. Lin, Y. Liu, H. Huang, L. Chen, Z. Wang, J. Chang, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2015, **26**, 1-8. DOI: 10.1007/s10856-015-5523-2.
- (5) B. Sultankulov, D. Berillo, K. Sultankulova, T. Tokay, A. Saparov. *Biomolecules*, 2019, **9**, 1-16.

DOI: 10.3390/biom9090470.

(6) V. Karageorgiou, D. Kaplan, *Biomaterials*, 2005, **26**, 5474-91. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.

(7) X. Ke, C. Zhuang, X. Yang, J. Fu, S. Xu, L. Xie, Z. Gou, J. Wang, L. Zhang, G. Yang, *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 2017, **9**, 24497-24510. DOI: 10.1021/acsami.7b06798.

(8) L. Siqueira, C. G. Paula, R. F. Gouveia, M. Motisukea, E. S. Trichêsa, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2019, **90**, 635–643. DOI:10.1016/j.jmbbm.2018.11.014.

(9) K. Schickle, K. Zurlinden, C. Bergmann, M. Lindner, A. Kirsten, M. Laub, R. Telle, H. Jennissen, H. Fischer, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2011, **22**, 763-71. DOI: 10.1007/s10856-011-4252-4.

(10) L. Fei, C. Wang, Y. Xue, K. Lin, J. Chang, J. Sun, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2012, **100**, 1237-44. DOI: 10.1002/jbm.b.32688.

(11) Y. Deng, C. Jiang, C. Li, T. Li, M. Peng, J. Wang, K. Dai, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1-14. DOI:10.1038/s41598-017-05196-1.

(12) H. Sun, C. Wu, K. Dai, J. Chang, T. Tang, *Biomaterials*, 2006, **27**, 5651-7. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.07.027.

(13) M. G. Gandolfi, F. Iacono, K. Agee, F. Siboni, F. Tay, D. H. Pashley, C Prati, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2009, **108**, e39-45. DOI: 10.1016/j.tripleo.2009.07.039.

(14) K. Lin, J. Chang, R. Shen, *Biomed. Mater.*, 2009, **4**, 1-8. DOI: 10.1088/1748-6041/4/6/065009.

(15) M. G. Gandolfi, G. Ciapetti, P. Taddei, F. Perut, A. Tinti, M. V. Cardoso, B. Van Meerbeek, C Prati, *Dent. Mater.*, 2010, **26**, 974-92. DOI: 10.1016/j.dental.2010.06.002.

(16) X. Yu, T. Zhao, Y. Qi, J. Luo, J. Fang, X. Yang, X. Liu, T. Xu, Q. Yang, Z. Gou, X. Dai, *Sci. Rep.*, 2018, **8**, 1-9. DOI:10.1038/s41598-018-36200-x.

(17) Z. Tarle, D. Marović, V. Pandurić, *Rad 514 Medical Sciences*, 2012, **38**, 23-38.

(18) C. T. Kao, T. H. Huang, Y. J. Chen, C. J. Hung, C. C. Lin., M. Y. Shie, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2014, **43**, 126-34. DOI: 10.1016/j.msec.2014.06.030.

(19) R. G. Carrodeguas, A. H. De Aza, X. Turrillas, J. P. Pena, S. De Aza, *J. Am. Ceram. Soc.*, 2008, **91**, 1281–6 (2008). DOI: 10.1111/j.1551-2916.2008.02294.x.

(20) L. Zhu, H. Y. Sohn, *J. Ceram. Sci. Tech.*, 2012, **3**, 169-180. DOI: 10.4416/JCST2012-00032.

(21) F. B. Miguel, A. K. Cardoso, A. A. Barbosa Junior, E. Marcantonio Junior, G. Goissis, F. P. Rosa, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2006, **78**, 334-9. DOI: 10.1002/jbm.b.30492.

- (22) G. G. Santos, L. Q. Vasconcelos, S. C. D. S. Poy, R. D. S. Almeida, A. A. Barbosa Júnior, S. R. A. Santos, A. M. Rossi, F. B. Miguel, F. P. Rosa, *Acta Cir. Bras.*, 2019, **34**, 1-11. DOI: 10.1590/s0102-8650201900203.
- (23) C. Wang, Y. Xue, K. Lin, J. Lu, J. Chang, J, *Acta Biomater.*, 2012, **8**, 350-60. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.08.019.
- (24) S. Liu, F. Jin, K. Lin, J. Lu, J. Sun, J. Chang, K. Dai, Fan C, *Biomed. Mater.*, 2013, **8**, 1-9. DOI: 10.1088/1748-6041/8/2/025008.
- (25) A. Parrilla-Almansa, N. García-Carrillo, P. Ros-Tárraga, C. M. Martínez, F. Martínez-Martínez, L. Meseguer-Olmo, P. N. De Aza, *Materials (Basel)*, 2018, **11**, 1-16. DOI: 10.3390/ma11091580.
- (26) A. Xu, C. Zhuang, S. Xu, F. He, L. Xie, X. Yang, Z. Gou, *Sci. Rep.*, 2018, **8**, 1-14. DOI:10.1038/s41598-018-21778-z.
- (27) W. T. Barbosa, K. V. Almeida, G. G. Lima, M. A. Rodriguez, M. V. L. Fook, R. G. Carrodegus, V. Amaro da Silva Junior, F. A. Sousa Segundo, M. J. C. de Sá, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2019, **8**, 1-10. DOI: 10.1002/jbm.b.34462. [Epub ahead of print]
- (28) A. Vajgel, N. Mardas, B. C. Farias, A. Petrie, R. Cimões, N. Donos, *Clin. Oral Implants Res.*, 2014, **25**, 879-93. DOI: 10.1111/clr.12194.
- (29) K. Takagi, M. R. Urist, *Ann. Surg.*, 1982, **196**, 100–9. DOI: 10.1097/00000658-198207000-00020.
- (30) J. P. Schmitz, J. O. Höllinger, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1986, **225**, 299–308. PMID: 3084153.
- (31) R. S. Almeida, I. I. A. Ribeiro, M. H. Prado da Silva, D. N. Rocha, F. B. Miguel, F. P. Rosa, *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, 2014, **13**, 331-336. DOI: 10.9771/cmbio.v13i3.12940.
- (32) I. I. A. Ribeiro, R. S. Almeida, D. N. Rocha, M. H. Prado da Silva, F. B. Miguel, F. P. Rosa, *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, 2014, **13**, 298-302. DOI: 10.9771/cmbio.v13i3.12934.
- (33) R. S. Almeida, M. H. Prado da Silva, D. Navarro da Rocha, I. I. A. Ribeiro, A. A. Barbosa Junior, F. B. Miguel, F. P. Rosa, *Cerâmica*, 2020. [In press]
- (34) V. R. Martinez-Zelaya, L. Zarranz, E. Z. Herrera, A. T. Alves, M. J. Uzeda, E. Mavropoulos, A. L. Rossi, A. Mello, J. M. Granjeiro, M. D. Calasans-Maia, A. M. Rossi, *Int. J. Nanomedicine*, 2019, **10**, 3471-3490. DOI: 10.2147/IJN.S197157.
- (35) J. M. Anderson, A. Rodriguez, D. T. Chang, *Semin. Immunol.*, 2008, **20**, 86–100. DOI: 10.1016/j.smim.2007.11.004.
- (36) J. M. Morais, F. Papadimitrakopoulos, D. J. Burgess, *AAPS J.*, 2010, **12**, 188-96. DOI: 10.1208/s12248-010-9175-3.
- (37) K. Anselme, *Biomaterials*, 2000, **21**, 667-81. DOI: 10.1016/s0142-9612(99)00242-2.

- (38) B. D. Ratner, S. J. Bryant, *Annu.Rev. Biomed. Eng.*, 2004, **6**, 41-75. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027.
- (39) K. Anselme, *Osteoporos Int.*, 201, **22**, 2037-42. DOI: 10.1007/s00198-011-1618-x.
- (40) P. N. De Aza, D. García-Bernal, F. Cagnolini, P. Velasquez, L. Meseguer-Olmo, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2013, **33**, 4009-20. DOI: 10.1016/j.msec.2013.05.043.
- (41) A. Susanto, S. Susannah, B. P. Priosoeryanto, M. H. Satari, I. Komara, *J. Indian. Soc. Periodontol.*, 2019, **23**, 113–118. DOI: 10.4103/jisp.jisp_232_18.
- (42) M. B. Nair, H. K. Varma, K. V. Menon, S. J. Shenoy, A. John, *Acta Biomater.*, 2009, **5**, 1742-55. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.01.009.
- (43) T. Li, M. Peng, Z. Yang, X. Zhou, Y. Deng, C. Jiang, M. Xiao, J. Wang, *Acta Biomater.*, 2018, **15**, 96-107. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.03.012.
- (44) L. Meseguer-Olmo, S. Aznar-Cervantes, P. Mazón, P. N. De Aza, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2012, **23**, 3003-14. DOI: 10.1007/s10856-012-4742-z.
- (45) M. H. Huang, C. T. Kao, Y. W. Chen, T. T. Hsu, D. E. Shieh, T. H. Huang, M. Y. Shie, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2015, **26**, 1-12. DOI: 10.1007/s10856-015-5484-5.
- (46) L. D. Maxim, R. Niebo, M. J. Utell, E. E. McConnell, S. Larosa, A. M. Segrave, *Inhal. Toxicol.*, 2014, **26**, 95-112. DOI: 10.3109/08958378.2013.857372.
- (47) S. Hesarakı, M. Safari, M. A. Shokrgozar, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2009, **91**, 459-69. DOI: 10.1002/jbm.b.31422.
- (48) H. C. M. Lengler, J. Vicenzi, C. P. Bergmann. *Cerâmica Industrial*, 2009, **14**, 14-23.

7 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo investigar, por meio de revisão, e avaliar, por meio de estudo experimental, o potencial osteogênico de compósitos contendo W e TCP, tendo em vista que os biomateriais compósitos têm atraído atenção dos cientistas em todo o mundo, pois possibilitam a associação entre diferentes materiais e a obtenção de biomateriais com características superiores às observadas pelas matérias-primas individualmente. Desta forma, pode-se gerar dados científicos e evidências atualizadas sobre o desempenho destes compósitos no reparo ósseo. Para tanto, elaborou-se uma revisão sistemática e metanálise de estudos *in vivo* que avaliaram, histomorfometricamente, o percentual de neoformação óssea após implantação de compósitos de W/TCP. Concomitantemente, avaliou-se, histomorfometricamente, o reparo de defeito ósseo crítico na calvária de rato após implantação de arcabouços de compósitos de W/ β -TCP, em diferentes percentuais de associação, avaliados nos pontos biológicos de 15 e 45 dias de pós-operatório.

De forma diferencial ao observado na literatura, em que todos os estudos incluídos na metanálise utilizaram diferentes sítios de confecção dos defeitos ósseos (fêmur, tíbia e calvária) em coelhos,^{5,25,28,42,43,45} em nosso estudo experimental, de forma inédita, implantou-se os arcabouços em defeito ósseo crítico (8 mm), na calvária de rato, sítio cirúrgico padrão-ouro na avaliação de biomateriais para a regeneração óssea.⁴⁵ Neste modelo cirúrgico experimental o reparo tecidual ocorre por fibrose com espessura reduzida devido ausência de arcabouço 3D, essencial à regeneração.^{46,47} Assim, os defeitos confeccionados na calvária apresentam características morfológicas que possibilitam a obtenção de dados essenciais à compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta tecidual associada após a implantação dos biomateriais, principalmente, o potencial osteogênico. Nesta região, o tecido ósseo apresenta predominante porção compacta e ínfima porção esponjosa e, devido à ausência de arcabouço, a capacidade regenerativa do tecido ósseo torna-se limitada, evidenciando o potencial osteogênico dos biomateriais implantados.⁴⁸ Todavia, o exato diâmetro do defeito ósseo a ser confeccionado ainda não é consenso na literatura, bem como os pontos biológicos de análise.

Tendo como base o ponto biológico de 12 semanas, único em comum entre os estudos incluídos na metanálise, para avaliação do formato dos biomateriais, notou-se maior percentual de neoformação óssea após implantação dos arcabouços em relação às microesferas. Além disto, ao se comparar as médias de NB entre as condições W>TCP e W<TCP, notou-se uma maior discrepância nos percentuais obtidos com arcabouços do que com microesferas. Esta diferença pode ser justificada pela influência das características estruturais 3D dos arcabouços que são determinantes no comportamento biológico e,

consequentemente, no potencial regenerativo dos biomateriais.^{5,36,41,44,49} Corroborando com estes achados, em nosso experimento os arcabouços viabilizaram os eventos celulares de adesão, migração, proliferação e diferenciação celulares, e neoformação de matriz osteoide seguida de áreas de mineralização, em toda a extensão dos biomateriais, nos três grupos experimentais, ao longo do experimento. Esta neoformação óssea foi mais evidente no grupo W-20 (51%), especialmente, aos 45 dias. Nossos achados foram semelhantes aos de Miguel e colaboradores⁴⁶, que também avaliaram arcabouços, os quais evidenciaram 66% de neoformação óssea aos 45 dias, embora estes autores utilizaram biomaterial colagênico. Isto demonstra que os arcabouços possuem características físico-químicas, topografia, arquitetura e porosidade favoráveis à neoformação tecidual,⁴¹ pois viabiliza a atividade de diferentes tipos celulares, e promove a neovascularização no sítio de implantação, o que favorece a osteogênese no interior da sua estrutura.^{4,5,9,28,42,43,46} Para isto, ressalta-se que os arcabouços devem apresentar poros com, no mínimo, 100 µm, embora 300 µm seja o tamanho mais apropriado aos eventos supracitados, durante a neoformação óssea no interior dos materiais.⁴¹ Além disto, durante todo o experimento, nossos arcabouços permaneceram no sítio de implantação, viabilizaram neoformação óssea, e não foram encapsulados, diferentemente de outros trabalhos que avaliaram biomateriais particulados ou microesferas, as quais deslocaram-se do defeito ósseo com maior facilidade⁵⁰ e apresentaram potencial regenerativo limitado, com formação de fibrose de modo circunjacente aos biomateriais.^{47,50-53} Os achados observados no grupo W-20 também seriam atribuídos ao Si, que pode induzir a diferenciação e proliferação de células da linhagem osteogênica, e aumentar a atividade dos osteoblastos.^{4,7,9,12,21,25,27} Além disto, os compósitos contendo Si induzem maior expressão e liberação de osteopontina, fosfatase alcalina, colágeno tipo I e osteocalcina no interior de arcabouços.^{7,23,27,28} Desta forma, a bioatividade e a capacidade osteoestimuladora dos nossos compósitos são fundamentais para o uso clínico.

Em nossa metanálise, observou-se um contraste entre a neoformação óssea dos compósitos em função do percentual de associação de W e de TCP. Isto pode ser justificado pela concentração iônica de Ca^{2+} e Si,²³ tendo em vista que a presença da W associada ao TCP melhora as propriedades mecânicas do biomaterial, tal como a resistência ao estresse da compressão, o que possibilita a consolidação da neoformação óssea de forma mais rápida no interior destes compósitos.^{6,8,14,34,36} Os biomateriais bioativos contendo Si também são capazes de nuclear a precipitação e a formação de uma camada de CaP amorfo – apatita – na superfície destes materiais e, assim, amplificar o mecanismo de neoformação óssea, *in vivo*.^{7,17,23,25,27,34,43} Sendo assim, o maior percentual de neoformação óssea obtidos após

implantação dos compósitos contendo W>TCP (% m/m) pode ser atribuído ao fato de que, quando comparado com os outros substitutos ósseos, a W apresenta bioatividade mais notória por efeito da liberação de íons Ca^{2+} e SiO_3^{2-} , substanciais durante o mecanismo de osteogênese.^{5,7,15,17,34,43} Estes achados sugerem que o Si presente na W, contribuiu para a neovascularização, haja vista que este íon induz, direta ou indiretamente, a liberação de fatores angiogênicos pelos fibroblastos, que ativam receptores específicos das células endoteliais e dão à cascata de reações químicas envolvidas no mecanismo de angiogênese.^{4,7,9} No entanto, altas concentrações de Si parecem causar morte celular^{18,27} e a inter-relação entre concentração de íons e neoformação óssea ainda não está completamente elucidada, o que limita afirmar a influência do Si no comportamento celular.¹⁶

Apesar das diferentes abordagens metodológicas, os resultados observados nos trabalhos incluídos na nossa metanálise e os achados obtidos em nosso experimento, possibilitam observar que a proposta de associação da W com TCP, no formato de arca-bouços, com poros interconectados, revelou que estes compósitos possuem potencial uso em aplicações clínicas futuras. Sendo assim, para facilitar a compreensão e viabilizar melhor comparação dos resultados, especialmente, em relação à resposta inflamatória, a neoformação óssea e a maturação do tecido mineralizado associado a estes compósitos; evidencia-se que novos estudos precisam ser realizados. Além disto, ainda existem lacunas a respeito do teor ideal de Si nos compósitos, do melhor percentual de associação ente a W e o TCP, e a influência do Si no comportamento celular durante o reparo ósseo, bem como o potencial osteogênico destes compostos, a longo prazo.

8 CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados na literatura e no nosso estudo experimental, pode-se afirmar que a estrutura 3D porosa dos arcabouços promove uma maior neoformação óssea após implantação dos compósitos contendo W e TCP em relação às microesferas.

Os compósitos de W/ β -TCP avaliados no nosso experimento, nos três percentuais de associação, foram biocompatíveis, osteocondutores e atuaram como arcabouços bioativos favoráveis ao reparo ósseo.

Em nosso estudo experimental, a análise histomorfométrica evidenciou que o W-20 (20W/80 β -TCP % m/m) apresentou potencial osteogênico mais notório em relação aos outros compósitos e promissor para uso clínico.

Outrossim, a associação destas duas biocerâmicas apresenta potencial osteogênico favorável para futuras aplicações clínicas, especialmente, nos casos de perdas ósseas extensas.

Frente ao exposto, novos estudos são necessários para determinar o potencial osteogênico e angiogênico dos compósitos de W/ β -TCP a longo prazo; bem como experimentos voltados para a caracterização dos biomateriais estudados e descrição do perfil de liberação e a influência do Si no comportamento e atividade celulares nos sítios de implantação.

REFERÊNCIAS

1. Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, Grigolo B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 Sep 1; 78: 1246-1262. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.017. Epub 2017 May 5.

2. Kazek-Kęsik A, Dercz G, Kalemba I, Suchanek K, Kukharenko AI, Korotin DM, Michalska J, Krzakała A, Piotrowski J, Kurmaev EZ, Cholakh SO, Simka W. Surface characterisation of Ti-15Mo alloy modified by a PEO process in various suspensions. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014 Jun 1; 39 : 259-72. DOI: 10.1016/j.msec.2014.03.008.

3. Wang C, Lin K, Chang J, Sun J. Osteogenesis and angiogenesis induced by porous β -CaSiO₃/PDLGA composite scaffold via activation of AMPK/ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. *Biomaterials.* 2013 Jan; 34(1): 64-77. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.021.

4. Deng Y, Jiang C, Li C, Li T, Peng M, Wang J, Dai K. 3D printed scaffolds of calcium silicate-doped β -TCP synergize with co-cultured endothelial and stromal cells to promote vascularization and bone formation. 3D printed scaffolds of calcium silicate-doped β -TCP synergize with co-cultured endothelial and stromal cells to promote vascularization and bone formation. *Sci Rep.* 2017; 7(5588): 1-14. DOI:10.1038/s41598-017-05196-1.

5. Ke X, Zhuang C, Yang X, Fu J, Xu S, Xie L, Gou Z, Wang J, Zhang L, Yang G. Enhancing the Osteogenic Capability of Core-Shell Bilayered Bioceramic Microspheres with Adjustable Biodegradation. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017 Jul 26; 9(29): 24497-24510. DOI: 10.1021/acsami.7b06798.

6. Wang G, Roohani-Esfahani SI, Zhang W, Lv K, Yang G, Ding X, Zou D, Cui D, Zreiqat H, Jiang X. Effects of Sr-HT-Gahnite on osteogenesis and angiogenesis by adipose derived stem cells for critical-sized calvarial defect repair. *Sci Rep.* 2017 Jan 20; 7: 1-11. DOI: 10.1038/srep41135.

7. Nair MB, Varma HK, Menon KV, Shenoy SJ, John A. Reconstruction of goat femur segmental defects using triphasic ceramic-coated hydroxyapatite in combination with autologous cells and platelet-rich plasma. *Acta Biomater.* 2009 Jun; 5(5): 1742-55. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.01.009.

8. Schmitz JP, Hollinger J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin. Orthop. and Relat. Res.* 1986; 225: 299-308. PMID: 3084153.

9. Li T, Peng M, Yang Z, Zhou X, Deng Y, Jiang C, Xiao M, Wang J. 3D-printed IFN- γ -

loading calcium silicate- β -tricalcium phosphate scaffold sequentially activates M1 and M2 polarization of macrophages to promote vascularization of tissue engineering bone. *Acta Biomater.* 2018 Apr 15; 71: 96-107. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.03.012.

10. Kao CT, Huang TH, Chen YJ, Hung CJ, Lin CC, Shie MY. Using calcium silicate to regulate the physicochemical and biological properties when using β -tricalcium phosphate as bone cement. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014 Oct; 43: 126-34. DOI: 10.1016/j.msec.2014.06.030.

11. Su CC, Kao CT, Hung CJ, Chen YJ, Huang TH, Shie MY. Regulation of physicochemical properties, osteogenesis activity, and fibroblast growth factor-2 release ability of β -tricalcium phosphate for bone cement by calcium silicate. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014 Apr 1; 37: 156-63. DOI: 10.1016/j.msec.2014.01.010.

12. Huang MH, Kao CT, Chen YW, Hsu TT, Shieh DE, Huang TH, Shie MY. The synergistic effects of Chinese herb and injectable calcium silicate/ β -tricalcium phosphate composite on an osteogenic accelerator in vitro. *J Mater Sci Mater Med.* 2015 Apr; 26(4): 161. DOI: 10.1007/s10856-015-5484-5.

13. Wang C, Lin K, Chang J, Sun J. The stimulation of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and vascular endothelial growth factor secretion of endothelial cells by b-CaSiO₃/b-Ca₃(PO₄)₂ scaffolds. *J Biomed Mater Res Part A* 2014; 102A: 2096–2104. DOI: 10.1002/jbm.a.34880.

14. Sola D, Grima L. Laser Machining and In Vitro Assessment of Wollastonite-Tricalcium Phosphate Eutectic Glasses and Glass-Ceramics. *Materials* 2018; 11(125): 1-10. DOI:10.3390/ma11010125.

15. Yu X, Zhao T, Qi Y, Luo J, Fang J, Yang X, Liu X, Xu T, Yang Q, Gou Z, Dai X. In vitro Chondrocyte Responses in Mg-doped Wollastonite/Hydrogel Composite Scaffolds for Osteochondral Interface Regeneration. *Sci Rep.* 2018; 8(17911): 1-9. DOI:10.1038/s41598-018-36200-x.

16. De Aza PN, García-Bernal D, Cragolini F, Velasquez P, Meseguer-Olmo L. The effects of Ca₂SiO₄-Ca₃(PO₄)₂ ceramics on adult human mesenchymal stem cell viability, adhesion, proliferation, differentiation and function. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013 Oct; 33(7): 4009-20. DOI: 10.1016/j.msec.2013.05.043.

17. Ni S, Chang J. In vitro degradation, bioactivity, and cytocompatibility of calcium silicate, dimagnesium silicate, and tricalcium phosphate bioceramics. *J Biomater Appl.* 2009 Aug; 24(2): 139-58. DOI: 10.1177/0885328208094745.

18. Lin K, Liu Y, Huang H, Chen L, Wang Z, Chang J. Degradation and silicon excretion of the calcium silicate bioactive ceramics during bone regeneration using rabbit femur defect model. *J Mater Sci Mater Med*. 2015 Jun; 26(6): 1-8. DOI: 10.1007/s10856-015-5523-2.

19. Gandolfi MG, Iacono F, Agee K, Siboni F, Tay F, Pashley DH, Prati C. Setting time and expansion in different soaking media of experimental accelerated calcium-silicate cements and ProRoot MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Dec; 108(6): e39-45. DOI: 10.1016/j.tripleo.2009.07.039.

20. Lin K, Chang J, Shen R. The effect of powder properties on sintering, microstructure, mechanical strength and degradability of beta-tricalcium phosphate/calcium silicate composite bioceramics. *Biomed Mater*. 2009 Dec; 4(6): 1-8. DOI: 10.1088/1748-6041/4/6/065009.

21. Gandolfi MG, Ciapetti G, Taddei P, Perut F, Tinti A, Cardoso MV, Van Meerbeek B, Prati C. Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. *Dent Mater*. 2010 Oct; 26(10): 974-92. DOI: 10.1016/j.dental.2010.06.002.

22. Gandolfi MG, Shah SN, Feng R, Prati C, Akintoye SO. Biomimetic calcium-silicate cements support differentiation of human orofacial mesenchymal stem cells. *J Endod*. 2011 August; 37(8): 1102–1108. DOI:10.1016/j.joen.2011.05.009.

23. Fei L, Wang C, Xue Y, Lin K, Chang J, Sun J. Osteogenic differentiation of osteoblasts induced by calcium silicate and calcium silicate/ β -tricalcium phosphate composite bioceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012 Jul; 100(5): 1237-44. DOI: 10.1002/jbm.b.32688.

24. Osorio R, Yamauti M, Sauro S, Watson TF, Toledano M. Experimental resin cements containing bioactive fillers reduce matrix metalloproteinase-mediated dentin collagen degradation. *J Endod*. 2012 Sep; 38(9): 1227-32. DOI: 10.1016/j.joen.2012.05.011.

25. Liu S, Jin F, Lin K, Lu J, Sun J, Chang J, Dai K, Fan C. The effect of calcium silicate on in vitro physiochemical properties and in vivo osteogenesis, degradability and bioactivity of porous β -tricalcium phosphate bioceramics. *Biomed Mater*. 2013 Apr; 8(2): 1-9. DOI: 10.1088/1748-6041/8/2/025008.

26. Liu CH, Hung CJ, Huang TH, Lin CC, Kao CT, Shie MY. Odontogenic differentiation of human dental pulp cells by calcium silicate materials stimulating via FGFR/ERK signaling pathway. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 Oct; 43: 359-66. DOI: 10.1016/j.msec.2014.06.025.

27. Meseguer-Olmo L, Aznar-Cervantes S, Mazón P, De Aza PN. "In vitro" behaviour of adult mesenchymal stem cells of human bone marrow origin seeded on a novel bioactive ceramics in the $\text{Ca}_2\text{SiO}_4\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Dec; 23(12): 3003-14. DOI: 10.1007/s10856-012-4742-z.
28. Wang C, Xue Y, Lin K, Lu J, Chang J, Sun J. The enhancement of bone regeneration by a combination of osteoconductivity and osteostimulation using $\beta\text{-CaSiO}_3/\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ composite bioceramics. *Acta Biomater*. 2012 Jan; 8(1): 350-60. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.08.019.
29. Dziadek M, Stodolak-Zych E, Cholewa-Kowalska K. Biodegradable ceramic-polymer composites for biomedical applications: A review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Feb 1; 71: 1175-1191. DOI: 10.1016/j.msec.2016.10.014.
30. Lengler HCM, Vicenzi J, Bergmann CP. Caracterização Comparativa de Fundentes para Emprego na Indústria Cerâmica. *Cerâmica Industrial*, 2009; 14(4): 14-23.
31. Encinas-Romero MA, Peralta-Haley J, Valenzuela-García JL, Castellón-Barraza FF. Synthesis and Structural Characterization of Hydroxyapatite-Wollastonite Biocomposites, Produced by an Alternative Sol-Gel Route. *J Biomater Nanobiotechnol*. 2013; 4(4): 327-333. DOI: 10.4236/jbnb.2013.44041.
32. Martins SC, Soares APM, Viana PRM. Flotação de wollastonita – Uma Revisão. *Anais do XXV Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa & VIII Meeting of the Southern Hemisphere on Mineral Technology*. 2013; 203-210.
33. Saadaldin AS, Dixon SJ, Rizkalla AS. Bioactivity and Biocompatibility of a Novel Wollastonite Glass-Ceramic Biomaterial. *J. Biomater. Tissue Eng*. 2014; 4(11): 939-46. DOI: doi:10.1166/jbt.2014.1261.
34. Hesaraki S, Safari M, Shokrgozar MA. Development of beta-tricalcium phosphate/sol-gel derived bioactive glass composites: physical, mechanical, and in vitro biological evaluations. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Oct; 91(1): 459-69. DOI: 10.1002/jbm.b.31422.
35. Lin K, Liu Y, Huang H, Chen L, Wang Z, Chang J. Degradation and silicon excretion of the calcium silicate bioactive ceramics during bone regeneration using rabbit femur defect model. *J Mater Sci Mater Med*. 2015 Jun; 26(6): 1-8. DOI: 10.1007/s10856-015-5523-2.
36. Siqueira L, Paula CG, Gouveia RF, Motisukea M, Trichêsa ES. Evaluation of the sintering temperature on the mechanical behavior of β -tricalcium phosphate/calcium silicate scaffolds obtained by gelcasting method. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2019; 90(2019): 635–643.

DOI:10.1016/j.jmbbm.2018.11.014.

37. Goswami J, Bhatnagar N, Mohanty S, Ghosh AK. Processing and characterization of poly(lactic acid) based bioactive composites for biomedical scaffold application. *eXPRESS Polymer Letters*, 2013; 7(9): 767–77. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2013.74.
38. Schickle K, Zurlinden K, Bergmann C, Lindner M, Kirsten A, Laub M, Telle R, Jennissen H, Fischer H. Synthesis of novel tricalcium phosphate-bioactive glass composite and functionalization with rhBMP-2. *J Mater Sci Mater Med*. 2011 Apr; 22(4): 763-71. DOI: 10.1007/s10856-011-4252-4.
39. Carrodeguas RG, De Aza AH, Turrillas X, Pena JP, De Aza S. New Approach to the $\beta \rightarrow \alpha$ Polymorphic Transformation in Magnesium-Substituted Tricalcium Phosphate and its Practical Implications. *J. Am. Ceram. Soc.* 2008; 91(4): 1281–6. DOI: 10.1111/j.1551-2916.2008.02294.x.
40. Ahn SH, Se DS, Lee JK. Fabrication of dense β -wollastonite bioceramics by MgSiO_3 addition. *J Ceram Process Res*, 2015; 16(5): 548-54.
41. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005 Sep; 26(27): 5474-91. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
42. Parrilla-Almansa A, García-Carrillo N, Ros-Tárraga P, Martínez CM, Martínez-Martínez F, Meseguer-Olmo L, De Aza PN. Demineralized Bone Matrix Coating Si-Ca-P Ceramic Does Not Improve the Osseointegration of the Scaffold. *Materials (Basel)*. 2018 Sep 1; 11(9): 1-16. DOI: 10.3390/ma11091580.
43. Xu A, Zhuang C, Xu S, He F, Xie L, Yang X, Gou Z. Optimized Bone Regeneration in Calvarial Bone Defect Based on Biodegradation-Tailoring Dual-shell Biphasic Bioactive Ceramic Microspheres. *Sci Rep*. 2018; 8(3385): 1-14. DOI:10.1038/s41598-018-21778-z.
- 44 Barbosa WT, de Almeida KV, de Lima GG, Rodriguez MA, Lia Fook MV, Carrodeguas RG, Amaro da Silva Junior V, de Sousa Segundo FA, de Sá MJC. Synthesis and in vivo evaluation of a scaffold containing wollastonite/ β -TCP for bone repair in a rabbit tibial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019 Aug 8; 1-10. DOI: 10.1002/jbm.b.34462. [Epub ahead of print]
45. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Aug; 25(8): 879-93. DOI: 10.1111/clr.12194.

46. Miguel FB, Barbosa Junior A de A, de Paula FL, Barreto IC, Goissis G, Rosa FP. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. *J Mater Sci Mater Med*. 2013 Nov; 24(11): 2567-75. DOI: 10.1007/s10856-013-4980-8.
47. Santos GGD, Vasconcelos LQ, Poy SCDS, Almeida RDS, Barbosa Júnior A de A, Santos SRA, Rossi AM, Miguel FB, Rosa FP. Influence of the geometry of nanostructured hydroxyapatite and alginate composites in the initial phase of bone repair. *Acta Cir Bras*. 2019 Feb 28; 34(2): 1-11. DOI: 10.1590/s0102-8650201900203.
48. Por YC, Barceló CR, Salyer KE, Genecov DG, Troxel K, Gendler E, Elsalanty ME, Opperman LA. Bone generation in the reconstruction of a critical size calvarial defect in an experimental model. *Ann Acad Med Singapore*. 2007 Nov; 36(11): 911-9. PMID: 18071597.
49. Tumedei M, Savadori P, Del Fabbro M. Synthetic Blocks for Bone Regeneration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 28; 20(17): 1-20. DOI: 10.3390/ijms20174221.
50. Ribeiro IIA, Almeida RS, Rocha DN, Prado da Silva MH, Miguel FB, Rosa FP. Biocerâmicas e polímero para a regeneração de defeitos ósseos críticos. *Rev Ciênc Méd Biol*. 2014; 13: 298-302. DOI: 10.9771/cmbio.v13i3.12934.
51. Almeida RS, Ribeiro IIA, Prado da Silva MH, Rocha DN, Miguel FB, Rosa FP. Avaliação da fase inicial do reparo ósseo após implantação de biomateriais. *Rev Ciênc Méd Biol*. 2014; 13(3): 331-336. DOI: 10.9771/cmbio.v13i3.12940.
- 52 Almeida RS, Prado da Silva MH, Navarro da Rocha D, Ribeiro IIA, Barbosa Junior A de A, Miguel FB, Rosa FP. Regeneração de defeito ósseo crítico após implantação de fosfato de cálcio bifásico (β -fosfato tricálcico/pirofosfato de cálcio) e vidro bioativo fosfatado. *Cerâmica*. 2019. [In press]
53. Martinez-Zelaya VR, Zarranz L, Herrera EZ, Alves AT, Uzeda MJ, Mavropoulos E, Rossi AL, Mello A, Granjeiro JM, Calasans-Maia MD, Rossi AM. In vitro and in vivo evaluations of nanocrystalline Zn-doped carbonated hydroxyapatite/alginate microspheres: zinc and calcium bioavailability and bone regeneration. *Int J Nanomedicine*. 2019 May 10; 14: 3471-3490. DOI: 10.2147/IJN.S197157.

ANEXO

ANEXO



Universidade Federal da Bahia
 Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Análise do potencial osteogênico de arcabouços à base de Wollastonita e Fosfato de Tricálcio carreados com Vancomicina”, registrada com o nº 129/2017, proposto pela pesquisadora Fabiana Paim Rosa, Departamento de Biointeração do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO Instituto de Ciências da saúde (CEUA-ICS), em reunião de 15/12/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02 anos
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / <u>Rattus norvegicus</u> / Linhagem Wistar albinus
Número de animais	140
Peso/Idade	Adulto / 350g
Sexo	Masculino
Origem	Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana


 Profª Dra. Luciana Lyra Casals-e-Silva

Coordenadora da CEUA-ICS

Profª. Luciana Lyra Casals e Silva
 Coordenadora da CEUA-ICS
 Instituto de Ciências da Saúde - UFBA



Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon, s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>