

# UFBA

Universidade Federal da Bahia  
Instituto de Ciências da Saúde

Eliana dos Santos Câmara Pereira

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



## ANÁLISE TECIDUAL ÓSSEA APÓS APLICAÇÃO DE ONDAS VIBRATÓRIAS E ASSOCIAÇÕES

Salvador  
2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas PPGPIOS**

**ANÁLISE TECIDUAL ÓSSEA APÓS APLICAÇÃO  
DE ONDAS VIBRATÓRIAS  
E ASSOCIAÇÕES**

Salvador

2013

**ELIANA DOS SANTOS CÂMARA PEREIRA**

**ANÁLISE TECIDUAL ÓSSEA APÓS APLICAÇÃO  
DE ONDAS VIBRATÓRIAS  
E ASSOCIAÇÕES**

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

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa  
Coorientador: Prof. Dr. Aryon Barbosa Júnior

Salvador

2013

Ficha catalográfica elaborada por Maria de Fátima Cleômenis Botelho,  
Bibliotecária – CRB-5/908

---

P436a Pereira, Eliana dos Santos Câmara  
Análise tecidual óssea após aplicação de ondas vibratórias e associações /Eliana dos Santos Câmara Pereira. -- Salvador, 2013.

124f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa.

Co-orientador: Prof. Dr. Aryon Barbosa Júnior.

1. Osteogênese. 2. Terapia em ossos de animais. I. Rosa, Fabiana Paim. II. Barbosa Júnior, Aryon III. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 591.169:637.65

---



## TERMO DE APROVAÇÃO

ELIANA DOS SANTOS CÂMARA PEREIRA

### ANÁLISE TECIDUAL ÓSSEA APÓS APLICAÇÃO DE ONDAS VIBRATÓRIAS E ASSOCIAÇÕES

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 17 de dezembro de 2013.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa – Orientadora

---

Doutora em Periodontia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Januário Mourão Lima

---

Doutor em Ciências Morfológicas (UFRJ)

Prof. Dr. Gildasio de Cerqueira Daltro

---

Doutor em Cirurgia Livre Docência pela Faculdade de Medicina da Bahia - Universidade Federal da Bahia (FAMEB-UFBA)

Prof. Dr. Fúlvio Borges Miguel

---

Doutor em Patologia Humana pela Universidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Teresinha Costa de Santana

---

Doutora em Periodontia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

**A Deus, pela essência da VIDA.**

**A meu esposo, Adilton Luiz Pio Pereira, e a meu filho, Nicolás Câmara Pio,  
pelo amor incondicional.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

À Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa e ao Prof. Dr. Aryon Barbosa Júnior, pela preciosa orientação, pelo estímulo, pela valiosa ajuda e paciência.

Ao Dr. Alexandre Malta Rossi e à Dra. Sílvia Santos, do CBPF, pelo preparo do biomaterial e pelo auxílio prático – fruto de valiosas experiências profissionais.

Ao Sr. Carlos Calazans, gerente distrital do Laboratório Servier, pela possibilidade de ceder as amostras do fármaco Protos®.

Ao Prof. Hélio Mostarda (UFBA) e à Profa. Iraci Gomes (UEFS), pela presteza em orientar sobre as condições do CEUA. À Profa. Maili Campos, pelo auxílio em bioestatística.

A todos do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da UFBA, Prof. José Antônio Menezes, Gustavo e Sérgio, por todo o auxílio e pela dedicação no preparo das amostras.

Aos colegas do LBTB, Ana Emília, Lilian, Isabela, Ana Clara, Marion, Fúlvio, Renata e Iorrana, e aos alunos de iniciação científica, Ana Flávia, Isis, Milena, Evelin e Rafael. Eles experimentaram a expectativa de cada obtenção de resultados. À a equipe de técnicos Júnior, Elizângela e Cristina, pela presteza em atender.

Aos Professores do PPGPIOS, pelas valiosas contribuições. Aos membros da secretaria do PPGPIOS, Sr. Marcelo, Sr. Bruno e Sra. Célia, pelo atendimento eficiente e profícuo.

À equipe do departamento de Biomorfologia, especialmente, o Prof. Dr. Abraão Fontes Baptista, por ter sempre uma ideia brilhante e uma palavra de ânimo. Ao Sr. Paulo e ao Sr. Jailson, pelo exemplo de dedicação.

À Profa. Dra. Laise Monteiro Campos, mais do que amiga de todas as horas – irmã –, vivenciando diariamente fracassos, vitórias e tristezas, mas infinitas alegrias.

A meus familiares, por todo afeto, apoio e oração.

A Adilton Luiz Pio Pereira, esposo e amigo, pelos difíceis momentos de renúncia à sua companhia.

A meu filho Nicolás Câmara Pio, por seu apoio em cada etapa, incentivando-me a transpor os obstáculos, a superar desafios e a concretizar meus ideais.

Compreendo e reconheço que jamais estive sozinha nesta jornada. Pessoas muito preciosas, mencionadas ou não, investiram, de alguma forma, neste ideal, às quais ofereço meu gesto de gratidão.

**“Sobreviver, busca-se no deserto.”**

**Eliana dos Santos Câmara Pereira**

PEREIRA, Eliana dos Santos Câmara. *Análise tecidual óssea após aplicação de ondas vibratórias e associações*. 2013. 124f. il. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO** – O tecido ósseo pode sofrer lesões por traumas, distúrbios metabólicos, inflamatórios, tumores e muitos outros. Após uma lesão óssea, o recrutamento de fatores morfogenéticos, migração celular, fluxo sanguíneo adequado e síntese de colágeno são essenciais aos reparos do defeito ósseo. As ondas vibratórias constituem um recente, recurso sistêmico coadjuvante na prevenção da diminuição de densidade mineral óssea, muito comum em indivíduos vitimados por traumas ortopédicos. Fármacos como o ranelato de estrôncio e outros são comercializados e utilizados em humanos como terapêutica profilática e de controle em situações de osteoporose. Este foi utilizado como mais uma estratégia terapêutica sistêmica, modulando o processo de reparo de defeitos ósseos em condições e dimensões críticas. Alguns recursos podem ser indicados e usados para auxiliar o processo de reconstituição tecidual, sendo os substitutos biológicos (biomateriais, como as microesferas de hidroxiapatita) utilizados com a finalidade e com algumas vantagens de mimetizar as respostas no local do osso lesionado. Eles aceleram a atividade orgânica no microambiente comprometido de defeitos críticos, nos quais são observadas as limitações ao reparo espontâneo, permitindo a diminuição do tempo de imobilidade, bem como a alteração da função locomotora. Essas estratégias terapêuticas (uso de ondas vibratórias, ranelato de estrôncio e hidroxiapatita), pelos seus efeitos isolados, induzem a osteogênese. **OBJETIVO** – O objetivo deste estudo experimental de investigação foi avaliar o potencial osteogênico em defeito crítico de calvárias de ratos submetidos à combinação terapêutica da aplicação sistêmica de ondas vibratórias obtidas através da plataforma vibratória, do ranelato de estrôncio e o implante de hidroxiapatita. **METODOLOGIA** – *Rattus Norvegicus albinos*, machos, adultos, com peso entre 350 e 450g, foram distribuídos aleatoriamente em sete grupos. **RESULTADOS** e **DISCUSSÃO** – Os potenciais efeitos do uso associado de ondas vibratórias, ranelato de estrôncio e hidroxiapatita, no reparo ósseo de defeito crítico eram desconhecidos e os resultados descritos nesta pesquisa são promissores, considerando a terapêutica sistêmica e o sítio da lesão. **CONCLUSÃO** – Tais resultados poderão ser reproduzidos com segurança. A reprodução de novos resultados experimentais satisfatórios contemplará a criação de inovações biotecnológicas para a assistência clínica humana.

**Palavras-chave:** Osteogênese. Regeneração óssea. Cinesioterapia. Ranelato de estrôncio. Hidroxiapatita.

PEREIRA, Eliana dos Santos Câmara. *Bone tissue analysis after application of vibrating waves and associations*. 2013. 125f. ill. Thesis (Ph.D.) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2013.

### ABSTRACT

**INTRODUCTION** – Bone tissue can be injured by trauma, metabolic and inflammatory disorders, tumors and many others. After a bone lesion, the recruitment of morphogenetic factors, cell migration, adequate blood flow, collagen synthesis are essential to the repair of bone defects. Vibratory waves are a recent supporting systemic action in preventing the decrease of bone mineral density very common in individuals victimized by orthopedic trauma. Drugs such as strontium ranelate and others are marketed and used as prophylactic therapy and control in situations of human osteoporosis. This was used more as a systemic therapeutic strategy by modulating the process of bone defect repair under critical conditions and dimensions. Some resources can be specified and used to assist the process of tissue reconstruction, and biological substitutes (biomaterials like hydroxyapatite microspheres) used for the purpose and with some advantages to mimic the responses in place of the injured bone. This accelerates the organic activity in the microenvironment compromised by critical defects, in which the limitations are observed to spontaneous repair, allowing the reduction of immobility time, as well as impaired locomotion function. These therapeutic strategies (use of vibratory waves, strontium ranelate and hydroxyapatite), due to their separate effects induce osteogenesis. **OBJECTIVE** – The purpose of this experimental research study was to evaluate the osteogenic potential in critical calvarial defect in rats, undergoing a combination therapy of systemic application of vibratory waves obtained by vibrating platform, of strontium ranelate and implantation of hydroxyapatite. **METHODOLOGY** – Albino *Rattus Norvegicus*, male, adults, weighing between 350 and 450g were randomly divided into seven groups. **RESULTS and DISCUSSION** – Potential effects of associated use of vibratory waves, strontium ranelate and hydroxyapatite in bone repair of critical defect were unknown, and the results described in this study are promising, considering the systemic therapy and the lesion site. **CONCLUSION** – Such results can be safely reproduced. A satisfactory reproduction of new experimental results will include the creation of biotechnological innovations to human clinical care.

**Keywords:** Osteogenesis; Bone Regeneration; Kinesiotherapy; Strontium Ranelate; Hydroxyapatite.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	–	Aparelho Juvent 1000 Dynamic Motion Therapy®	27
<b>Figura 2</b>	–	A estrutura da hidroxiapatita	30
<b>Figura 3</b>	–	Mecanismo ação: ranelato de estrôncio.	34
<b>Figura 4</b>	–	Reação da formação de microesferas de HA	38
<b>Figura 5</b>	–	Modelo esquemático de síntese de HAAI <sub>g</sub>	38
<b>Figura 6</b>	–	Variações topográficas dos biomateriais: morfologia e textura do biomaterial. (MEV). A e B – Superfície do biomaterial: grânulos individualizados (demarcados em vermelho) e grandes aglomerados granulares (em amarelo).	41
<b>Figura 7</b>	–	Plataforma vibratória com tela vasada, adaptação.	43
<b>Figura 8</b>	–	Fármaco comercial: sachê e grânulos.	43
<b>Figura 9</b>	–	Etapa cirúrgica: técnica anestésica.	47
<b>Figura 10</b>	–	Etapa cirúrgica: sequência cirúrgica e implantação do biomaterial.	49
<b>Figura 11</b>	–	Animal experimental na plataforma em grupos, de acordo o ponto biológico.	50
<b>Figura 12</b>	–	Aplicação do protocolo de aplicação de ondas vibratórias	51
<b>Figura 13</b>	–	Coleta de amostras	54
<b>Figura 14</b>	–	Aparelhos de espectrometria	57
<b>Figura 15</b>	–	GEDV 15 dias. A – centro do defeito: TCF ao longo do defeito e veia central (VS). B – Matriz osteoide neoformada (MON), espessura quando localizada próxima à borda óssea, osteócitos no osso remanescente e vasos sanguíneos (VS). Coloração: H&E.	62
<b>Figura 16</b>	–	GEDV 45 dias. A – Centro do defeito: via central (VC) matriz osteoide e ocupação linear de tecido conjuntivo fibroso (TCF). B – borda óssea (BO), matriz osteoide neoformada (MON) restrita à borda, tecido conjuntivo (TC). Coloração: H&E.	63
<b>Figura 17</b>	–	GEOV 15 dias. A – Centro do defeito: veia central (VC); células fusiformes (CF). Coloração: H&E. B – tecido conjuntivo: vasos sanguíneos (VS), células inflamatórias. Coloração: Tricrômico Masson Goldner (TMG).	65
<b>Figura 18</b>	–	GEOV 15 dias. A e B – Borda óssea (BO) e matriz osteoide	66



- neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea: tecido conjuntivo (TC) com presença de vaso sanguíneo (VS); medula óssea (MO) no osso remanescente. Colorações: H&E e PIFG respectivamente.
- Figura 19** – GEOV 45 dias. A e B – Centro do defeito: veia central (VC) com presença de sangue na luz; matriz osteoide neoformada (MON); fibroblastos e tecido conjuntivo (TC). Colorações: H&E e PIFG, respectivamente. 67
- Figura 20** – GEOV 45 dias. A e B – Borda óssea (BO): matriz osteoide neoformada (MON) em toda extensão linear do defeito com maior espessura proximal a BO; osteócito (OC) e lamelas concêntricas no osso remanescente. Colorações: PIFG e H&E, respectivamente. 68
- Figura 21** – GEOV 120dias. A, B e C – Borda óssea (BO): matriz osteoide neoformada (MON) em toda extensão linear do defeito com maior espessura proximal a BO em direção centrípeta. Manutenção de VS com sangue na luz. Tecido conjuntivo fibroso em permeio a matriz osteoide neoformada (MON). Colorações: H&E, PIFG e TMG, respectivamente. 69
- Figura 22** – GEOV 120dias. A, B e C – Centro do defeito: matriz osteoide neoformada (MON); VC com sangue na luz; tecido conjuntivo fibroso em permeio à matriz osteoide neoformada (MON); TC adjacente à dura-máter. Colorações: H&E, PIFG e TMG, respectivamente. 70
- Figura 23** – GERE 15 dias, A e B – Borda óssea (BO): matriz osteoide neoformada (MON) restrita a BO; osteócito no osso remanescente. Colorações: H&E, TMG, respectivamente. 72
- Figura 24** – GERE 15 dias. A e B – Centro do defeito: veia central (VC); células inflamatórias e tecido conjuntivo desorganizado. Colorações: H&E, TMG, respectivamente. 73
- Figura 25** – GERE 45 dias. A e B – Borda óssea (BO); matriz osteoide neoformada (MON) restrita a BO; TCF de permeio a MON; osteócito no osso remanescente; tecido conjuntivo 74

	desorganizado. Colorações: H&E, TMG respectivamente.	
<b>Figura 26</b> –	GERE 45 dias. A e B – Centro do defeito: veia central (VC); tecido conjuntivo desorganizado; células inflamatórias. Colorações: H&E, TMG, respectivamente.	75
<b>Figura 27</b> –	GERE 120 dias. A e B – Borda óssea (BO): matriz osteoide neoformada (MON) restrita a BO e espessura diminuída; osteócito. Colorações: H&E, TMG e PIFG, respectivamente.	76
<b>Figura 28</b> –	GERE 120 dias. A, B e C – Centro do defeito (BO): veia central (VC) com sangue na luz no centro do defeito; células inflamatórias e tecido conjuntivo desorganizado. Colorações: H&E, TMG, PIFG, respectivamente.	77
<b>Figura 29</b> –	GEOVRE 15 dias. A e B – Centro do defeito e borda óssea (BO): veia central (VC) com sangue na luz no centro do defeito; matriz osteoide neoformada (MON) restrita a BO; TCF de permeio a MON; osteócito no osso remanescente; células inflamatórias e tecido conjuntivo desorganizado. Coloração: H&E.	79
<b>Figura 30</b> –	GEOVRE 45 dias. A e B – Centro do defeito e borda óssea (BO): matriz osteoide neoformada (MON) ocupando toda a extensão linear do defeito em direção centrípeta, espessura diminuída; TCF de permeio a MON; TC adjacente ao retalho; septo fibroso proximal a BO; osteócito no osso remanescente e no tecido ósseo mineralizado; poucas células inflamatórias e tecido conjuntivo desorganizado. Coloração: H&E	80
<b>Figura 31</b> –	GEOVRE 45 dias. A, B e C – Borda óssea (BO): matriz osteoide neoformada (MON) ocupando toda a extensão linear do defeito em direção centrípeta, espessura diminuída; TC adjacente ao retalho; osteócito no osso remanescente. Colorações: H&E, TMG e PIFG, respectivamente.	81
<b>Figura 32</b> –	GEOVRE 45 dias. A, B e C – Centro do defeito: matriz osteoide neoformada (MON) em toda a extensão linear do defeito, espessura muito diminuída; TCF adjacente ao retalho. Colorações: H&E, TMG e PIFG, respectivamente.	82
<b>Figura 33</b> –	GEOVHA 15 dias. A e B – Borda óssea (BO): matriz osteoide	85

- neoformada (MON) em toda a extensão do defeito, maior espessura do reparo, proximal a BO; HAALg preenchendo o defeito ósseo. Coloração: HE
- Figura 34** – GEOVHA 15 dias. A e B – Borda óssea: presença de matriz osteoide neoformada (MON), proximal às bordas ósseas (BO); célula gigante (CG) e infiltrado inflamatório difuso; tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio ao biomaterial, a HAALg (HAALg); defeito ósseo ocupado por HAALg. Coloração: T.M.G. 86
- Figura 35** – GEOVHA 15 dias. A, B e C – Borda óssea (BO): matriz osteoide neoformada (MON) reparativa, proximal a BO; tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio à HAALg fragmentada; vasos sanguíneos (VS); TC adjacente ao retalho. Coloração: PIFG. 87
- Figura 36** – GEOVHA 15 dias. A e B – Centro do defeito: matriz osteoide neoformada (MON), espessura compatível em profundidade e extensão ao osso remanescente; veia central (VC); tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio à HAALg fragmentada; células gigantes (CG); vasos sanguíneos (VS). Coloração: HE. 88
- Figura 37** – GEOVHA 15 dias. A e B – Centro do defeito: matriz osteoide neoformada (MON), espessura similar ao remanescente; tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio à HAALg fragmentada; células gigantes (CG); células inflamatórias; vasos sanguíneos (VS). Coloração: TMG 89
- Figura 38** – GEOVHA 15 dias. A e B – Centro do defeito: veia central (VC); matriz osteoide neoformada (MON) reparativa; defeito preenchido por HAALg fragmentada; TCF circundando o biomaterial. Coloração: PIFG. 90
- Figura 39** – GEOVHA 45 dias. A, B e C – Borda óssea (BO): presença de matriz osteoide neoformada (MON) reacional, proximal a BO e em toda a extensão do defeito em direção centrípeta; TCF de permeio a HAALg; HAALg preenche todo o defeito ósseo; osteócitos (OC) no tecido ósseo mineralizado remanescente. Colorações: HE, PIFG e TMG. respectivamente. 91
- Figura 40** – GEOVHA 45 dias. A, B e C – Centro do defeito: veia central 92

(VC); presença de matriz osteoide (MON) reparativa em toda a extensão do defeito; células mesenquimais (macrófagos de aspecto espumoso); tecido conjuntivo fibroso adjacente a HAAIlg fragmentada; septos fibrosos (SF). Colorações: H&E, TMG e PIFG, respectivamente.

- Figura 41** – GEOVHA 45 dias. A, B e C – Centro: presença de matriz osteoide reparativa (MON) em toda a extensão do defeito; TCF de permeio ao biomaterial; HAAHlg osteointegrada à matriz neoformada; zonas com osteócitos (OC) no osso remanescente; TC proximal à área do retalho. Colorações: H&E, TMG e PIG, respectivamente. 93
- Figura 42** – GEVHA 120 dias. A, B e C – Matriz osteoide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO) e ocupando toda a extensão e profundidade do defeito: tecido conjuntivo fibroso de permeio à HAAIlg. Colorações H&E, TMG e PIFG, respectivamente. 94
- Figura 43** – GEHARE 15 dias. A e B – Borda e centro do defeito: veia central (VS). matriz osteoide neoformada (MON) em direção centrípeta; células inflamatórias; tecido conjuntivo fibroso de permeio a HAAIlg fragmentada; septos fibrosos dentro da microesfera de HAAIlg. Coloração: H&E 97
- Figura 44** – GEHARE 45 dias. A e B – Borda e centro do defeito: matriz osteoide neoformada (MON) em direção centrípeta. células inflamatórias; tecido conjuntivo fibroso de permeio a HAAIlg fragmentada; septos fibrosos dentro da microesfera de HAAIlg; macrófagos espumosos e células fusiformes. Coloração: H&E 98
- Figura 45** – GEHARE 120 dias. A e B – Borda e centro do defeito: matriz osteoide neoformada (MON) em direção centrípeta; células inflamatórias; tecido conjuntivo fibroso de permeio à HAAIlg fragmentada; osteócitos no tecido ósseo remanescente; TC proximal ao retalho. Colorações: H&E e TMG, respectivamente. 99

## LISTA DE GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

<b>Gráfico 1</b>	– DRX do biomaterial, (HAAIlg)	41
<b>Gráfico 2</b>	– Grupos funcionais do biomaterial HAAIlg	41
<b>Gráfico 3</b>	– Tamanho das granulações da HAAIlg, em $\mu\text{m}^3$ plotados no gráfico. P <0,0001; teste-t de Student não pareado; n = 10 elementos em cada condição experimental.	43
<b>Gráfico 4</b>	– Análise das concentrações de cálcio e estrôncio (Sr) no plasma	102
<b>Quadro 1</b>	– Colorações para microanálise	60
<b>Tabela 1</b>	– Composição dos grupos e número amostral de acordo com o ponto biológico	47
<b>Tabela 2</b>	– Composição das amostras: tratadas ou não com ranelato de estrôncio	53
<b>Tabela 3</b>	– Composição nutricional da ração Labina® Purina – Quantidade por Kg de ração destinada a alimentar os ratos	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BMPs *Bone morphogenetic proteins* – Proteínas ósseas morfogenéticas
- CBPF – Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
- CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
- CG – Célula gigante
- DRX – Difração de raios-X
- EDTA – Ácido etileodiaminotetracético
- HAAIlg – Hidroxiapatita de cálcio e alginato
- HE – Hematoxilina e eosina
- µg – Micrograma
- µm – Micrômetro
- GSDPO – Grupo sem defeito padrão ouro
- GEDV – Grupo experimental defeito vazio
- GEOV – Grupo experimental ondas vibratórias
- GERE – Grupo experimental ranelato de estrôncio
- GEOVRE – Grupo experimental ondas vibratórias e ranelato de estrôncio
- GEOVHA – Grupo experimental ondas vibratórias e hidroxiapatita alginato
- GEHARE – Grupo experimental hidroxiapatita alginato e ranelato de estrôncio
- GCCPC – Grupo controle padrão ouro concentração plasmática de cálcio
- GCCPE – Grupo controle padrão ouro concentração plasmática de estrôncio
- GCPC – GEOVRE - Grupo concentração plasmática de cálcio do GEOVRE
- GCPE – GEHARE - Grupo concentração plasmática de cálcio do GEHARE
- LBTB – Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MO – Medula óssea
- MON – Matriz osteoide neoformada
- OC – Osteócito
- POI – Pós-operatório imediato
- PIFG – Picrossírius *red*
- RANK – *Receptor activator of nuclear factor kappa-β* - receptor do ativador do fator nuclear kappa-β

RANKL - *Receptor activator of nuclear factor kappa- $\beta$  ligand* – ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa- $\beta$  -

SF – Septos fibrosos

TCF – Tecido conjuntivo fibroso

TMG – Tricrômico de Masson Goldner

VS – Vaso sanguíneo

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	22
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	25
3	<b>OBJETIVOS</b>	35
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	37
4.1	BIOMATERIAL	38
4.2	PLATAFORMA VIBRATÓRIA	42
4.3	FÁRMACO RANELATO DE ESTRÔNCIO	43
4.4	ANIMAIS	44
4.5	COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS E NÚMERO AMOSTRAL	44
4.6	ETAPA CIRÚRGICA	46
4.7	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	53
4.7.1	Análise laboratorial dos elementos estrôncio e cálcio	54
4.7.2	Obtenção das amostras de calvárias	58
4.8	ETAPA DE PROCESSAMENTO LABORATORIAL	58
5	<b>RESULTADOS</b>	60
5.1	<b>MICROANÁLISE DESCRITIVA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA</b>	61
5.1.1	Grupo sem defeito padrão ouro (GSDPO)	61
5.1.2	Grupo experimental defeito vazio (GEDV)	61
5.1.3	Grupo experimental ondas vibratórias (GEOV) (Figuras 17-22)	63
5.1.4	Grupo experimental ranelato de estrôncio (GERE) (Figuras 23-28)	71
5.1.5	Grupo experimental ondas vibratórias e ranelato de estrôncio (GEOVRE) (Figuras 29-32)	78
5.1.6	Grupo experimental ondas vibratórias e hidroxiapatita alginato (GEOVHA) (Figuras 33-42)	83
5.1.7	Grupo experimental hidroxiapatita alginato e ranelato de estrôncio (GEHARE) (Figuras 43-45)	95
5.2	<b>ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DOS ELEMENTOS CÁLCIO E ESTRÔNCIO</b>	100
5.2.1	Análise das concentrações de cálcio e estrôncio (Sr) no plasma do GEHARE e GEOVRE	100



6	<b>DISCUSSÃO</b>	104
7	<b>CONCLUSÃO</b>	112
	<b>REFERÊNCIAS</b>	114
	<b>ANEXOS</b>	122
	<b>ANEXO A – OFÍCIO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b>	123
	<b>ANEXO B – PARECER FINAL DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b>	124

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

O osso desenvolve-se a partir da migração de células mesenquimais e mantém potencial para a formação óssea durante a vida (GEOFFROY et al., 2010). Possui remodelação adequada em condições morfofuncionais ideais, mas, em lesão óssea crítica, o reparo ósseo espontâneo é restrito e resulta em dano sensorial, motor e estético, com importante déficit da qualidade de vida e da capacidade laborativa (INTINI et al., 2008). O tecido ósseo pode ser acometido por traumas, tumores, disfunções hormonais, senescência e modificações genéticas, dentre outros. Em tais condições, o uso de exercícios, fármacos e outros fatores são importantes para a prevenção da perda mineral óssea e o reparo tecidual ósseo.

O mecanismo reparativo do osso recruta condições essenciais no sítio da lesão, como a neoformação de vasos, com a consequente difusão tecidual de oxigênio, a necessidade de um arcabouço biocompatível, a manutenção das forças de tensão, a estabilidade mecânica, a mecanotransdução, dentre outras (TORVINEN et al., 2002). Os recursos terapêuticos utilizados podem ter ação sistêmica, como, por exemplo, a ação dos fármacos e dos exercícios, ou a atuação local, como a dos substitutos biológicos implantados no sítio da lesão. Tais recursos são imprescindíveis para o processo regenerativo do tecido ósseo criticamente acometido, pois restringem a formação de tecido conjuntivo fibroso e a perda funcional resultante da imobilidade. Os exercícios são importantes para a recuperação do trauma ósseo pela possibilidade de se conservar um fluxo sanguíneo adequado e de se manter as forças de tensões biomecânicas necessárias ao alinhamento das fibras de colágeno no segmento corporal acometido e em processo de reparo ósseo. O movimento vibratório é um efeito da cinesioterapia obtido por meio da aplicação de ondas vibratórias administradas através da plataforma vibratória, Juvent1000<sup>®</sup>. É conhecido que o efeito do movimento vibratório previne a diminuição da densidade mineral óssea, do trofismo muscular, dentre outros sistemas e aparelhos em humanos (FRANKEL; McLEOD, 2005). Mas é desconhecida a eficácia dessa terapêutica no reparo do defeito ósseo crítico.

O fármaco ranelato de estrôncio age sistemicamente, diminuindo a reabsorção e mantendo ou aumentando a formação óssea. O mecanismo de ação e os efeitos dessa droga na prevenção e no controle da osteoporose são estudados em testes *in vitro* e *in vivo* (LI et al., 2010; LINAS et al., 2006). Mas seu potencial efeito como uma das possibilidades terapêuticas para diminuir a dificuldade regenerativa do defeito ósseo crítico necessita de mais estudos.

A regeneração óssea em defeitos críticos que requerem o implante de substitutos biológicos constitui um desafio à bioengenharia tecidual (BEST, 2008; BOROJEVIC, 2008; CARVALHO, 2010). Alguns desses substitutos são os biomateriais já utilizados comercialmente, que possuem várias limitações, como o alto custo e a possibilidade de incompatibilidade biológica, dentre outras. Os biocompósitos de cerâmicas de hidroxiapatita de cálcio e alginato (HAAIlg), sob a forma de nano esferas, são os mais industrialmente desenvolvidos e utilizados como os principais arcabouços biológicos implantados nos locais dos defeitos críticos para o reparo ósseo.

É importante ressaltar que a ampla dificuldade de reparo espontâneo em defeito ósseo crítico constitui um desafio em ciências biomédicas, com o conseqüente ônus econômico e social. A ação da cinesioterapia, obtida através das ondas vibratórias, à resposta óssea em estudo da análise tecidual do reparo ósseo em defeito crítico não era conhecida em animais de experimentação e na clínica humana. Essa foi uma estratégia implantada no presente estudo experimental. Tal estratégia terapêutica foi ampliada com a associação de cinesioterapia, uso de fármaco sistemicamente e o implante de biomaterial no local do defeito crítico ósseo.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O tecido ósseo (*osteon* = peça rígida) compõe o esqueleto, cujo aparato e resiliência possibilitam as funções de reserva de minerais, hematopoiese, proteção de órgãos e suporte, além de constituir a base biomecânica para a locomoção.

Origina-se a partir da migração de células com potencial osteogênico, em uma matriz celular orgânica (osteoblastos, osteócitos, osteoclastos) e de uma matriz acelular (colágeno tipo I, proteoglicanas, glicoproteínas adesivas entre outros), caracterizando a rica matriz orgânica. A matriz inorgânica é formada pelos elementos fosfato de cálcio (hidroxiapatita de cálcio) e vários íons como Mg<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, além de água (DELECLUSE et al., 2011; HING, 2004). As células ósseas secretam proteínas-sinal (membros da subfamília BMP de proteínas TGFβ), que são capturadas na matriz, sendo esse comportamento de adaptação (deposição e erosão da matriz), controlado, de alguma maneira, pelo estresse mecânico local (AUGAT, 2006). Após uma lesão óssea crítica, no reparo, há ruptura vascular, ativação dos elementos e de vias de coagulação, o que resulta na formação de hematoma (CARVALHO, 2010). Os canais vasculares situados no osso suprem as células osteogênicas, constituem um complexo metabólico amplamente estudado e regulam o crescimento e a remodelação óssea (LEGEROS et al., 2002). Assim, o produto da concentração entre hidroxiapatita de cálcio - [Ca<sup>2+</sup>] X [PO<sup>3-</sup><sub>4</sub>] e a dinâmica de precipitação entre ela e as modulações hormonais são essenciais ao mecanismo de calcificação, mas não os únicos elementos envolvidos nesse fenômeno (MADHAVAN; STEWART; McLEOD, 2006; MAÏMOUN, et al., 2010) e denotam a ampla possibilidade de reparo do tecido ósseo.

Entretanto, é conhecido que, entre outros fatores, a neoformação e a expansão de vasos sanguíneos ineficazes e insuficientes são limitantes à regeneração óssea, e tais condições ampliam as perspectivas para novas pesquisas, o que abre um novo campo de estudo.

É nesse cenário bastante desconhecido que as ondas vibratórias (Figura 1) constituem um recente recurso coadjuvante na prevenção da diminuição de densidade mineral óssea e de massa muscular, muito comum em indivíduos vitimados por traumas ortopédicos, adultos e idosos sedentários ou não (DELECLUSE et al., 2011; TORVINEN et al., 2002).

**Figura 1** - Aparelho Juvent 1000 *Dynamic Motion Therapy*®



Rato com defeito não crítico foi submetido por quatro minutos a ondas vibratórias (LEUNG, 2006; LING, 2006), e, em ratas ovariectomizadas (DELECLUSE et al., 2011), verificou-se que as ondas vibratórias são potencialmente eficazes na prevenção de perdas ósseas e musculares. O tecido ósseo, em condições ideais, possui grande capacidade de regeneração e, em reposta à lesão tecidual, apresenta desorganização e desarranjo das fibras, infiltrado plasmolinfocitário difuso, diminuída migração, proliferação, diferenciação e ativação de outras células inflamatórias, fibroblastos, dentre outras (MARCACCI, M. et al. 2007; MARSH, 2006) a possibilidade de ampla neoformação e expansão de vasos sanguíneos no conjuntivo (DELECLUSE; ROELANTS; VERSCHUEREN, 2003), os quais são imprescindíveis ao reparo ósseo. Nesse contexto, o uso de ondas vibratórias constitui uma possibilidade de realização dos exercícios físicos terapêuticos (cinesioterapia) sobre uma plataforma vibratória que gera movimentos oscilatórios em trajetória sinusoidal, provocando um estímulo mecânico que aumenta a carga gravitacional submetida ao aparelho locomotor. O estímulo se difunde para todo o corpo, sistemicamente, e se diferencia do estímulo vibratório aplicado localmente (GELI, 2008; GOODSHIP, 2006), sendo essa tecnologia desenvolvida pela NASA para prevenir osteoporose (modificação da densidade óssea) e perda funcional muscular (hipotrofia e fraqueza muscular) em astronautas em missões espaciais, sob os efeitos da ausência de forças gravitacionais. Os sensores que fornecem informações ao sistema somatossensorial podem ser divididos em: mecanorreceptores, que são os receptores de tato presentes na pele, e de pressão, existentes em tecidos profundos, cuja função é desencadeada por meio da tensão e deformação da pele; e proprioceptores, representados pelos fusos musculares, os órgãos tendinosos de Golgi e proprioceptores articulares, cujas aferências informam ao cérebro o grau de estiramento dos músculos esqueléticos, o posicionamento

ósseo e das articulações (ALLEGRETT et al., 2007; DELECLUSE; ROELANTS; VERSCHUEREN, 2003; FENGYUAN; JINGWEN, 2006).

Outros estudos investigaram os efeitos aplicados da força de vibração de 4 minutos na performance muscular e no equilíbrio corporal em 16 voluntários jovens e saudáveis. Como resultado, observou-se que uma única carga vibratória de 4 min promoveu um aumento significativo momentâneo na força isométrica da extensão dos membros inferiores, na altura de impulsão e no equilíbrio corporal (TORVINEN et al., (2002). Em pesquisas de Verschueren et al.(2003), avaliaram-se os efeitos musculoesqueléticos da aplicação de alta frequência através da vibração produzida pela plataforma vibratória em mulheres pós-menopausa. Nessas pesquisas, observou-se que ocorreu uma melhora na força isométrica dinâmica, embora o balanço postural durante o estado de equilíbrio, com ou sem visão, não se alterasse por causa do treino vibratório. Cury e Magalhães (2006) realizaram um estudo com objetivo de criar um teste de equilíbrio corporal, coordenação do aparato musculoesquelético em contexto funcional, para verificar sua adequação e aplicabilidade em um grupo de crianças brasileiras. A pesquisa foi realizada com 66 crianças, com desenvolvimento motor típico, idades cronológicas de 4, 6 e 8 anos, selecionadas em três escolas. O protocolo a que as crianças foram submetidas foi elaborado e constituído por oito provas, avaliadas por critérios quantitativos e qualitativos e distribuídas em dois circuitos. Observou-se diferença no desempenho entre crianças de 4 e 6 anos para algumas das provas avaliadas. Crianças de 6 e 8 anos, de um modo geral, não apresentaram diferença nas provas de equilíbrio propostas. Em outros estudos, Bosco et al. (1999), investigaram os efeitos das ondas vibratórias no comportamento mecânico do tecido ósseo e musculoesquelético humano. Nesse estudo, seis jogadores de voleibol foram recrutados e testados através do exercício terapêutico (cinesioterapia) de força dinâmica máxima das pernas em uma prensa, com pesos adicionais de 3; 5 e 7Kg. Depois de testados, um dos membros inferiores foi aleatoriamente escolhido para tratamento controle. Os resultados mostraram uma notável e estatisticamente relevante diferença entre a melhoria da velocidade média, força média e potência média. Depreenderam que a melhoria pode ter sido causada por fatores neuronais, já que os atletas estavam adaptados ao exercício feito com uma espécie de prensa e, por isso, o efeito da aprendizagem era mínimo. Delecluse et al. (2003) investigaram e compararam o efeito do treino através da cinesioterapia por 12 semanas e do treino de resistência na força do compartimento na musculatura extensora do joelho humano. As forças isométricas e dinâmicas dos músculos extensores do joelho aumentaram significativamente, tanto no grupo submetido à cinesioterapia como no grupo submetido ao treino de resistência, respectivamente, enquanto



que os grupos placebo e o grupo de controle não mostraram um aumento significativo. As ondas vibratórias obtidas através da plataforma vibratória têm o potencial de promover melhora da densidade mineral óssea e um ganho de força muscular, além de provocar contração muscular reflexa. Verschueren et al. (2003) descreveram que a cinesioterapia (obtida através da plataforma vibratória) é um método de treino do aparelho locomotor recentemente desenvolvido.

Durante a cinesioterapia, o participante coloca-se de pé em uma plataforma que gera uma vibração sinusoidal vertical, com uma frequência entre 35 e 40Hz. Esses estímulos mecânicos são transmitidos ao corpo sistemicamente, estimulando, por sua vez, os receptores sensoriais, mais provavelmente os fusos musculares. Essa ação conduz a uma ativação dos motoneurônios *alpha* e inicia contrações musculares comparáveis ao “reflexo vibratório tônico”, possibilitando o treinamento do aparelho locomotor e diminuindo o risco de complicações resultantes da síndrome da imobilidade, como fraturas e a piora dos baixos níveis de densidade óssea (ALLEGRETTI et al., 2007).

Em estudos experimentais ou clínicos, as ondas vibratórias são utilizadas como um recurso auxiliar na prevenção da diminuição de densidade mineral óssea e de massa muscular observadas em situações que há traumas ortopédicos e em condições de diferentes faixas etárias (GELI, 2008; TORVINEN et al., 2002). Em tibia e no músculo sóleo do rato, submetidos por quatro minutos a ondas vibratórias (FENGYUAN; JINGWEN, 2006), e em ratas ovariectomizadas (CHEUNG, 2006; DELECLUSE et al., 2011), verificou-se que as ondas vibratórias são potencialmente eficazes na prevenção de perdas ósseas e musculares.

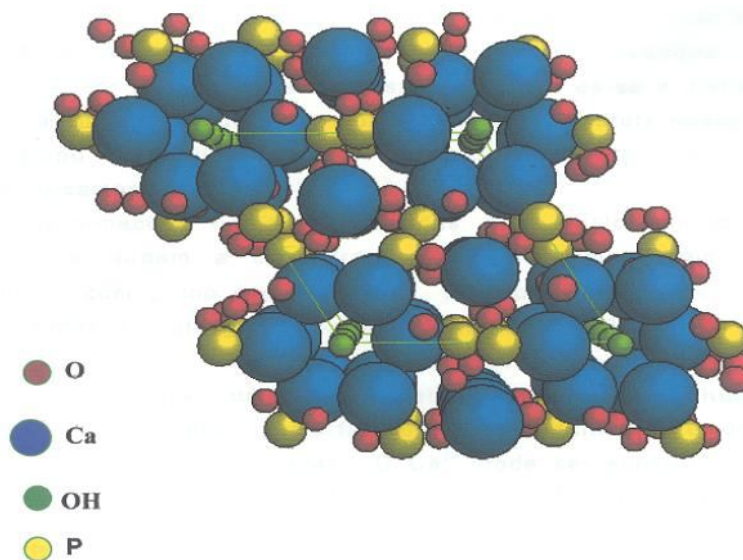
Como o reparo ósseo (defeito crítico e não crítico) e a regeneração muscular constituem um problema em ciências básicas e em saúde humana entre diferentes faixas etárias, é de fundamental importância obter novas estratégias terapêuticas, em modelos experimentais que aperfeiçoem ou suplantem tais lacunas. A associação entre o uso de biomateriais e a utilização de plataforma vibratória constitui um recurso passível de investigação experimental inédita, cujos resultados, se validados, poderão ser reproduzidos, com margem de confiabilidade, na clínica terapêutica em humanos.

É nesse contexto inovador e ainda bastante desconhecido que biomateriais têm sido utilizados como uma estratégia de reparo tecidual ósseo em defeitos de diferentes magnitudes: leves, moderados e severos, ou defeitos críticos e não críticos. Após uma lesão óssea, o recrutamento de fatores morfogenéticos, migração celular, fluxo sanguíneo adequado, síntese de colágeno, entre outros componentes, são essenciais a seu reparo.

Alguns recursos são utilizados para promover a reconstituição de tecidos, sendo os substitutos biológicos (biomateriais sintéticos cerâmicos – hidroxiapatita de cálcio e alginato) utilizados com essa finalidade, com algumas vantagens, como a de mimetizar as respostas no osso lesionado, bem como de acelerar a atividade orgânica no microambiente comprometido (MAVROPOULOS, 1999; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006), com bons resultados para o reparo ósseo (Figura 2). O compósito hidroxiapatita e alginato (HAAIlg), como substituto ósseo biológico em defeitos críticos em calvária de ratos, demonstrou adequada propriedade osteocondutora e resultados promissores na reparação óssea, em estudos prévios (BARRETO, 2006; PAULA, et al., 2009).

O implante de substitutos biológicos em estruturas do aparelho locomotor – osso, cartilagem, menisco, tendões e ligamentos (CARVALHO, 2010; INTINI, 2008; LEGEROS, 2002) – e a avaliação do comportamento biológico de biomateriais no reparo tecidual são procedimentos relevantes. Biomateriais como as matrizes tridimensionais colagênicas aniônicas, reticuladas ou não em glutaraldeído, são potencialmente eficazes na reparação óssea em defeitos críticos na calvária de rato (MIGUEL, 2008).

**Figura 2** – A estrutura da hidroxiapatita



**Fonte:** adaptado de Mavropoulos, 1999.

Ensaio clínico, com resultados promissores, sugerem avanços nas aplicações da bioengenharia tecidual em indivíduos vitimados por defeito ósseo (GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005). Outros pesquisadores descrevem que tais resultados baseiam-se no tratamento, com células-tronco osteoprogenitoras autólogas, em situações de

necrose avascular da cabeça do fêmur, resultantes de complicações de anemia falciforme (DALTRO et al., 2008). Essas terapêuticas constituem-se em inovações biotecnológicas de tratamento, sendo alternativas vinculadas à terapêutica celular, orgânica (BOROJEVIC, 2008). O uso de substitutos biológicos compostos por hidroxiapatita associada ou não à esponja de fibrina, em defeitos ósseos (CARVALHO, 2010), demonstrou nesse estudo, que os resultados foram satisfatórios quanto ao padrão de resposta ao reparo tecidual. A avaliação da reparação óssea de defeitos implantados (com hidroxiapatita e alginato) revelou uma melhora da resistência mecânica e da resiliência do novo tecido (próximo ao local do implante), sugerindo que tal compósito é capaz de mimetizar as respostas do microambiente (BARRIAS et al., 2005), sendo, ainda, compatível com o sistema biológico.

Os efeitos do alginato (adequando a estrutura das microesferas de HA), como compósitos ou agentes potencialmente osteogênicos, e a eficácia desses biocompósitos na reparação óssea de defeito crítico (como alternativa terapêutica inorgânica) ainda não estão bem documentados. Portanto, a associação do uso do compósito hidroxiapatita e alginato (em defeitos críticos), a aplicação de correntes vibratórias no POI e os potenciais efeitos no reparo ósseo não são conhecidos e são alvos de investigação. Os biomateriais têm sido utilizados como uma estratégia de reparo tecidual ósseo em defeitos de diferentes magnitudes: leves, moderados, severos ou defeitos críticos e não críticos. Após uma lesão óssea, o recrutamento de fatores morfogenéticos, a migração celular, o fluxo sanguíneo adequado, a síntese de colágeno, entre outros, são essenciais a seu reparo.

A Bioengenharia Tecidual é uma área de pesquisa multidisciplinar que se desenvolve a partir de novas técnicas e (ou) biomateriais para aplicações médicas (PAULA, 2008), especialmente na medicina regenerativa. Alguns recursos são utilizados para promover a reconstituição de tecidos, sendo os substitutos biológicos (biomateriais – compósitos de hidroxiapatita de cálcio e alginato) utilizados com essa finalidade, com algumas vantagens, como a de mimetizar as respostas no osso lesionado, bem como acelerar a atividade orgânica no microambiente comprometido (ROLIM, 2010). Ensaios clínicos, com resultados promissores da genômica, sugerem avanços das aplicações da bioengenharia tecidual em indivíduos vitimados por defeito ósseo, obtidos através do tratamento com células-tronco osteoprogenitoras autólogas e a consequente matriz osteóide neoformada (BOROJEVIC, 2008).

Nesse contexto, a osteointegração do biomaterial implantado depende não somente de suas características físico-químicas (porosidade, biocompatibilidade entre outras), bem como da capacidade regenerativa do sítio receptor, sendo que o defeito ósseo responde às forças de

tensão resultantes de energia cinética (movimento funcional) ou da cinesioterapia (exercício terapêutico). Fraturas, tumores ósseos, osteoporose, entre outras afecções, são, portanto, condições clínicas que causam ou pioram a imobilidade, podendo alterar a função locomotora (McLEOD, 2006) e influenciar o comportamento biológico. Pode, ainda, afetar os resultados esperados da utilização de substitutos orgânicos e suas repercussões no aparelho locomotor. Essas modalidades terapêuticas (uso de biomateriais ou ondas vibratórias), quando atuam isoladamente, têm como efeitos a indução da osteogênese e a formação de tecido ósseo mineralizado.

O osso é metabolicamente ativo e possui a capacidade de remodelação contínua durante a vida. A remodelação consiste na retirada de tecido ósseo mineralizado pelas células osteoclásticas. Essa ação é simultânea à formação e a deposição de matriz óssea pelos osteoblastos, a qual, depois, se torna mineralizada (HALBOUT, 2010). O tecido ósseo pode sofrer lesões decorrentes de exposições ambientais, erros genéticos e traumas, dentre outros. Esse tecido permite uma adequada capacidade regenerativa e, quando lesionado, em muitas situações ideais, é capaz de restaurar-se e restabelecer-se eficazmente. Recompõe sua morfologia de modo a garantir suas propriedades mecânicas, dentre outras. Mas esse potencial osteogênico regenerativo possui restrições e pode fracassar em certas condições não muito propícias (CONZ, GRANJEIRO; SOARES, 2005; COSTA et al., 2009; HOLZER et al., 2009; MARCACCI et al., 2007; RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2006;). Em um defeito ósseo, vários componentes essenciais orgânicos e inorgânicos são recrutados, a fim de manter um microambiente adequado para o reparo (CAMPOS, 2012). Entretanto, o defeito ósseo crítico, aquele cujo reparo não ocorre de forma espontânea em função de suas dimensões (ROSCHGER, 2008), constitui um desafio nas ciências biomédicas. Para tais situações, alguns recursos terapêuticos com efeito sistêmico ou local são utilizados na assistência clínica humana, mas com certas limitações. Estudiosos em bioengenharia de tecidos utilizam diferentes modelos experimentais, animal e terapêutico (CASALS et al., 2011), com vistas a obter inovações biotecnológicas mais satisfatórias, que possuam menor ônus e que, após os diversos testes, possibilitem o uso em humanos.

Em alguns estudos, observou-se que o modelo de defeito ósseo crítico possui grandes dimensões, tais como diâmetro de 8,5 mm (BARRETO, 2011), em calvárias de rato.

O rato é um modelo de animal experimental, dentre os demais, como micro *pigs*, cães e outros, sendo o mais utilizado na análise da resposta de terapêuticas empregadas para estudar o potencial osteogênico em defeito ósseo crítico em calvárias (CASALS et al., 2011).

Esse animal possui outra vantagem para uso experimental, pois permite mais fácil e rápida possibilidade de manipulação e controle em biotérios (ANDREOLLO, 2012).

O osso tipo díploe, existente na calvária, em comparação com outros ossos, é caracterizado pelo leito vascular limitado, fato que restringe o suprimento metabólico e o consequente recrutamento de diversos fatores morfogenéticos para esse local, dificultando o reparo. A calvária do rato geralmente é escolhida, em estudos experimentais, entre outros fatores, por apresentar as piores condições para o reparo ósseo (HONMA, 2008; BARRETO, 2011).

Defeitos do remodelamento ósseo podem causar anomalias do desenvolvimento e condições degenerativas, como a osteoporose, resultante da extrema erosão da matriz, o enfraquecimento e a fragilidade do osso, cuja consequência é a possibilidade de complicações das fraturas existentes e o risco de novas fraturas.

A depender da extensão do defeito (leve, moderado; crítico ou não crítico) ou da condição da fratura, o reparo ósseo se inicia de forma espontânea, imediatamente após a hemorragia, a destruição de matriz, a morte celular e a fagocitose (WALSH, 2006).

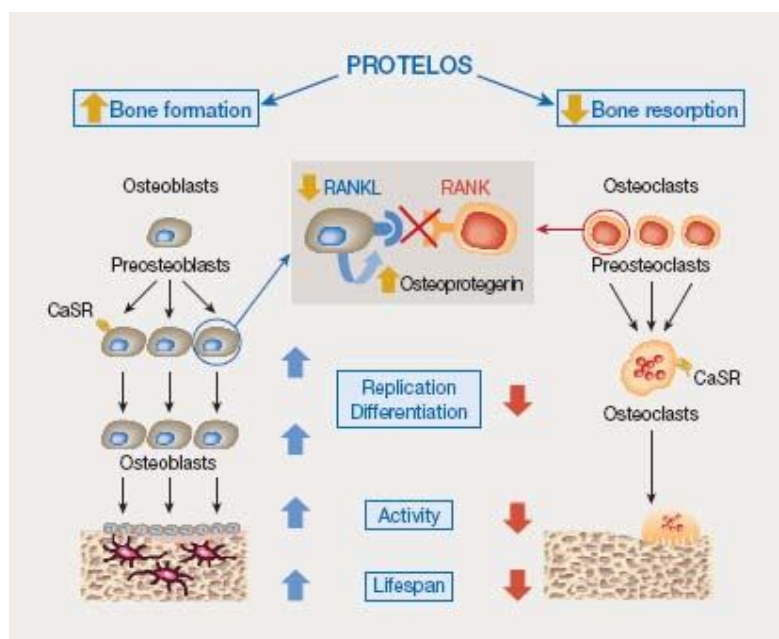
A reparação de defeitos ósseos críticos em situação de regeneração exige não somente sofisticação das modalidades terapêuticas, como descoberta de novas biotecnologias. Os fármacos, como o ranelato de estrôncio, são comercializados e utilizados em humanos com ação terapêutica profilática antiosteoporótica e no controle de complicações em situações de osteoporose (AMMANN et al. 2007; CORTINA; LÓPEZ, 2008; REGINSTER et al., 2008).

O ranelato de estrôncio é um sal (diestrôncico de ácido 5- [bi (carboximetil) amino) – 2 – carboxi – 4 – ciano – 3 – tiofenacético), formado por uma substância orgânica, o ácido ranélico, e dois átomos de estrôncio estável (BARRETO, 2011; TERRA et al. 2009; TIAN et al. 2009; CARVALHO, 2010). Foi utilizado, em algumas pesquisas, como mais uma estratégia terapêutica sistêmica modulando o processo de reparo de defeitos ósseos em condições e dimensões críticas.

O fármaco ranelato de estrôncio age sistemicamente, diminui a reabsorção, mantém ou aumenta a formação óssea, e seus testes foram realizados *in vitro* e *in vivo*. Nesses estudos, observou-se algum efeito quanto à prevenção e ao controle da osteoporose, especialmente, em mulheres pós-menopausa (HALBOUT, 2010). O ranelato de estrôncio foi utilizado como uma das possibilidades terapêuticas para diminuir a dificuldade regenerativa do defeito ósseo crítico (NASCIMENTO, 2010; ROLIM, 2013).

Apesar dos eventuais efeitos colaterais, a droga – que é composta por uma parte inorgânica, constituída por dois átomos de estrôncio estável, e a parte inorgânica, por ácido ranélico (Figura 3) – é utilizada em humanos.

**Figura 3** - Mecanismo ação: ranelato de estrôncio



Fonte: Halbout, 2010

É possível que a atuação do ranelato de estrôncio sobre a inibição dos pré-osteoclastos e, conseqüentemente, nos osteoclastos seja mimetizada através da ação do receptor extracelular sensível dependente ao cálcio (LONG, 2008; MAÏMOUN et al. 2010; MARIE, 2006; NIELSEN, 2004). A proteína osteoprotegerina e o aumento de sua ligação com o receptor RANKL favorecem, possivelmente, o efeito de anabolismo do íon cálcio e o tecido ósseo.

Entretanto, as combinações de estratégias (ondas vibratórias, ranelato de estrôncio e biomaterial) como prováveis agentes e potencialmente indutoras do reparo ósseo não são conhecidas em defeitos críticos. Estudos experimentais de investigação são necessários para elucidar essa lacuna científica.

### **3 OBJETIVOS**

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o reparo ósseo após terapias sistêmicas com ondas vibratórias e associações com a administração do fármaco ranelato de estrôncio e a implantação local de biomaterial.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar histomorfologicamente o potencial osteogênico no reparo de defeito ósseo crítico através de:

– Aplicação de ondas vibratórias obtidas da plataforma vibratória; associação de ondas vibratórias e a administração enteral do fármaco ranelato de estrôncio; aplicação das ondas vibratórias e a implantação de microesferas de HAAI<sub>g</sub>.

– Determinação das concentrações plasmáticas dos elementos cálcio e estrôncio após a administração de ranelato de estrôncio.



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 BIOMATERIAL

O biocompósito de microesferas – biocerâmicas de hidroxiapatita de cálcio conjugadas ao alginato – foi o biomaterial usado neste estudo. Os pesquisadores do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Alexandre Rossi, sintetizaram, caracterizaram e forneceram o biomaterial destinado aos experimentos. As microesferas de HAAlg, não sinterizadas e com tamanho entre  $200 > \phi < 425 \mu\text{m}$ , foram produzidas em condições reativas, cuja reação é demonstrada na fórmula a seguir (Figura 4):

**Figura 4** - Reação da formação de microesferas de HA



**Fonte:** Adaptado de Barreto, 2011

De acordo a reação ilustrada acima, o protocolo de produção do biomaterial, microesferas de HAAlg, é descrito no modelo esquemático (Figura 5) a seguir:

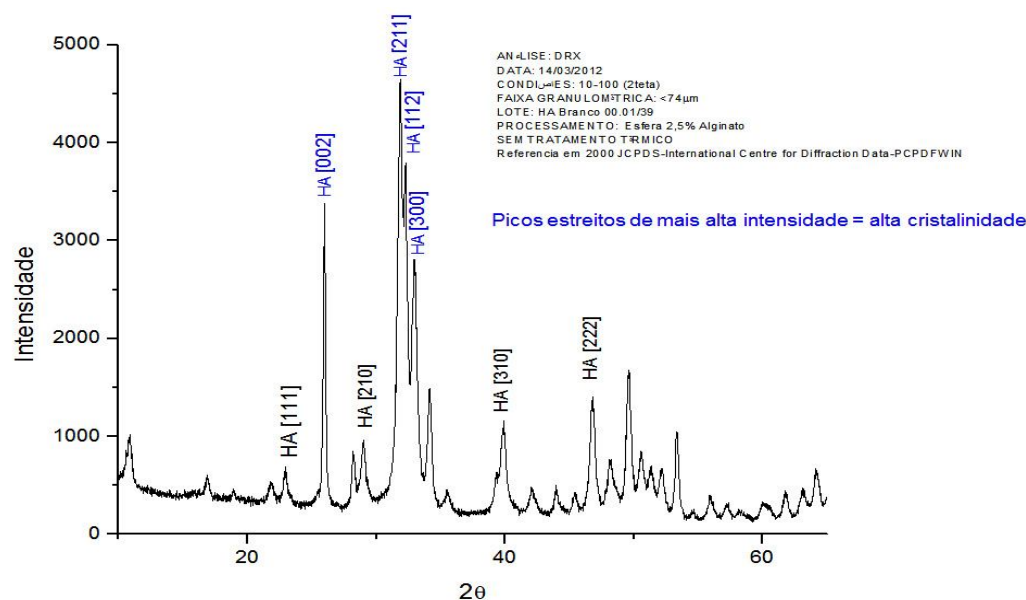
**Figura 5** - Modelo esquemático de síntese de HAAlg



As amostras das biocerâmicas de hidroxiapatita estequiométrica foram produzidas pelo método de precipitação, por via úmida com razão molar dos íons  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , na qual a relação Ca/P foi igual a 1,67. As condições reacionais foram favoráveis à composição de um biomaterial com fase cristalina. A síntese do biomaterial composto por microesferas de hidroxiapatita e alginato (HAAIg;  $200 > \phi < 425 \mu\text{m}$ ) foi obtida a partir de duas soluções primárias com o objetivo de, em condições reativas ideais, formar o precipitado. A primeira solução foi composta por íons de cálcio (Solução I) e a segunda solução composta pela adição de íons fosfato (Solução II). A reação de precipitação foi adquirida com o uso de um balão volumétrico contendo a mistura da Solução I mais uma solução de nitrato de cálcio (0,2M). Este fluido foi mantido sob a vazão de 30mL/min., e sob a agitação constante, cuja temperatura manteve-se entre 85 à 90°C. À Solução II, foi acrescida do composto de fosfato dibásico. A bomba peristáltica foi utilizada a fim de manter a solução sob agitação contínua por quatro horas consecutivas. Após este tempo, obteve-se o precipitado cristalino e maturado. O precipitado foi obtido com o uso de um funil de Buchner utilizado para filtrar as misturas obtidas a partir das Soluções I e II. O pó de hidroxiapatita nanoestruturado foi obtido sob um pH 7,0, uso de água Milli-Q à temperatura 90°C e sucessivas ressuspensões.

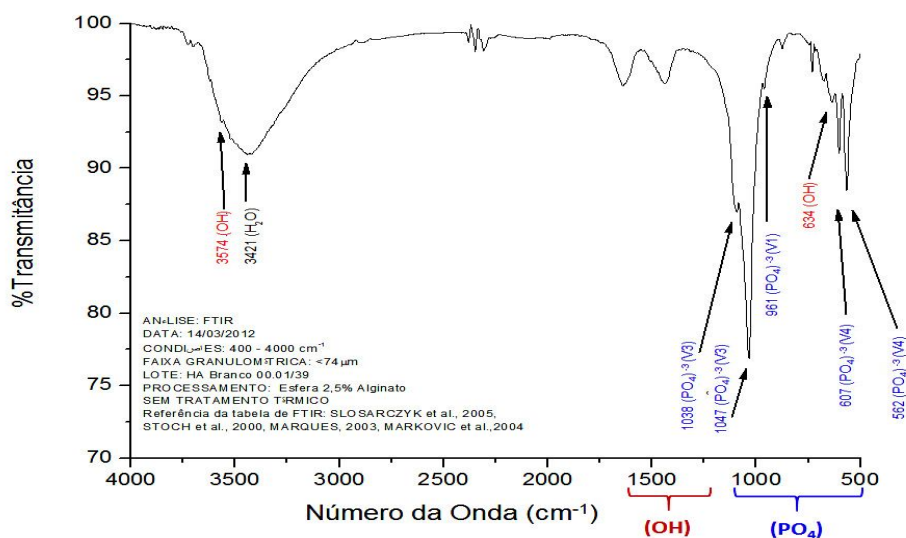
O pó de hidroxiapatita resultante foi submetido à separação granulométrica. Os grânulos de HA obtidos a partir desta separação possuíam tamanho igual ou superior a 200 micrômetros. À obtenção do biocompósito de microesferas de HAAIg inicial, sob a forma de uma espécie de pasta cerâmica foi realizado o seguinte procedimento: para a obtenção desta pasta cerâmica, realizou-se sob pequena agitação, a adição de partículas de alginato de sódio na concentração de 1%, cuja proporção foi de 15:1. A formação das microesferas de HA foi possível através da obtenção de uma pasta cerâmica homogênea. Esta foi ejetada com o auxílio de um êmbolo, cuja seringa continha uma solução de cloreto de cálcio na concentração de 0,15M. Após 24h sob este processo de extrusão, as microesferas obtidas foram lavadas em água. Em estufa à temperatura de 70°C, estas foram submetidas a secagem e obteve-se as microesferas não sinterizadas. A seleção de microesferas de HAAIg entre  $200 > \phi < 425 \mu\text{m}$  foi feita com a utilização de uma peneira granulométrica específica.

A caracterização do biomaterial foi realizada em três etapas. Na primeira etapa de caracterização do biomaterial, ele foi caracterizado pelo método de difração de raios X (DRX). O tamanho do cristal que integra o biomaterial, as quantidades de fases, a pureza, bem como a elevada cristalinidade foram identificadas de acordo com a demonstração do Gráfico 1.

Gráfico 1– DRX do biomaterial, (HAAI<sub>g</sub>)

O espectro de difração é demonstrado no difratograma. Os picos primordiais da HA estão de acordo com o padronizado, o PCPDFWIN. A amostra possui alta cristalinidade, representada pelos picos em istmo, observados no eixo Y.

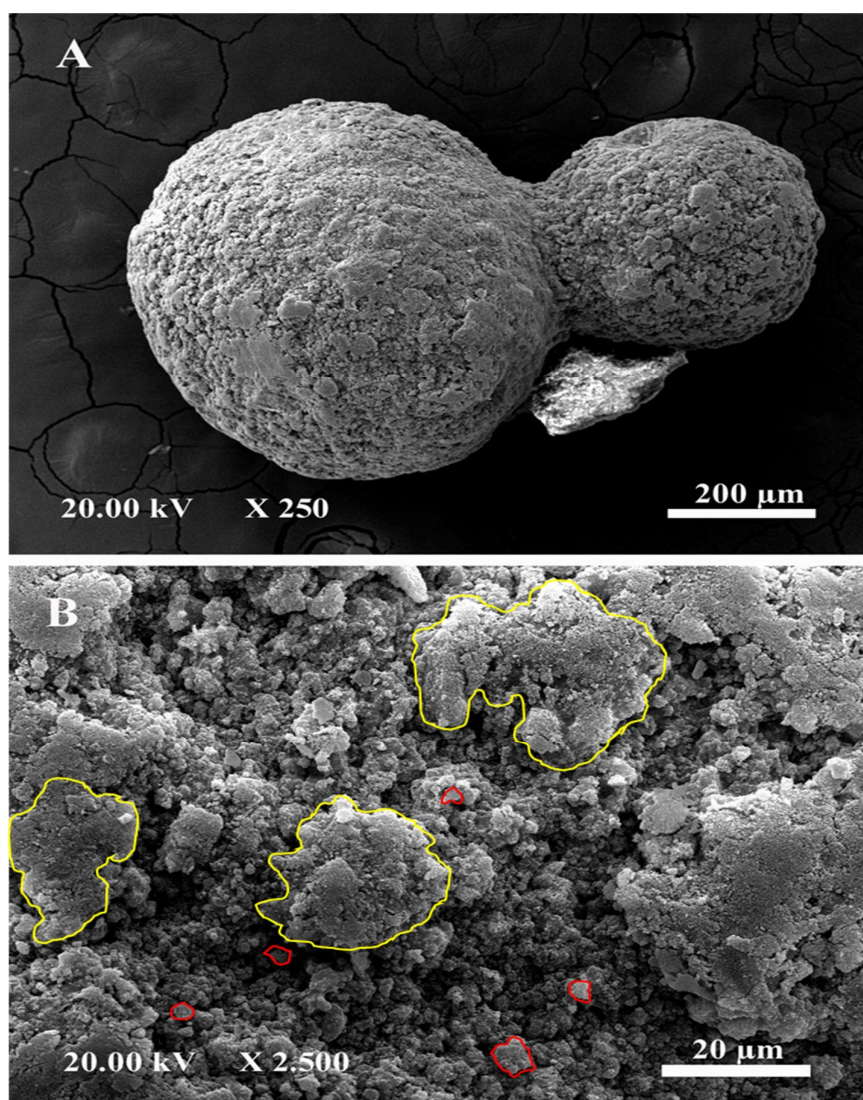
A segunda etapa de análise e identificação foi realizada através de espectroscopia de absorção no infravermelho, por meio da transformada de Fourier (FITR). Esse método possibilitou determinar e padronizar, qualitativamente, os grupos funcionais da HAAI<sub>g</sub> obtida, cuja imagem é ilustrada no Gráfico 2.

Gráfico 2 – Grupos funcionais do biomaterial HAAI<sub>g</sub>

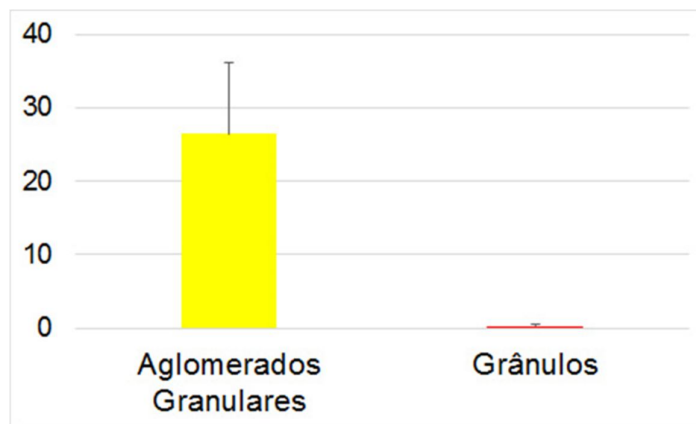
O biomaterial é composto HA [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ]. As frações totais de OH1 equivalentes a 4808  $\text{cm}^{-1}$ . As frações parciais de fosfato nas áreas 1500 $\text{cm}^{-1}$  a 1250 $\text{cm}^{-1}$  e em 1000  $\text{cm}^{-1}$  a 500  $\text{cm}^{-1}$ . Estas frações demonstram que o biomaterial manteve sua configuração elementar.

Na terceira etapa, a última, a caracterização do biomaterial foi concluída. Nela, observou-se a porosidade interna e superficial do biomaterial padronizado para o presente estudo. As fotomicrografias abaixo foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV); a Figura 6 e o Gráfico 3 demonstram a variação da granulação da HAAlg. Concluída a etapa de caracterização do biomaterial obtido, ele foi alíquotado em quantidade de 0,12g, embalado individualmente e esterilizado por radiação gama.

**Figura 6** – Variações topográficas dos biomateriais: morfologia e textura do biomaterial (MEV). A e B – Superfície do biomaterial: grânulos individualizados (demarcados em vermelho) e grandes aglomerados granulares (em amarelo)



**Gráfico 3** – Tamanho das granulações da HAAI<sub>g</sub>, em  $\mu\text{m}^3$  plotados no gráfico.  $P < 0,0001$ ; teste-t de Student não pareado;  $n = 10$  elementos em cada condição experimental.



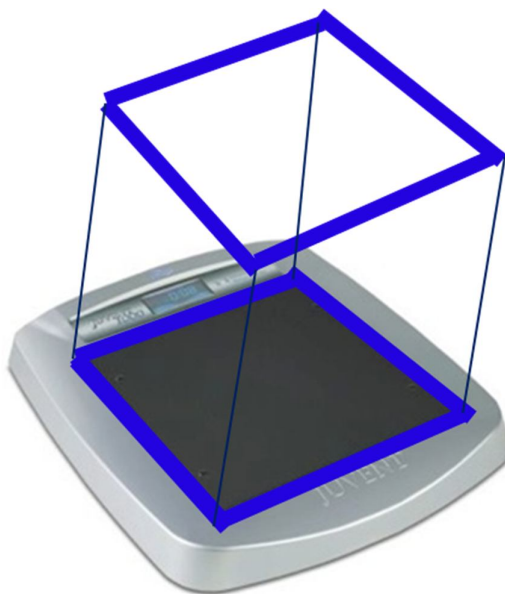
#### 4.2 PLATAFORMA VIBRATÓRIA

O equipamento Juvent 1000<sup>®</sup>, um produto de inovação biotecnológica que produz ondas vibratórias, foi utilizado para a terapêutica sistêmica. O aparelho oferece a possibilidade de vibração sistêmica com tecnologia de acordo com as especificações e em cumprimento às normas técnicas da ANVISA.

As magnitudes de aceleração usadas no dispositivo se mantiveram nos limites recomendados para a tolerância humana pela ISO/INMETRO. De acordo o padrão de segurança emitido pela ISO, o sinal usado pela Plataforma Juvent1000<sup>®</sup> foi de 0,3 g e a frequência entre 32-37 Hz. Essa dose foi indicada para o uso seguro em exposições de até 4 horas por dia em humanos.

Os animais deste experimento foram mantidos em condições de segurança similares, com tempo de exposição máxima de 20 min. Utilizou-se a plataforma com ajustes automáticos à massa corporal do animal de experimentação e com a capacidade máxima para até 600g. Apesar de adaptada com uma tela vazada em acrílico (Figura 7), a plataforma vibratória foi projetada para oferecer o sinal específico através de sensores e um modo de calibração de fábrica. Ela foi utilizada de acordo às instruções do fabricante.

**Figura 7** - Plataforma vibratória com tela vazada



#### 4.3 FÁRMACO RANELATO DE ESTRÔNCIO

O ranelato de estrôncio (Protos®), um fármaco de ação sistêmica, foi usado nos experimentos. É um sal composto por dois átomos de estrôncio estáveis – a fração inorgânica e uma substância orgânica, o ácido ranélico.

Cada sachê de Protos® contém 2,0g de grânulos de ranelato de estrôncio hidratado, iguais a 2,632g, correspondentes a 2,0g de ranelato de estrôncio anidro. Seus excipientes são aspartame, maltodextrina e manitol. O fármaco é autorizado pela ANVISA, e de uso comercial para humanos (Figura 8). Foi administrado por via oral nos ratos deste estudo, os quais foram alocados em determinados grupos desta pesquisa.

**Figura 8** – Fármaco comercial: granulado para suspensão oral



Fonte: rodrigopoubel.com.br

#### 4.4 ANIMAIS

## Modelo animal experimental

O projeto desta pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisas em Animais da Universidade Estadual de Feira de Santana, através do Ofício 57/2012, sob Protocolo n° 004/2012 (Anexos A e B). Sua execução seguiu as Normas Éticas de Pesquisas em Animais, bem como, as Normas Nacionais de Biossegurança. As diretrizes do Instituto Nacional de Saúde para o cuidado e uso de animais de laboratório (NIH Publicação n° 85-23 Rev. 1985) também foram seguidas.

Foram utilizados 105 *Rattus norvegicus*, da linhagem *Wistar albinus*, machos, com massa corporal entre 350 e 450g. O protocolo cirúrgico estabelecido em estudos prévios (MIGUEL, et al., 2006) foi utilizado para a realização do defeito crítico na calvária dos ratos. Os animais ficaram durante todo o período experimental em gaiolas identificadas de acordo os grupos, revestidas com cama de *maravalha de pinus* (autoclavada) e trocada diariamente. Foram alimentados com ração sólida Labina<sup>TM</sup> e água *ad libitum*, e mantidos em condições ambientais controladas de temperatura e luminosidade. A seguir, apresenta-se a descrição para a composição dos grupos de acordo o ponto biológico e a tabela dos respectivos animais *versus* ponto biológico.

### 4.5 COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS E NÚMERO AMOSTRAL

A composição dos grupos e o número amostral experimental foram determinados de acordo com a realização de estudos prévios (BARRETO, 2008; MIGUEL, 2006; ROLIM, 2010) e de estudo-piloto, bem como estudos correlatos na literatura científica.

Os animais foram distribuídos de forma aleatória para a composição dos sete grupos, com 15 animais em cada, avaliados nos pontos biológicos de 15, 45 e 120 dias pós-operatórios, de acordo o descrito e conforme a Tabela 1, a seguir.

Para os animais com ou sem defeito crítico em calvária, de acordo com o ponto biológico:

- I. Grupo Controle Sem Defeito Padrão Ouro – GSDPO: a calvária não foi submetida à criação do defeito ósseo crítico e permaneceu íntegra.
- II. Grupo Experimental Defeito Vazio Padrão Ouro – GEDV: a calvária de cada animal foi submetida à trepanação, cujo defeito foi preenchido apenas pelo coágulo.



III. Grupo Experimental Ondas Vibratórias – GEOV: o defeito ósseo produzido foi preenchido apenas pelo coágulo. Cada animal operado foi submetido à aplicação de ondas vibratórias a partir do pós-operatório imediato (POI).

IV. Grupo Experimental Ondas Vibratórias e Ranelato de Estrôncio – GEOVRE: a calvária do rato foi submetida à criação do defeito ósseo crítico. O defeito foi preenchido apenas com coágulo. Foram iniciadas as aplicações de ondas vibratórias e realizada a administração enteral de relato de estrôncio no POI de cada rato.

V. Grupo Experimental Ondas Vibratórias e Hidroxiapatita – GEOVHA: o defeito ósseo produzido foi preenchido com o biomaterial composto por microesferas de hidroxiapatita e alginato (HAAIlg). A aplicação de ondas vibratórias ocorreu partir do POI de cada rato.

VI. Grupo Experimental Ranelato de Estrôncio – GERE: o defeito foi preenchido apenas com coágulo. Foi realizada a administração enteral de ranelato de estrôncio no POI para cada rato.

VII. Grupo Experimental Hidroxiapatita e Alginato – GEHARE: o defeito ósseo recebeu a implantação do biomaterial e administração de ranelato de estrôncio

**Tabela 1** - Composição dos grupos e número amostral de acordo com o ponto biológico

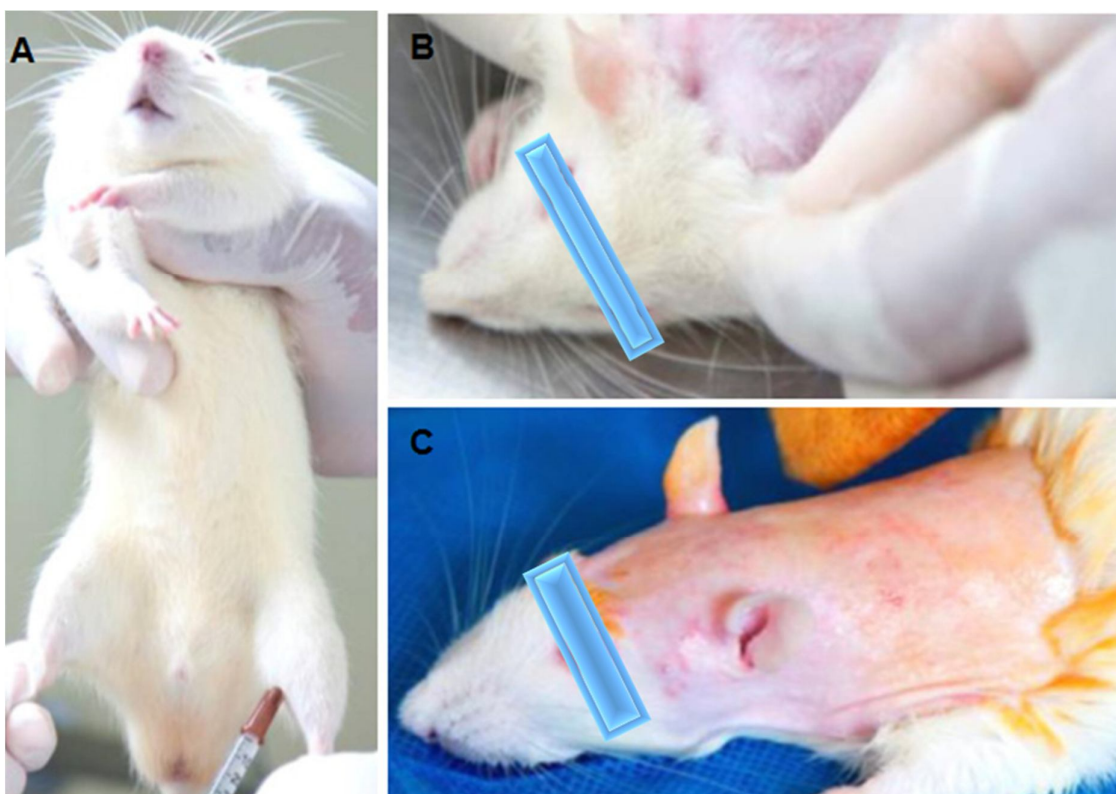
Período	15d	45d	120d	Total
<b>Grupos/Defeitos/ Ponto biológico</b>				
I.GSDPO	5	5	5	15
II.GEDV	5	5	5	15
III.GEOV	5	5	5	15
IV.GEOVRE	5	5	5	15
V.GEOVHA	5	5	5	15
VI.GERE	5	5	5	15
VII.GEHARE	5	5	5	15
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>105</b>

#### 4.6 ETAPA CIRÚRGICA

Modelo cirúrgico – Técnica cirúrgica: criação do defeito crítico em calvária e implante do biomaterial

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo a determinação do protocolo de técnica cirúrgica descrito por Miguel et al. (2006). O defeito crítico criado na calvária do rato foi de 8,5mm. Os animais foram submetidos a anestesia, com injeção intramuscular de cloridrato de quetamina, na proporção de 0,8 mL/100 g de massa corpórea, e a analgesia e sedação com injeção intramuscular de cloridrato de xilazina, na proporção de 0,04 mL/100 g de massa corpórea, como se verifica na Figura 9 a seguir.

**Figura 9** - Etapa cirúrgica: técnica anestésica



**Fonte:** Adaptado de Carvalho, 2010

A anestesia foi realizada com cloridrato de quetamina a 10%, e a analgesia e sedação com cloridrato de xilazina com injeção intramuscular (A); foram efetivadas a tricotomia da área cirúrgica (B) e a antisepsia com solução de álcool iodado (C).

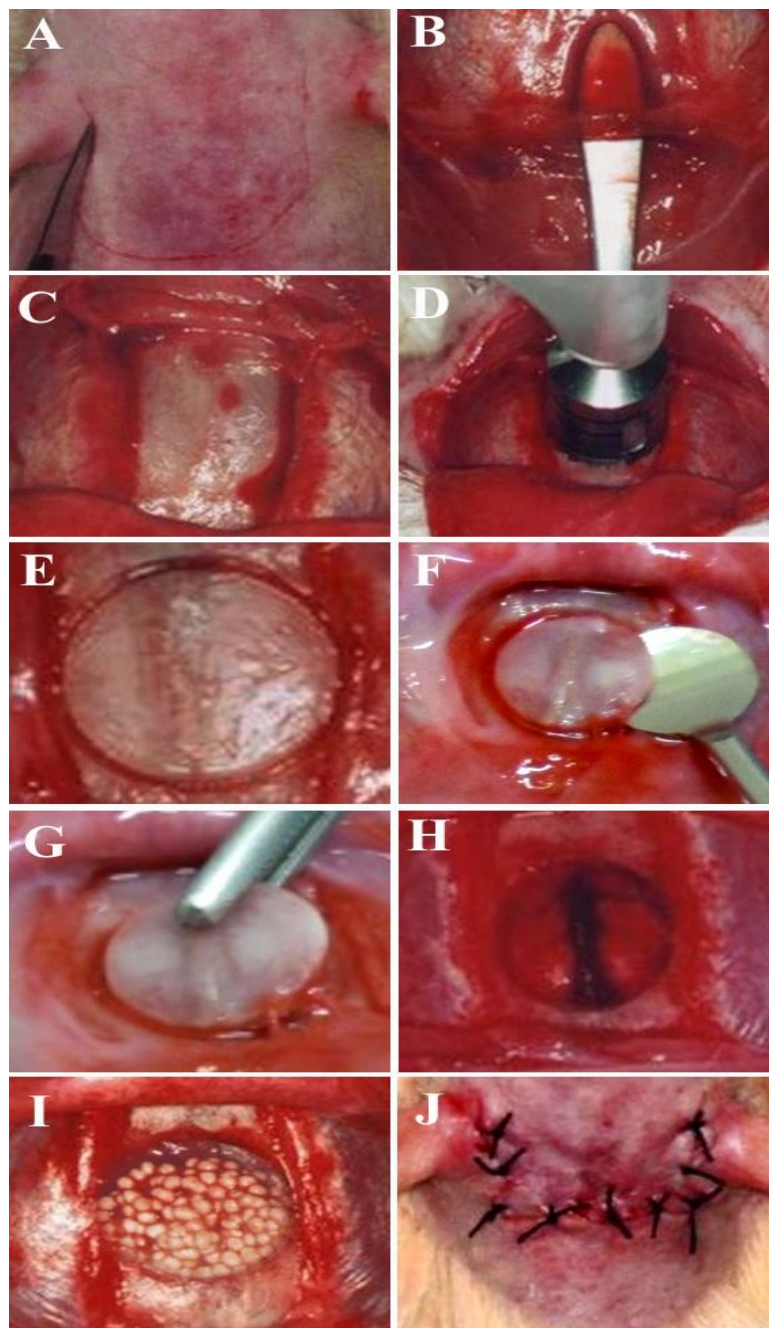
Vale ressaltar que esse protocolo de anestesia foi utilizado tanto para a etapa cirúrgica quanto para o procedimento de punção cardíaca e coleta de sangue, a ser descrito, posteriormente. Em seguida, os animais foram submetidos à tricotomia, acompanhada por antissepsia com álcool iodado nos campos peri e operatório. A técnica anestésica e a adequada tricotomia dos animais estão apresentadas na Figura 9.

Os animais foram posicionados em decúbito ventral, para acesso à calvária. Em seguida, foi realizada incisão cutânea bicoronal, semilunar, com aproximadamente 3,0 cm de extensão, com lâmina de bisturi n° 15, seguida de divulsão e elevação do retalho para acesso ao periósteo.

O periósteo foi seccionado e removido para expor o tecido ósseo, com auxílio de uma espátula n° 7 e pinça clínica. Utilizou-se uma fresa trefina de aproximadamente 8,0 mm de diâmetro, montada em contra-ângulo, com redução de 1:16, acoplada em motor cirúrgico com 1500rpm. Sob irrigação constante com soro fisiológico estéril, foi confeccionado, entre os vértices das suturas anterior e posterior da calvária, o defeito ósseo circular transfixado, com aproximadamente 1,0 mm de espessura.

Os defeitos ósseos dos grupos GOVHA e GERARE foram implantados com biomaterial, e os demais grupos GSDPO, GCDPO, GOV, GEVRE, GERE não foram implantados com biomateriais. É importante salientar que os animais dos grupos GOV, GOVRE, GOVHA foram submetidos à aplicação das ondas vibratórias no POI. Os biomateriais utilizados foram implantados em toda a extensão do defeito; em seguida, foi feita a reposição do retalho e a sutura com fio seda 4.0, de acordo com a sequência da etapa cirúrgica demonstrada na Figura 10.

**Figura 10** – Etapa cirúrgica: sequência cirúrgica e implantação do biomaterial



**Fonte:** Adaptado de Miguel, 2008; Rolin, 2010 e Campos, 2012

Na Figura 10, A corresponde à demarcação da área de incisão; B, à divulsão dos tecidos; C, à remoção do periósteo; D, à transfixação óssea com broca trefina de 8,5 mm; E, à calvária demarcada; F e G, ao deslocamento e à remoção do fragmento ósseo,

respectivamente). Em H, registra-se defeito ósseo crítico de 8,5mm de diâmetro; em I, a inserção do biomaterial; em J, o retalho reposicionado e suturado com pontos interrompidos.

### **Manutenção dos animais após a etapa cirúrgica até a morte**

Após a etapa cirúrgica, os animais foram mantidos nas condições previstas pelo CEUA, em gaiolas individuais, identificadas conforme os grupos e pontos biológicos, respectivamente. Na ficha de identificação constavam, ainda, a massa corporal, a data da cirurgia e a data provável de morte do animal, de acordo os pontos biológicos de 15, 45 e 120 dias. Os animais de cada grupo foram submetidos aos protocolos de terapêutica sistêmica de acordo o que é descrito a seguir (Figura 11).

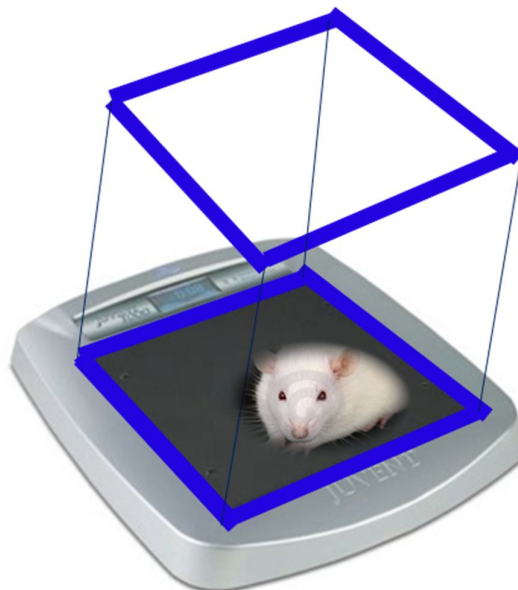
**Figura 11** – Animal experimental na plataforma em grupos de acordo o ponto biológico



### **Obtenção de ondas vibratórias (protocolo de aplicação)**

As ondas vibratórias foram obtidas através do uso da plataforma vibratória modelo Juvent1000®, previamente calibrada pelo fabricante. Para manter o rato sobre a plataforma foi construída uma caixa vazada nos segmentos inferior e superiormente à plataforma (Figura 12).

**Figura 12** – Aplicação do protocolo de aplicação de ondas vibratórias



Após a etapa cirúrgica, os ratos recuperavam-se da narcose anestésica e, no primeiro dia do pós-operatório, de acordo com grupo a que pertenciam, recebiam as ondas vibratórias. Cada rato foi mantido sobre a plataforma vibratória, cuja periferia era protegida pela tela a fim de assegurar a administração da terapêutica proposta no protocolo (Figura 12). As ondas vibratórias foram aplicadas sistemicamente nos ratos em três sessões diárias, por vinte minutos, nos diferentes pontos biológicos, cuja frequência, independentemente do peso, era de 60Hz. Esse protocolo foi estabelecido após a realização de experimentos-piloto, prévios ao presente estudo, pois não era conhecida a dose para uso em defeito ósseo crítico. Protocolos existentes na literatura correlata foram adaptados (AUGAT, 2006; DELECLUSE et al., 2011; FRANKEL, 2005; TORVINEN et al., 2002).

#### **Posologia e administração de fármaco (protocolo de aplicação)**

A posologia foi estabelecida de acordo o protocolo estabelecido (BARRETO, 2011; NASCIMENTO, 2010). Uma parte da ração sólida Labina® foi centrifugada. Obteve-se uma dieta pastosa, através da adição, à quantidade de 7900mg de ração, de 900mg/Kg/dia de ranelato de estrôncio e 5mL de água. A dose diária administrada foi de 337,5 mg, que corresponde a 3,51 mmol de Sr/kg/dia (ROLIM, 2013). O composto pastoso obtido foi distribuído para cada animal em seus respectivos recipientes.



Esse composto de ração, água e Protos® foi administrado todas as manhãs, desde o primeiro dia de pós-operatório e durante os respectivos pontos biológicos de 15, 45, 120 dias do GOVRE e GERARE (Quadro 1).

No estudo, 60 animais foram distribuídos aleatoriamente, de acordo o quadro 1.

Os animais de cada grupo amostral foram submetidos a terapia sistêmica com o fármaco ranelato de estrôncio, cujas condições foram similares às de estudos prévios de Nascimento (2010).

Parte dessas amostras (Tabela 2) serviu como grupo controle desta pesquisa. Todos os grupos estão descritos a seguir.

### **Para os animais que receberam ou não ranelato de estrôncio por via enteral**

**Tabela 2** – Composição das amostras: tratados ou não com ranelato de estrôncio

Período	15 d	45d	120d	Total
<b>Grupos</b>				
GCCPC	5	5	5	15*
GCCPE	5	5	5	15
GCPC-GEOVRE	5	5	5	15
GCPE-GEHARE	5	5	5	15
Total	20	20	20	60

I. Grupo controle padrão ouro, concentração plasmática de cálcio (GCCPC): o sangue do rato foi colhido. Não houve administração do fármaco ranelato de estrôncio.

II. Grupo controle padrão ouro concentração plasmática de estrôncio (GCCPE): a amostra de sangue do rato foi analisada após administração do fármaco, de acordo os pontos biológicos.

III. Grupo concentração plasmática de cálcio do GEOVRE (GCPC-GEOVRE): a calvária do rato foi submetida à criação do defeito ósseo crítico. O defeito foi preenchido apenas com coágulo. Foram iniciadas as aplicações de ondas vibratórias e realizada a administração enteral de ranelato de estrôncio no POI de cada rato.

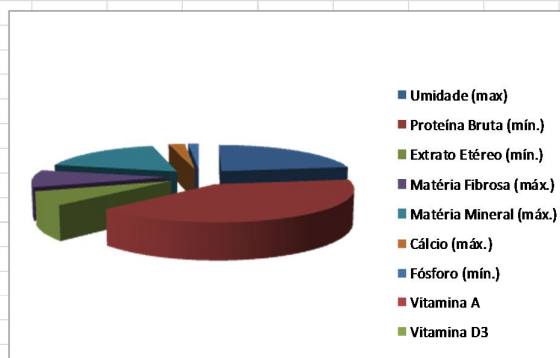
IV. Grupo concentração plasmática de cálcio do GEHARE (GCPE-GEHARE): o defeito foi preenchido com HAAlg. Foram administradas as doses por via enteral de ranelato de estrôncio no POI de cada rato.

### Administração da dieta

Da narcose anestésica até antes de receber o composto, os animais dispunham, para consumo, apenas de água *ad libidum*. O conjugado de água, ração e fármaco era consumido em até duas horas. Após a ingesta, os animais faziam uso de água *ad libidum* e alimentavam-se normalmente com a ração sólida Labina® Purina, cuja composição se encontra na Tabela 3, abaixo:

**Tabela 3** – Composição nutricional da ração Labina® Purina – Quantidade por Kg de ração destinada a alimentar os ratos

Matéria Fibrosa (máx.)	5,00%
Matéria Mineral (máx.)	10,00%
Cálcio (máx.)	1,30%
Fósforo (mín.)	0,85%
Vitamina A	25600 UI
Vitamina D3	4000 UI
Vitamina E	82 mg
Vitamina K	6,4 mg
Vitamina B12	40 µg
Vitamina B12	11 mg
Vitamina B6	2,8 g
Sódio	220 mg
Niacina	11 mg
Tiamina	90 mg
Ácido Pantotênico	2800 mg
Colina	0,16 mg
Biotina	13 mg
Ácido Fólico	1,7 mg
Magnésio	110 mg
Manganês	1,0 mg
Iodo	0,2 mg
Selênio	2,0 mg
Cobalto	2,0 mg
Ferro	180 mg
Zinco	110 mg
Cobre	30 mg



### 4. 7 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Após cada ponto biológico, os ratos de cada grupo foram anestesiados e sedados com o mesmo protocolo utilizado na etapa cirúrgica. Em seguida, posicionados em decúbito dorsal. Localizou-se o coração, através da inspeção do tórax com o dedo indicador sobre o tórax entre a 4ª e a 6ª costela. Os batimentos cardíacos foram percebidos com a palpação, quando se

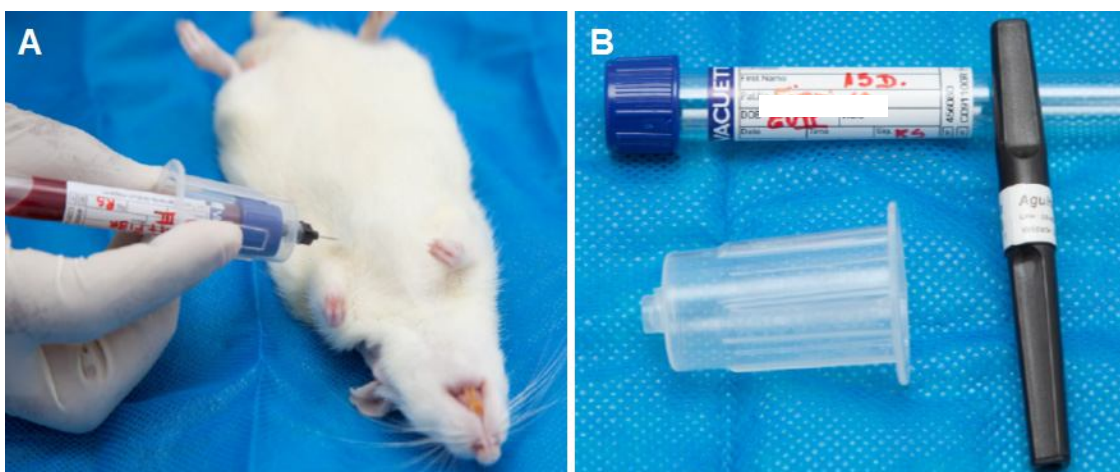


introduziu a agulha perpendicularmente à parede torácica. O sangue de todos os grupos foi coletado em tubos a vácuo de 6mL, livres de metais, com heparina sódica (Bencton & Dicson®).

A coleta ocorreu nos tempos biológicos de morte dos animais. O sangue foi centrifugado a 300rpm por 10 minutos, e aproximadamente 3mL do plasma foram transferidos para dois tubos *Eppendorf* de 1,5mL, previamente descontaminados em banho de ácido nítrico a 10%. As amostras foram armazenadas a -22°C até o momento da análise. Após a coleta, os animais foram mortos por dose letal de anestésico, seguida de deslocamento cervical, nos tempos biológicos previstos de 15, 45 e 120 dias.

A Figura 13 mostra a técnica de coleta de amostra de sangue por punção cardíaca (A) e um tubo adequadamente identificado para o acondicionamento do sangue obtido em cada amostra (B).

**Figura 13** – Coleta de Amostras



**Fonte:** Adaptado de Nascimento, 2010

#### 4.7.1 Análise laboratorial dos elementos estrôncio e cálcio

Os elementos estrôncio e cálcio foram mensurados no plasma sanguíneo através da técnica de espectrometria de absorção atômica, com forno de grafite e espectrometria de absorção atômica com chama.

##### **Dosagem de estrôncio**

As concentrações de estrôncio no plasma foram determinadas por meio da espectrometria de absorção atômica, com forno de grafite (GFAAS2).

A técnica de espectrometria de absorção atômica apresenta precisão superior, sensibilidade, especificidade e seletividade para quantificar elementos cujos teores podem estar geralmente em quantidades muito baixas em amostras biológicas (D'HAESE et al., 1997; NASCIMENTO, 2010).

O espectrômetro Varian AA240Z foi o equipamento utilizado. Ele foi conectado ao forno de grafite GTA 120 com a ajuda de um amostrador automático, o PSD 120. Uma lâmpada de 2 *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry* foi a fonte de luz utilizada e que gerou de um cátodo oco um espectro em torno 25mA a 460.7nm.

Foram padronizadas as condições de temperatura em etapas consecutivas: secagem, com evaporação do solvente (70-120°C), e, em seguida, carbonização, para remoção da matéria orgânica ou dos componentes voláteis da matriz (1000°C). Essas etapas foram realizadas através de um fluxo de argônio de 0,3 L/min. Em seguida, ocorreu a atomização, que origina uma nuvem do metal no estado elementar, quando a leitura é realizada a 2600°C. Foram transferidos para o tubo de grafite, apenas 8µL da amostra.

Essas amostras foram preparadas de acordo com o método descrito no protocolo estabelecido por D'HAESE et al. (1997). Nesse processamento, misturou-se 400µL da solução diluente e detergente (Triton X-100 0,1% em HNO<sub>3</sub> 0,2%, Suprapur, Merck®). Essa solução foi pipetada direto do frasco para os frascos do amostrador automático. Em seguida, foram acrescentados em 100µL do plasma, sob agitação mecânica automática. O plasma serviu para a realização da diluição.

Essa diluição, na relação 1:5, foi adequada para que os níveis plasmáticos fisiológicos estivessem entre um gradiente da curva de calibração previamente estabelecida, que foi de 2,5 a 20µg/L.

Nas amostras dos animais que utilizaram o fármaco ranelato de estrôncio, optou-se por uma relação de diluição mais alta (1: 1000). Em duplicata, todas as amostras foram preparadas e, em cada uma delas, injetou-se, também em duplicata, GFAAS. Foi aceita somente uma variação de intrainjeção menor que 10%. O marco de detecção do método foi de 1µg/L.

A precisão intrabateria, em amostra de plasma humano (n=5; 25µg/L), calculada como coeficiente de variação, foi de <1%. Diante da ausência de uma amostra de referência certificada, a precisão (99,6%) foi computada como recuperação em plasma humano, adicionando-se 10µgSr/L.

Os instrumentais, as vidrarias, as ponteiras e outros vasilhames foram submetidos à retirada de resíduos e livres de micro-organismos através da imersão em solução de ácido nítrico a 10% e lavados em água destilada Tipo I (Milli-Q, Millipore®).

### **Dosagem de cálcio**

A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS3) foi a técnica utilizada para estabelecer as concentrações do elemento cálcio no plasma. Essa é uma técnica bastante empregada para a determinação e a análise de elementos em níveis de mg/L.

O espectrômetro Varian 55B, equipado com queimador de ar-acetileno, foi o equipamento utilizado. Para gerar o espectro luminoso, utilizou-se uma fonte de luz. Para obtenção desse espectro, foi utilizada uma lâmpada de cátodo oco, cujo gradiente de troca foi em 10mA a 422,7nm. Esse protocolo determinado para a preparação e análise do Ca plasmático foi adaptado daquele estabelecido através dos estudos de Nascimento (2010).

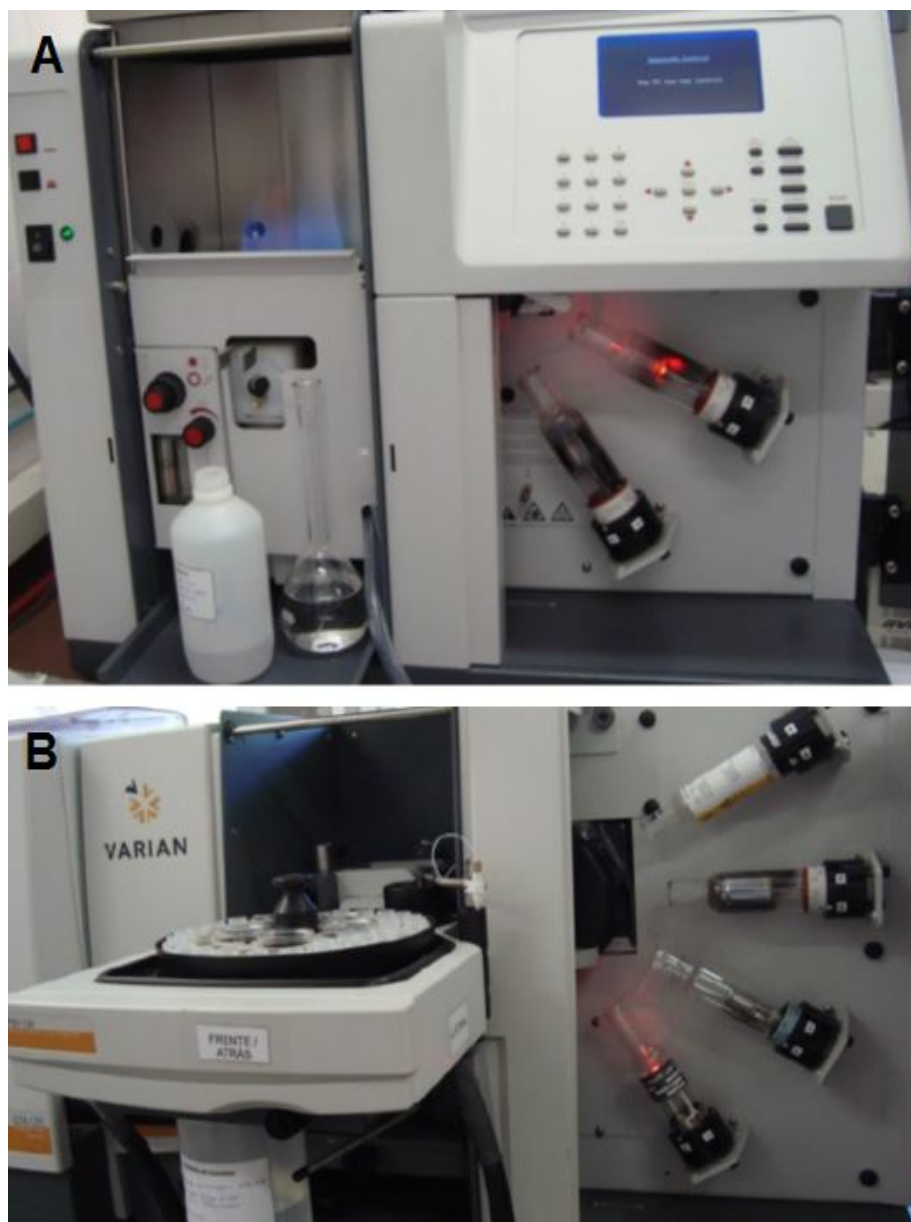
Uma fração do plasma dos animais foi retirada para a precipitação. Tal precipitação foi produzida através da adição de igual volume de ácido tricloroacético (Merck) a 5%.

Em seguida, o material particulado em suspensão foi rediluído, na proporção 1:50, com solução de cloreto de lantânio (JT Backer®) a 0,1%. Essas amostras foram preparadas nas mesmas condições de duplicata, isto é, nas mesmas condições de quando foram determinadas as concentrações do elemento estrôncio no plasma sanguíneo. Foi registrada a média de duas leituras, observado o coeficiente de variação menor que 5%.

Previamente, o equipamento foi calibrado com soluções-padrão de cálcio (1 a 5mg/L). Essas soluções foram obtidas com a utilização de ácido nítrico a 0,2%. As amostras de referência de soro humano Lyphocheck Nível 1 (Bio-Rad®) foram analisadas repetidamente (n=6) durante a corrida das amostras.

A exatidão e a precisão observadas foram 103,3% e 98,8%, respectivamente. Esse procedimento foi empregado para atestar o controle de qualidade da análise.

A Figura 14, mostra um aparelho de espectrometria que opera por absorção atômica de chama (A), e com o forno de grafite (B). Esses aparelhos fazem parte do acervo do Laboratório de Toxicologia alocado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA).,

**Figura 14 - Aparelhos de Espectrometria**

Fonte: Adaptado de Nascimento, 2010

### **Análise estatística**

Os dados obtidos foram alocados em planilha do Excel, 2012. Gerou-se um banco de dados. Estes dados foram analisados no *GraphPadPrism 4* (*GraphPad, Software, Inc*), e exportados diretamente da planilha para esse *software*. Realizou-se a observação e a correção dos dados copiados, com o intuito de evitar e eliminar a possibilidade de erros. Os dados

quantitativos foram expressos como média e desvio padrão. Para a análise, foi aplicado o teste não paramétrico, o Exato de Mann-Whitney (sem correção de Bonferroni). Os valores menores que  $P > 0,05$  foram considerados significativos.

Os resultados obtidos foram apresentados de forma descritiva, formulados em Word, com tabelas e figuras comparativas.

#### 4.7.2 Obtenção das amostras de calvárias

Após o procedimento de punção cardíaca e coleta de sangue, que ocorreu nos tempos biológicos determinados, os animais foram mortos com doses letais de cloridrato de quetamina. Os ratos foram dissecados para remover toda a porção superior da calvária, incluindo tecidos moles, porém foi mantida a dura-máter, o periósteo e a amostra retirada – a calvária. Os espécimes foram colocados separadamente em frascos coletores plásticos, identificados, com solução de formol tamponado a 4% para fixação. Foram utilizados os procedimentos de histotécnicas destinadas à análise por microscopia óptica. Os espécimes foram, então, divididos em duas partes, em uma proporção de 2/3 anteriores e 1/3 posterior das calvárias de todos os ratos em todos os pontos biológicos. O segmento anterior foi descalcificado e incluído em parafina. Os cortes foram analisados por microscopia óptica.

#### 4.8 ETAPA DE PROCESSAMENTO LABORATORIAL

##### **Processamento histológico**

Essa etapa foi realizada no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB) do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Em cada grupo, os animais foram mortos. Para cada biópsia coletada, foi executado o procedimento para processamento histológico, cujo protocolo seguiu o determinado por Miguel et al. (2006). Após fixação em formol tamponado a 4% durante 4 dias e realização da redução das calvárias, os fragmentos que incluíam o segmento anterior da calvária, estendendo-se 2mm depois do defeito, foram descalcificados com EDTA a 7% por 7 dias. Em um processador automático de tecido (LEICA – Nussloch, Alemanha), os fragmentos do tecido ósseo das calvárias foram processados. Utilizou-se uma sequência de álcool absoluto, xilol e parafina fundidos e, em seguida, foram incluídos em blocos de parafina. Foram realizados cortes histológicos em micrótomo para parafina. Os cortes seriados, de 5 $\mu$ m de espessura, foram alocados sobre

lâminas previamente tratadas para remoção de resíduos e aderência com silano. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e Picrossírius (PIFG) e Tricrômico de Masson Goldner, como se apresenta no Quadro 1.

**Quadro 1** – Colorações para microanálise

Colorações	Tecido ósseo	
Hematoxilina-Eosina (H&E)	x	núcleo, citoplasma
Picrossírius- <i>red</i> (PIFG)	x	colágeno tipo I
Tricrômico de Masson Goldner (TMC)	x	matriz osteóide

### **Análise histomorfométrica**

Para a análise histomorfométrica, os cortes histológicos foram examinados por microscopia de luz comum. Foi realizada a avaliação histomorfométrica e observaram-se os seguintes parâmetros de mensuração: área seccional mineralizada neoformada total; extensão linear do defeito primário; percentagem de preenchimento linear do defeito por tecido mineralizado neoformado. Tais parâmetros serão descritos posteriormente.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 MICROANÁLISE DESCRITIVA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA

As avaliações morfológicas qualitativas e descritivas foram realizadas no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB) do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS – UFBA), de acordo os grupos determinados, apresentados a seguir.

#### 5.1.1 Grupo sem defeito padrão ouro (GSDPO)

Aos 15, 45 e 120 dias, observou-se a presença de fibras colágenas organizadas em lamelas paralelas umas às outras, algumas vezes em camadas concêntricas em torno de canais com vasos. Essa característica foi observada às margens da borda óssea.

Lacunas com osteócitos foram observadas algumas vezes entre as lamelas ósseas. Em cada lamela, observou-se a presença de fibras de colágeno e, algumas vezes, o acúmulo de substância cimentante, pouco colágeno e abundância de matriz óssea mineralizada, especialmente observada, no centro do fragmento ósseo.

#### 5.1.2 Grupo experimental defeito vazio (GEDV) (Figuras 15 e 16)

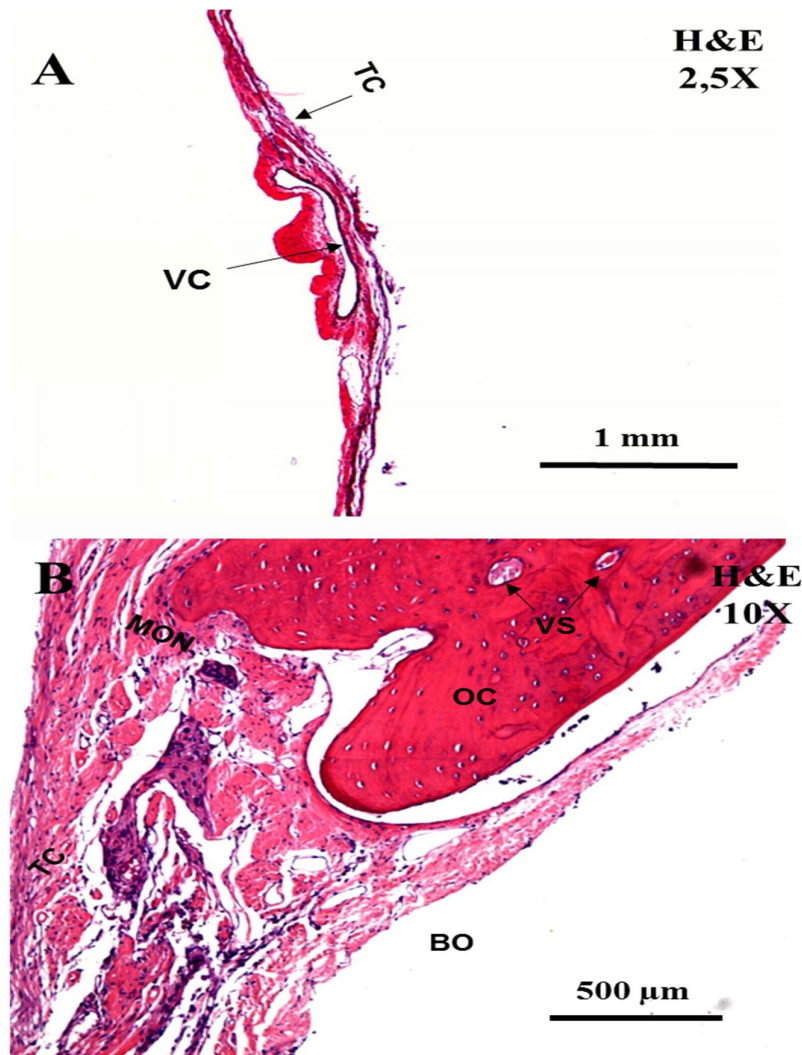
Em estudos prévios e em condições semelhantes às do presente estudo, Carvalho et al. (2010)<sup>1</sup> observaram, no GEDV, o padrão de resposta tecidual deste grupo controle. Na análise dos pontos biológicos de 15, 45 e 120 dias foram observados os aspectos a seguir indicados. Aos 15 dias, observou-se a neoformação óssea reparativa limitada às bordas do defeito, com o aspecto de osteoblastos ativos presentes. Essa neoformação, aos 45 dias, continuou limitada às bordas do defeito, mas em maior extensão e com a observação da presença de osteoblastos, além de osteócitos. Foi observada a continua diminuição da atividade dos osteoblastos. Aspectos de osso neoformado foram observados aos 120 dias, com estrutura pouco notável, caracterizada, pela observação da presença de osteócitos, mas sem características de proliferação e atividade osteoblástica. Nas regiões centrais, não se observou a presença de núcleos de mineralização intensos, mas muitos discretos. Aos 15 dias, na região central do defeito, notou-se a presença de tecido conjuntivo frouxo, com bastante neoformação de capilares sanguíneos e com a atividade proliferativa de células fusiformes. Aos 45 dias, a mesma região central do defeito apresentou-se cheia de tecido conjuntivo denso, cuja espessura foi muito menor do que a espessura das margens ósseas



proximais ao defeito e com uma pequena formação vascular, o que predominou nas proximidades das bordas ósseas. Características foram observadas mais nítidas aos 120 dias, com formação e presença de um tecido conjuntivo denso e com pouca vascularização formada. O tecido conjuntivo formado no local ocupou toda a extensão do defeito e manteve-se com uma espessura bastante inferior à da espessura do osso antigo<sup>1</sup>. Foi notada a presença de um infiltrado inflamatório mononuclear e difuso, porém com redução contínua ao longo dos pontos biológicos, respectivamente aos 15, 45 e 120 dias.

#### A – Centro; B – Borda GEDV 15d

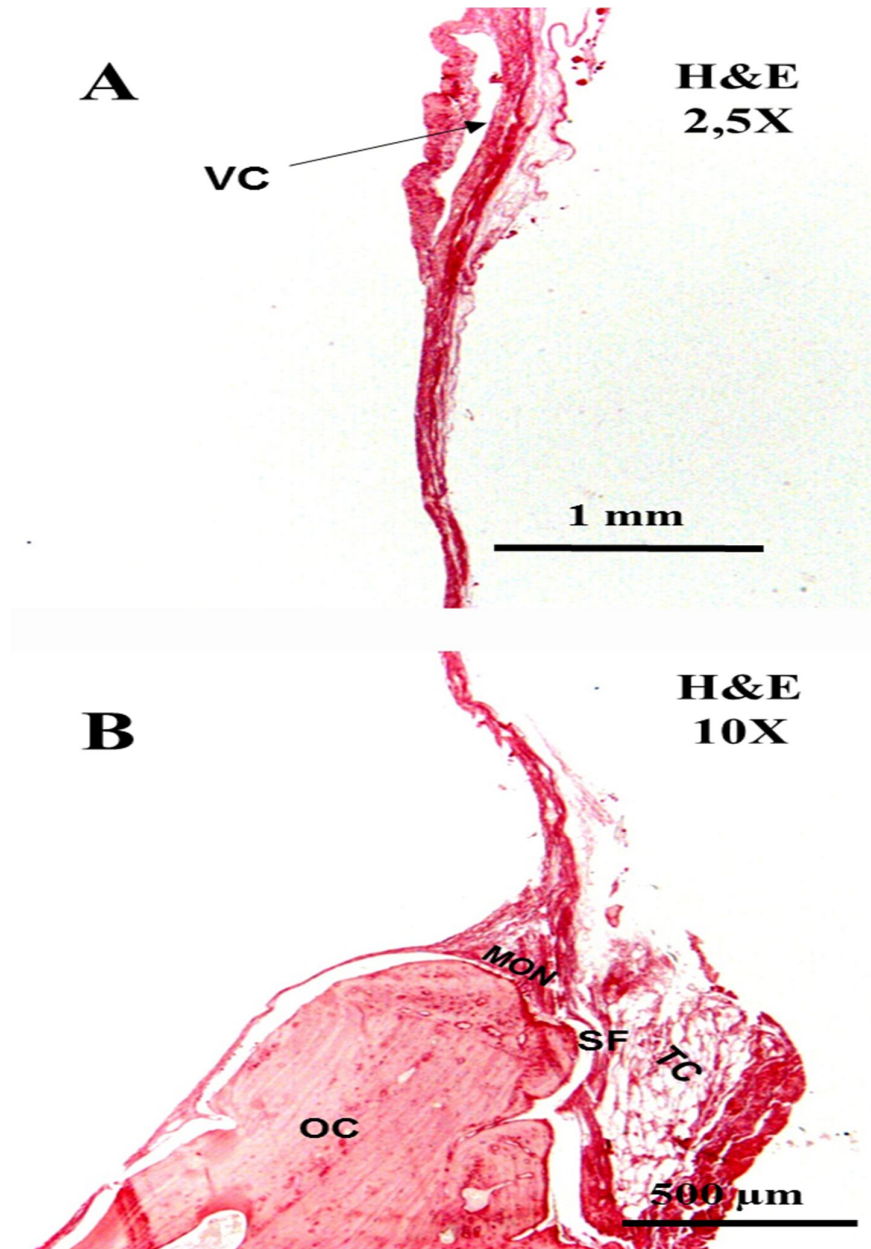
**Figura 15** – GEDV 15 dias. A – centro do defeito: TCF ao longo do defeito e veia central (VS). B – Matriz osteoide neoformada (MON), espessura quando localizada próxima à borda óssea, osteócitos no osso remanescente e vasos sanguíneos (VS). Coloração: H&E.



<sup>1</sup> Adaptado de Carvalho, 2010.

**A – Centro; B – Borda GEDV 45d**

**Figura 16** – GEDV 45 dias. A – Centro do defeito: via central (VC) matriz osteoide e ocupação linear de tecido conjuntivo fibroso (TCF). B – borda óssea (BO), matriz osteoide neoformada (MON) restrita à borda, tecido conjuntivo (TC). Coloração: H&E.



**5.1.3 Grupo experimental ondas vibratórias (GEOV) (Figuras 17-22)**

Aos 15 dias, nas bordas do defeito, foi observada neoformação óssea reparativa reacional, com a borda inferior em bisel mais inclinado. No centro do defeito, foi observado tecido conjuntivo frouxo, algumas vezes adelgado, permeado por áreas de hemorragia

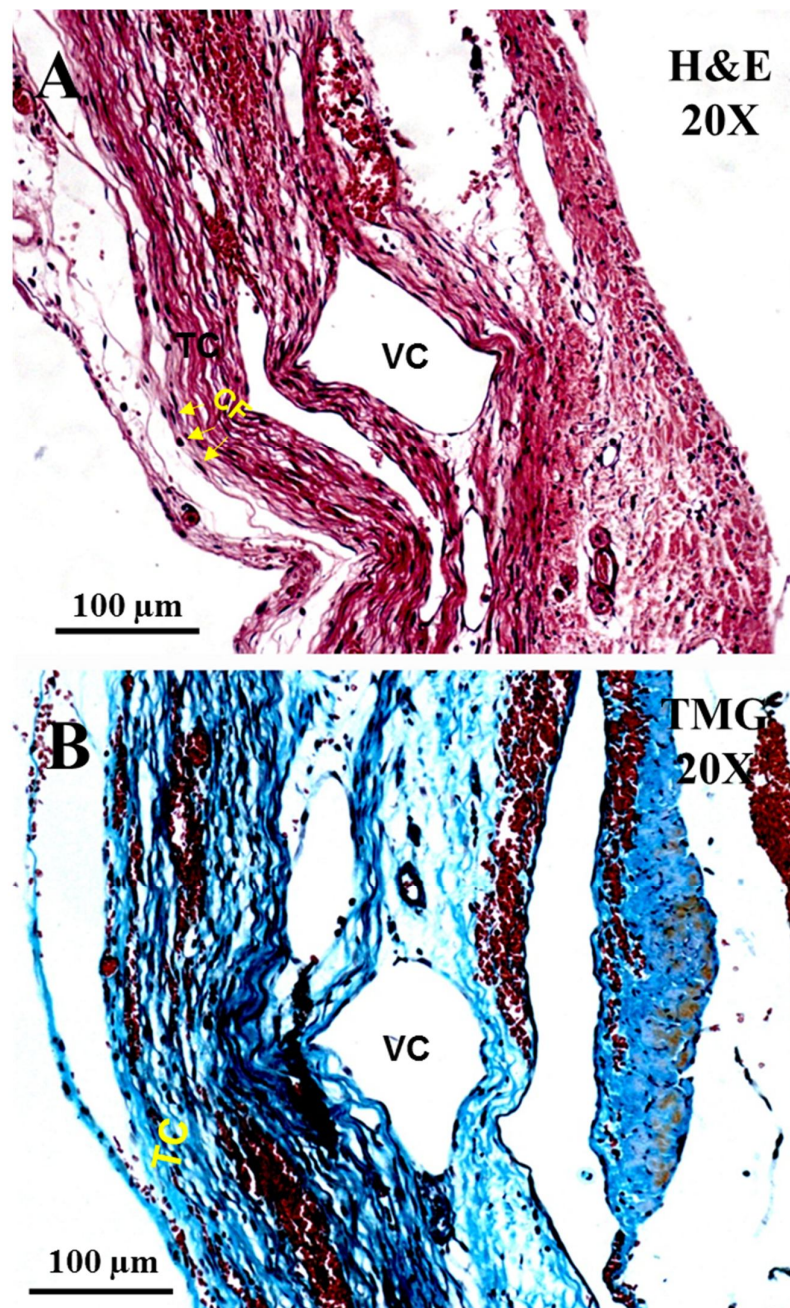
com edema. Observou-se neoformação de matriz osteóide em direção centrípeta em relação ao defeito, aproximadamente em 1/5 da extensão do defeito, assim como focos de neoformação e matriz osteóide ao longo do defeito. Foram encontradas extensas áreas de hemorragia antiga, as quais são mais evidentes nas porções mais periféricas. A observação de hemorragia era menor em extensão e menos evidente em áreas nas quais acontecia neoformação de matriz osteóide. Verificou-se infiltrado inflamatório mononuclear e edema discreto no interstício, e tendência ao adensamento de células mesenquimais fusiformes com deposição de fibras colágenas, fibroblastos ativos. Notou-se, ainda, inflamação crônica com pequena quantidade de linfócitos. Identificaram-se os osteoblastos alinhados e ativos, caracterizados à de matriz. Os osteócitos foram identificados e apresentaram-se com a característica de menor atividade.

Aos 45 dias, observou-se que a neoformação óssea ocupou mais de 80% de extensão do defeito. O fechamento do defeito, em extensão, de uma borda a outra, se manteve com uma espessura delgada. Não foram evidenciados sinais de hemorragia antiga e sinais flogísticos. Em algumas áreas, foi visualizada a formação de medula óssea.

Aos 120 dias, notou-se que a neoformação óssea estava presente em cerca de 80% da extensão do defeito e com progressão em relação ao grupo de 45 dias. A espessura da neoformação óssea demonstrou-se diminuída à medida que se observaram as regiões mais centrais do defeito.

**Centro GEOV 15d**

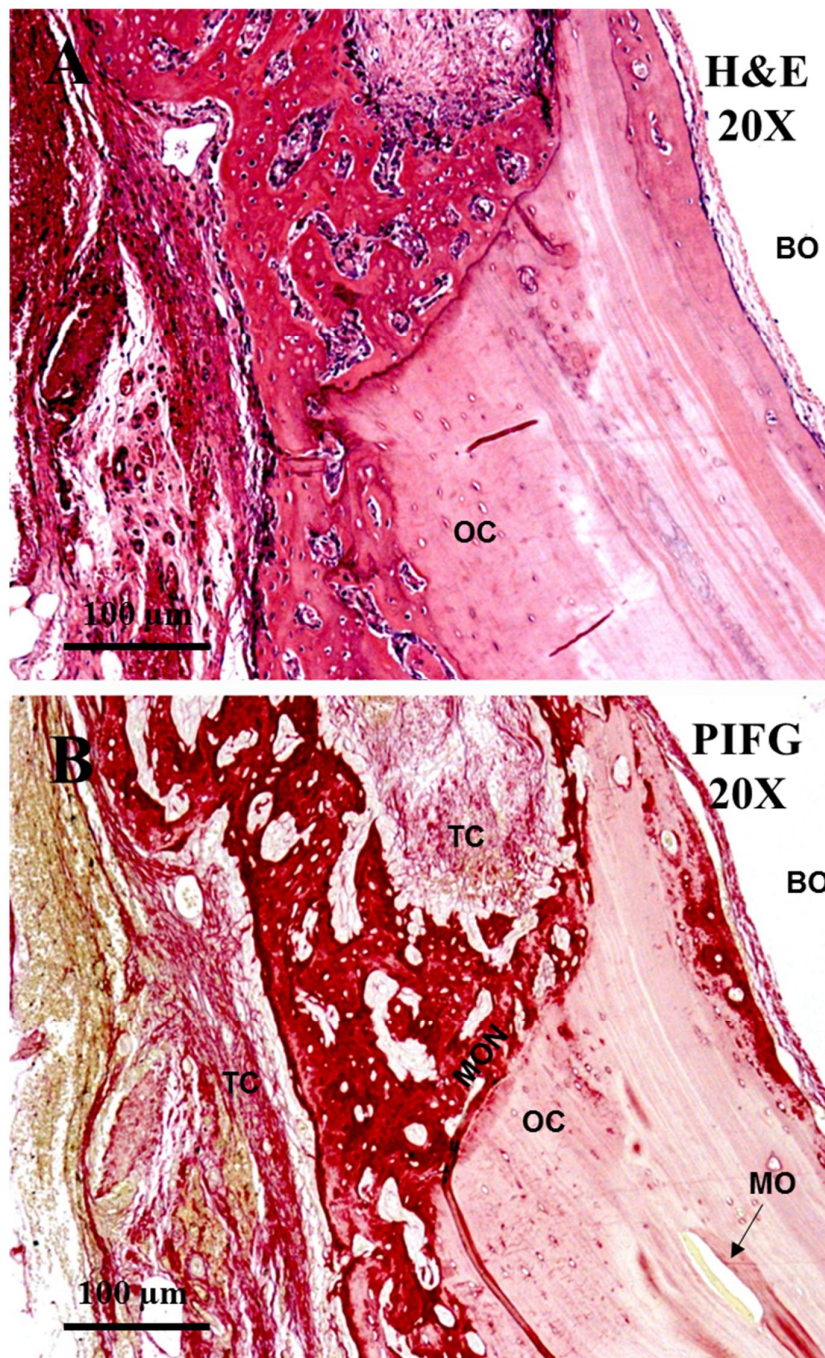
**Figura 17** – GEOV 15 dias. A – Centro do defeito: veia central (VC); células fusiformes (CF). Coloração: H&E.  
B – tecido conjuntivo: vasos sanguíneos (VS), células inflamatórias. Coloração: Tricrômico Masson Goldner (TMG).





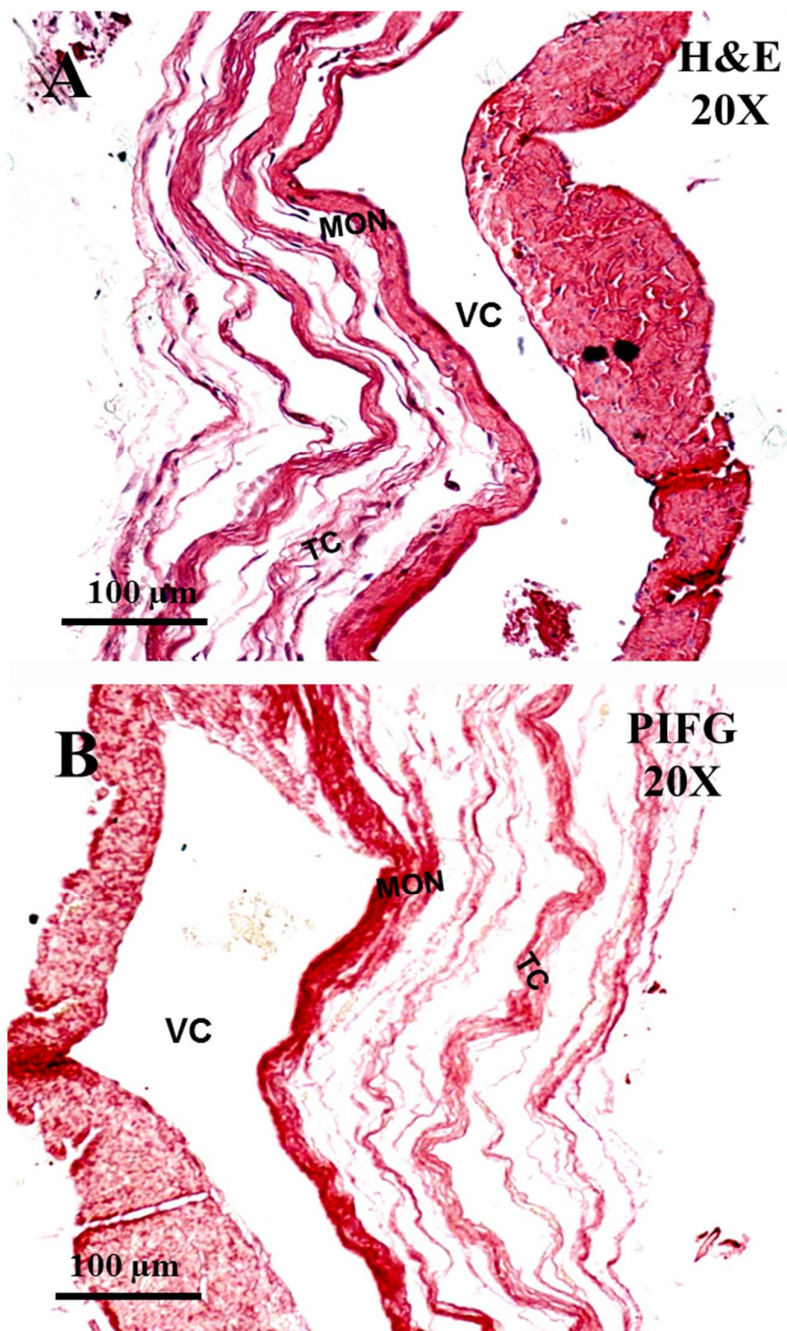
**Borda GEOV 15d**

**Figura 18** – GEOV 15 dias. A e B – Borda óssea (BO) e matriz osteoide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próxima à borda óssea: tecido conjuntivo (TC) com presença de vaso sanguíneo (VS); medula óssea (MO) no osso remanescente. Colorações: H&E e PIFG respectivamente.



**Centro GEOV 45d**

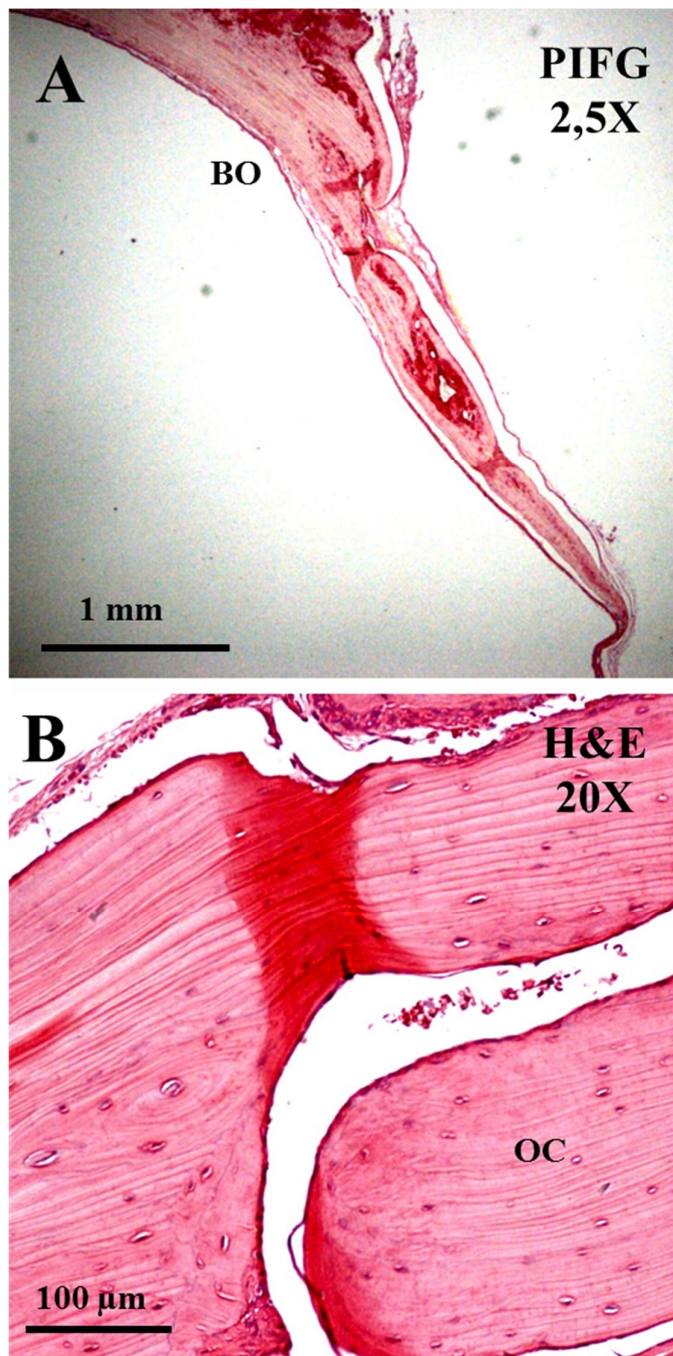
**Figura 19** – GEOV 45 dias. A e B – Centro do defeito: veia central (VC) com presença de sangue na luz; matriz osteoide neoformada (MON); fibroblastos e tecido conjuntivo (TC). Colorações: H&E e PIFG, respectivamente.





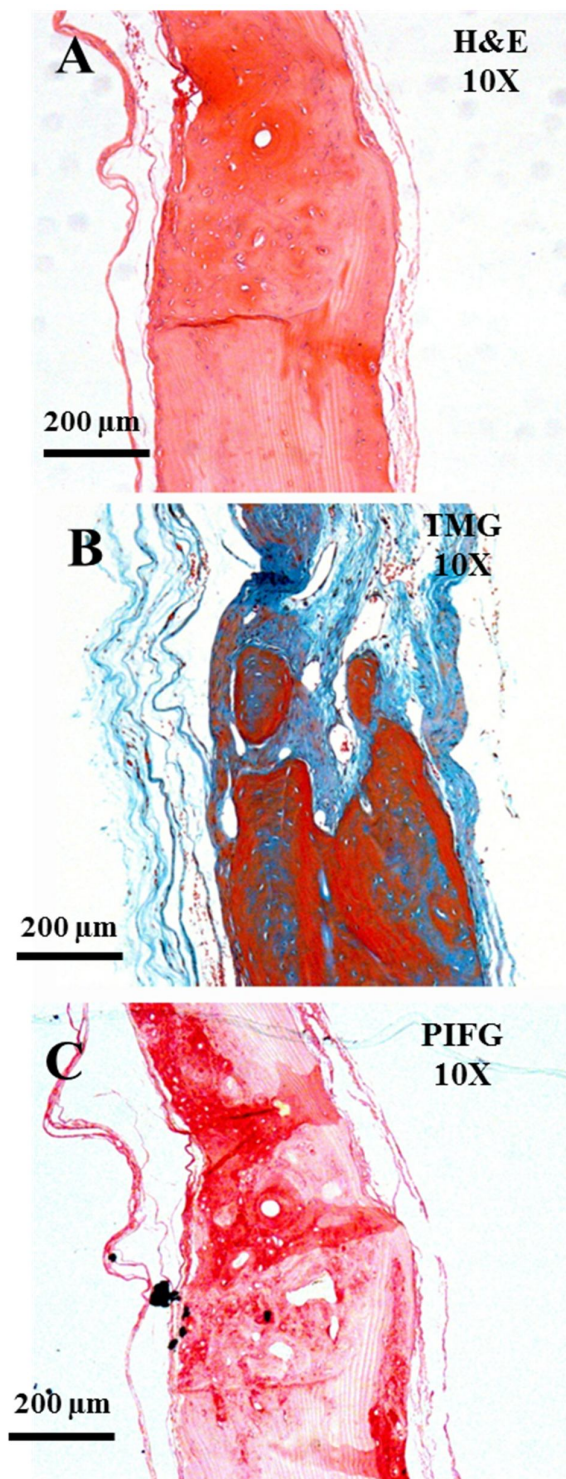
**Borda GEOV 45d**

**Figura 20** – GEOV 45 dias. A e B – Borda óssea (BO): matriz osteoide neoformada (MON) em toda extensão linear do defeito com maior espessura proximal a BO; osteócito (OC) e lamelas concêntricas no osso remanescente. Colorações: PIFG e H&E, respectivamente.



**Borda GEOV 120d**

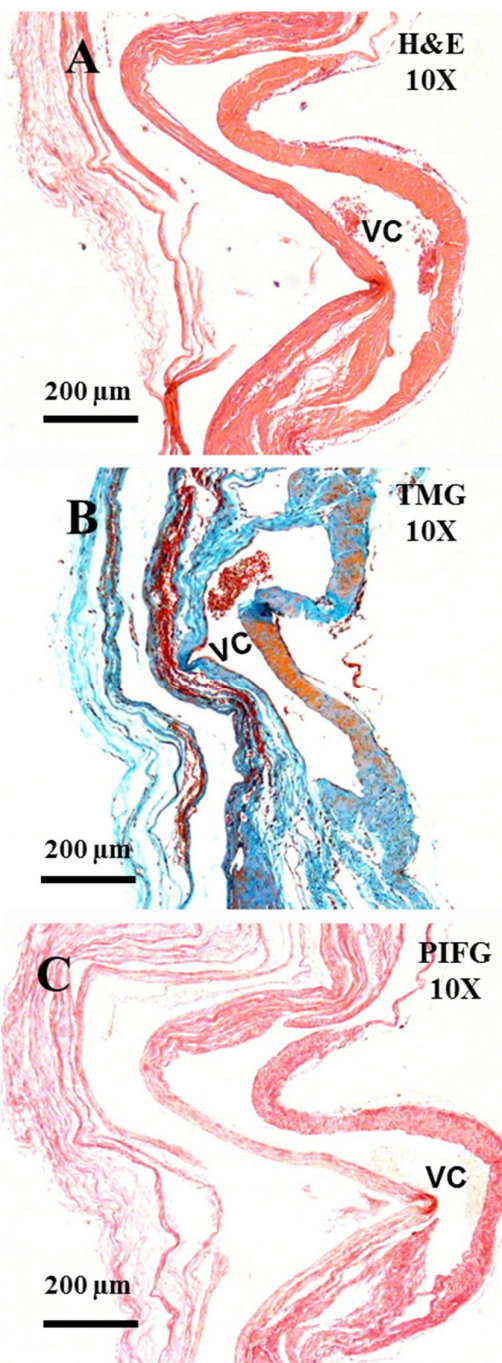
**Figura 21** – GEOV 120dias. A, B e C – Borda óssea (BO): matriz osteoide neoformada (MON) em toda extensão linear do defeito com maior espessura proximal a BO em direção centrípeta. Manutenção de VS com sangue na luz. Tecido conjuntivo fibroso em permeio a matriz osteoide neoformada (MON). Colorações: H&E, PIFG e TMG, respectivamente.





**Centro GEOV 120d**

**Figura 22** – GEOV 120dias. A, B e C – Centro do defeito: matriz osteoide neoformada (MON); VC com sangue na luz; tecido conjuntivo fibroso em permeio à matriz osteoide neoformada (MON); TC adjacente à dura-máter. Colorações: H&E, PIFG e TMG, respectivamente.



#### 5.1.4 Grupo experimental ranelato de estrôncio (GERE) (Figuras 23-28)

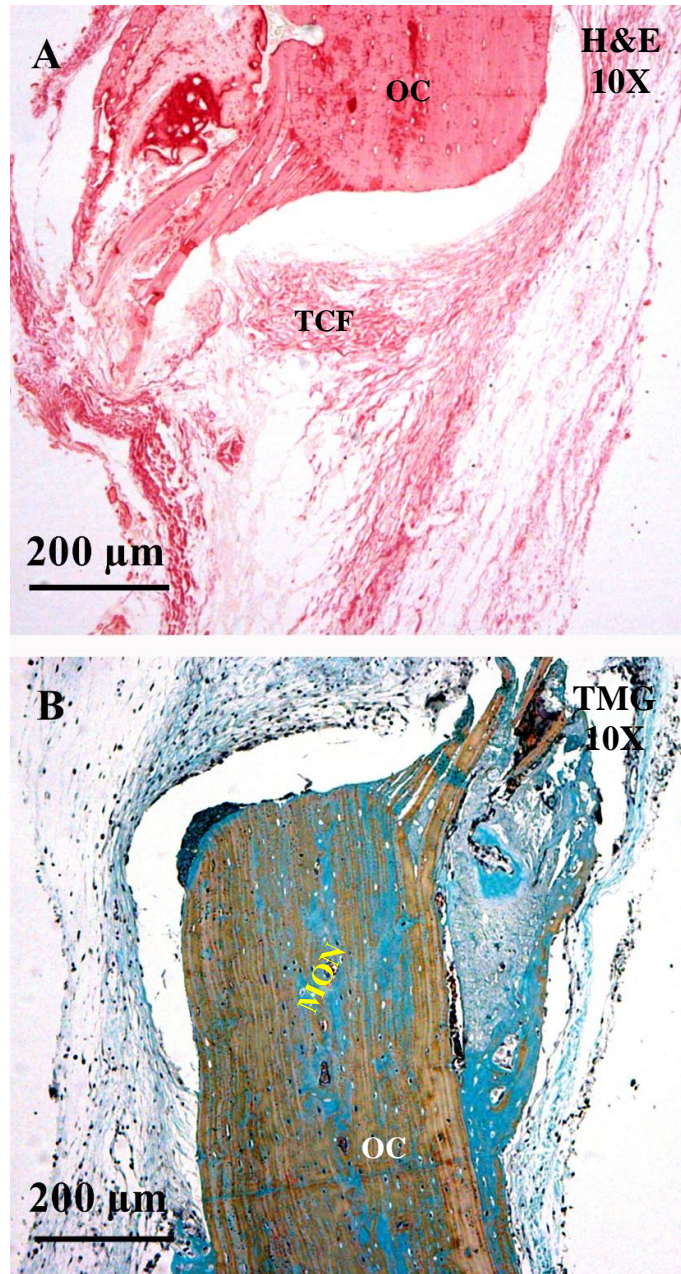
Em estudo prévio (BARRETO, 2011) e em condições similares às do presente estudo, observou-se, no GERE, a neoformação óssea reparativa de matriz osteoide, identificada nos pontos biológicos de 15, 45 e 120 dias. Entretanto, ela se manteve proximal às bordas ósseas do defeito<sup>2</sup>. Em regiões mais centrais do defeito, verificou-se que houve também neoformação de matriz osteoide. Essa ocupação da área reparada por matriz osteoide foi muito restrita. O tecido conjuntivo fibroso foi identificado, e suas fibras colagênicas mantiveram-se em um padrão mais ordenado. Foi evidenciada a presença de discretos e poucos septos fibrosos. Células fusiformes com aspectos de plena atividade foram identificadas. As características de inflamação foram notadas, tais como a presença de edema em áreas proximais ao retalho do defeito. Próximo a essas zonas, foi observado tecido conjuntivo frouxo. As fibras colágenas que preenchiam tais zonas se mantinham afastadas e desordenadas. A formação de novos vasos foi discreta. Essa neoformação foi caracterizada pela evidência de endoteliócitos no interior dos vasos. Aos 45 e 120 dias, notou-se uma diminuição da ação dos osteoblastos. O tecido conjuntivo denso apresentou-se mais estruturado e com suas fibras colágenas organizadas na direção linear do defeito. Os fibroblastos apresentaram, nesses pontos biológicos, uma organização em paralelo e a manutenção do seu padrão fusiforme. Não houve aumento na neoformação de vasos sanguíneos, mas a manutenção daqueles formados aos 15 dias. Houve uma diminuição contínua e progressiva nos pontos biológicos de 45 e 120 dias do infiltrado inflamatório mononuclear difuso.

---

2 Adaptado de Barreto et al. (2011).

**GERE 15D Borda**

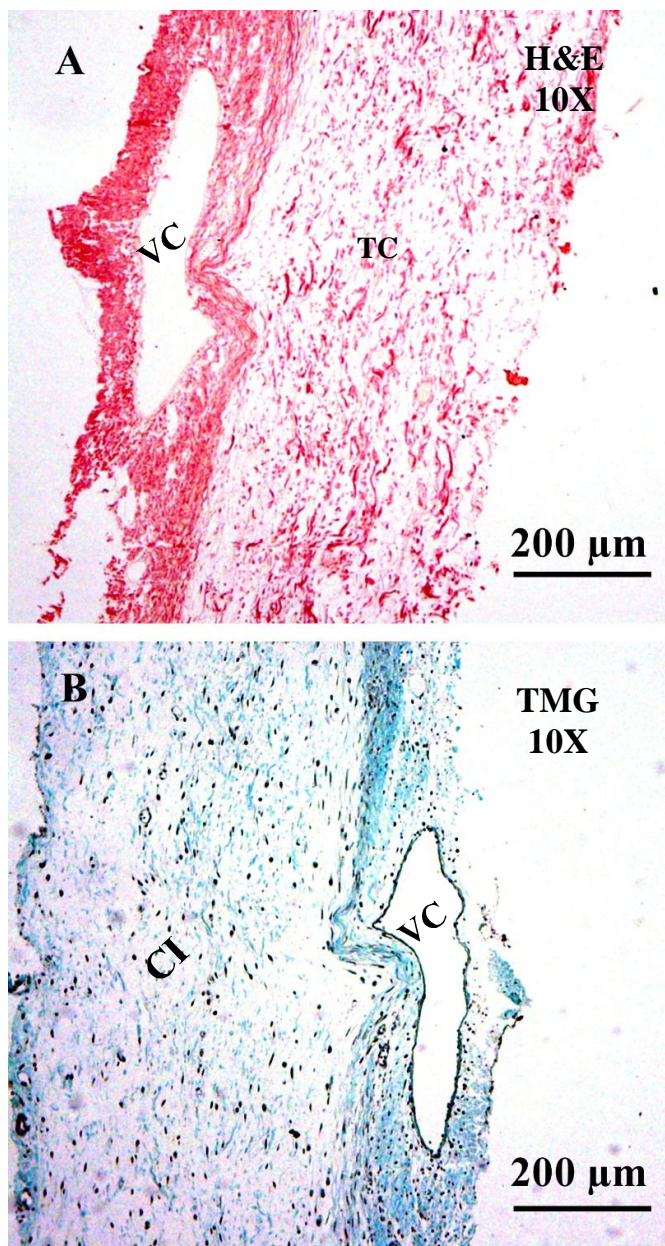
**Figura 23** – GERE 15 dias, A e B – Borda óssea (BO): matriz osteoide neoformada (MON) restrita a BO; osteócito no osso remanescente. Colorações: H&E, TMG, respectivamente.





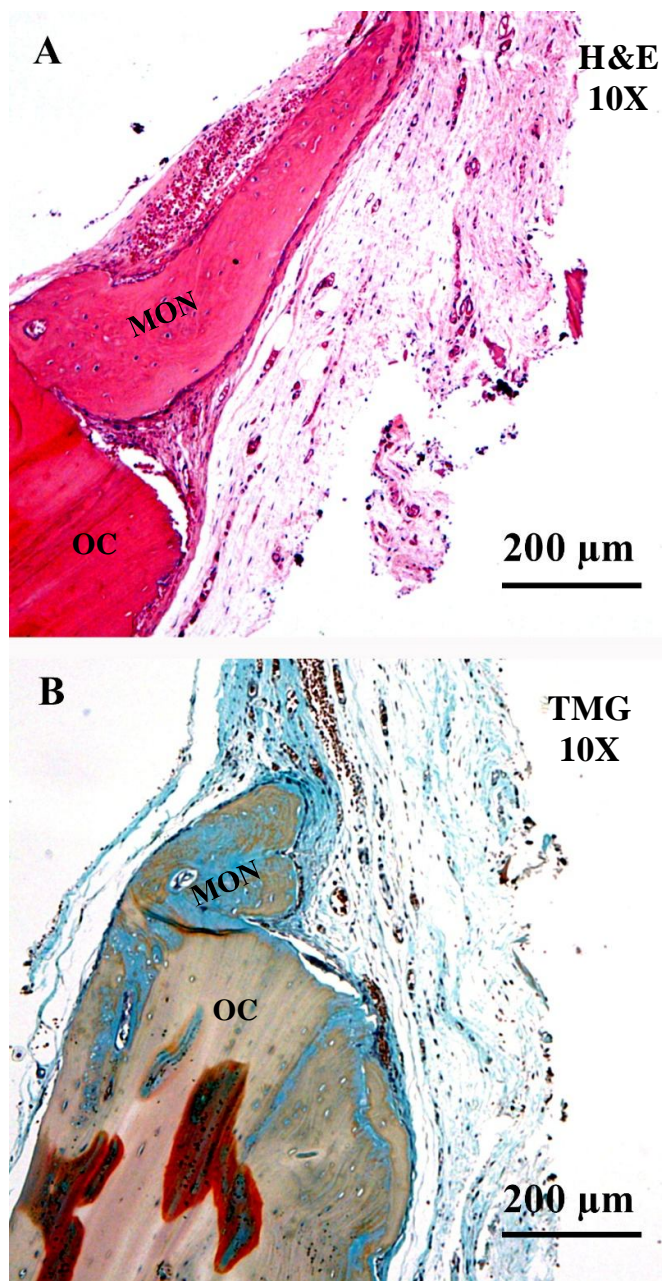
**GERE 15 D Centro**

**Figura 24** – GERE 15 dias. A e B – Centro do defeito: veia central (VC); células inflamatórias e tecido conjuntivo desorganizado. Colorações: H&E, TMG, respectivamente.



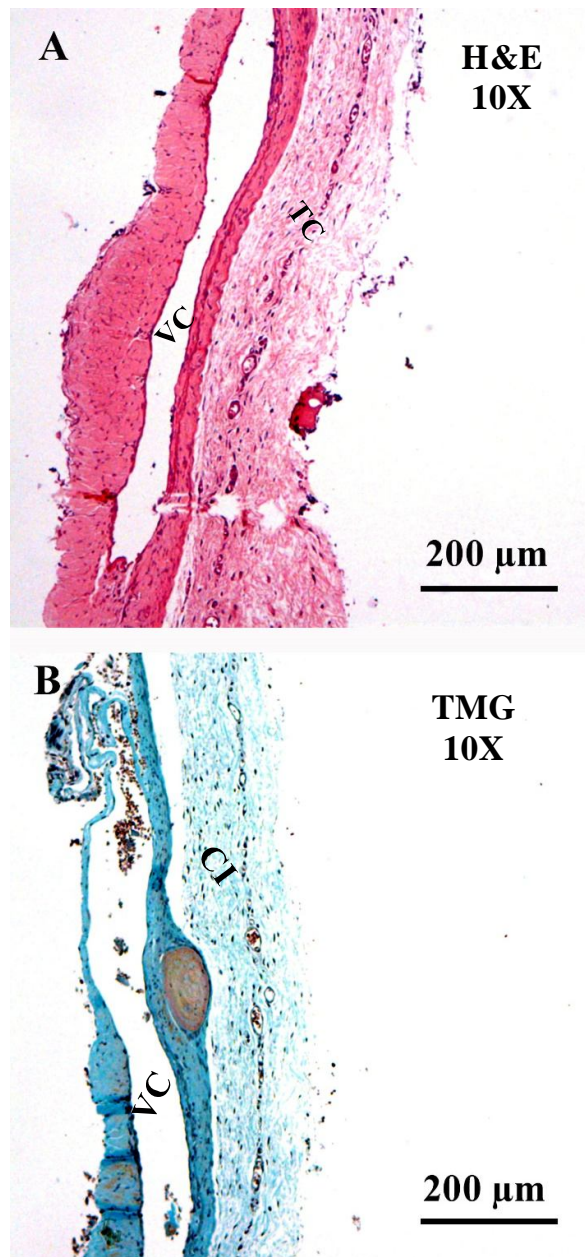
**GERE 45 D Borda**

**Figura 25** – GERE 45 dias. A e B – Borda óssea (BO); matriz osteoide neoformada (MON) restrita a BO; TCF de permeio a MON; osteócito no osso remanescente; tecido conjuntivo desorganizado. Colorações: H&E, TMG, respectivamente.



**GERE 45 D Centro**

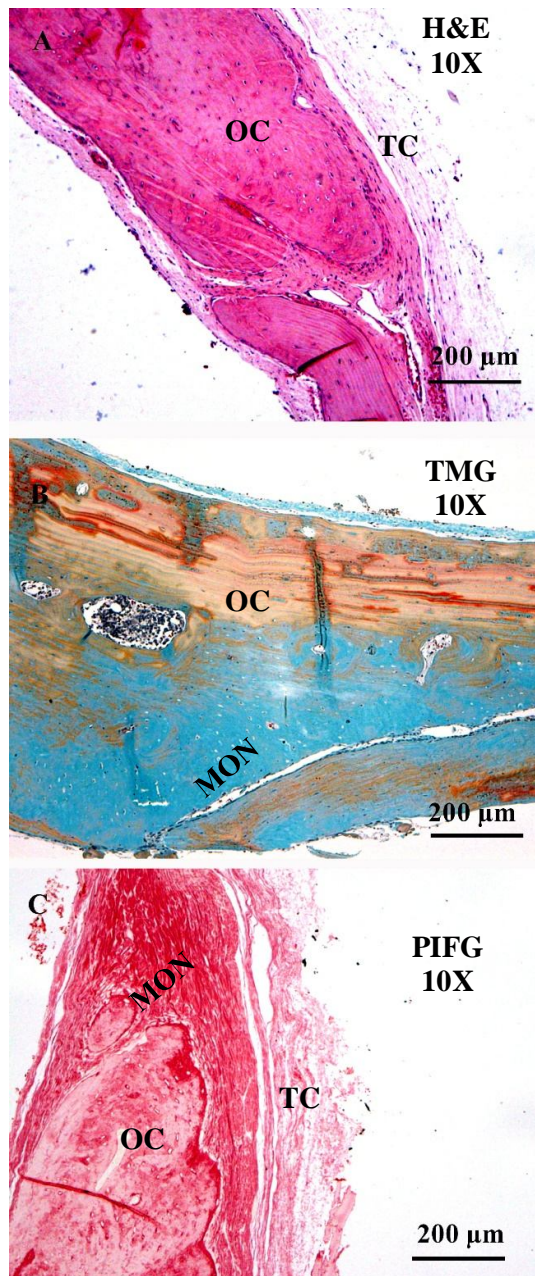
**Figura 26** – GERE 45 dias. A e B – Centro do defeito: veia central (VC); tecido conjuntivo desorganizado; células inflamatórias. Colorações: H&E, TMG, respectivamente.





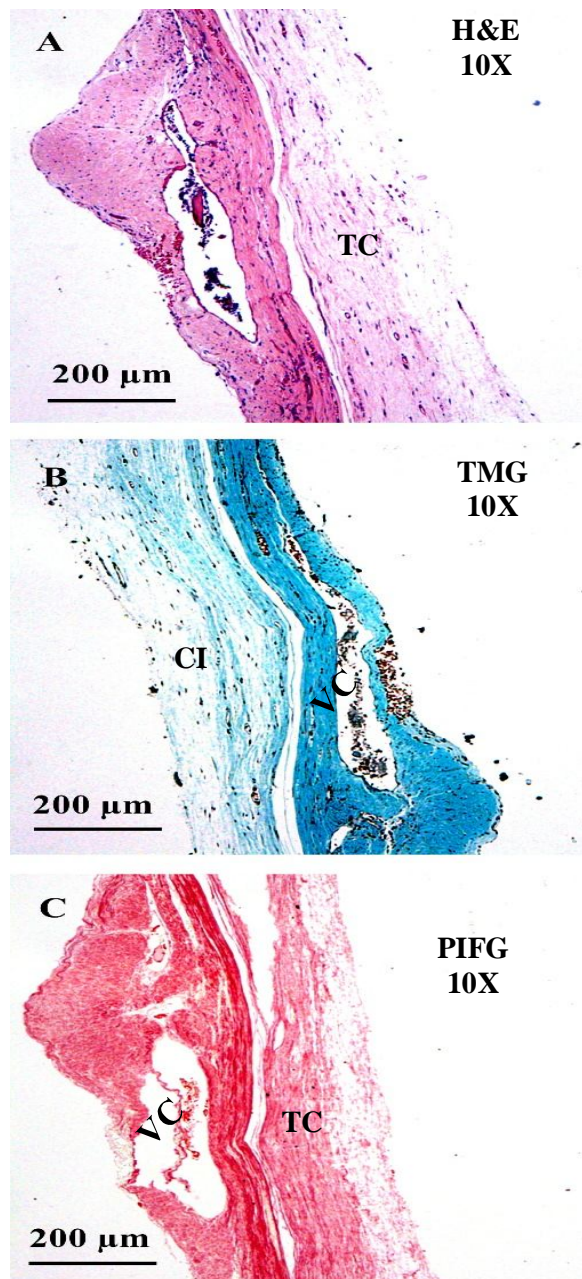
**GERE 120 D Borda**

**Figura 27** – GERE 120 dias. A e B – Borda óssea (BO): matriz osteoide neoformada (MON) restrita a BO e espessura diminuída; osteócito. Colorações: H&E, TMG e PIFG, respectivamente.



**GERE 120 D Centro**

**Figura 28** – GERE 120 dias. A, B e C – Centro do defeito (BO): veia central (VC) com sangue na luz no centro do defeito; células inflamatórias e tecido conjuntivo desorganizado. Colorações: H&E, TMG, PIFG, respectivamente.





### 5.1.5 Grupo experimental ondas vibratórias e ranelato de estrôncio (GEOVRE) (Figuras 29-32)

Nas bordas do defeito, aos 15 dias, deste grupo experimental, foram observadas características morfológicas compatíveis com uma reação inflamatória maior. Além de neoformação reparativa reacional, a neoformação da matriz osteoide estava distribuída centripetamente e com indícios mínimos de moderada inflamação crônica mononuclear. Nesse mesmo ponto biológico, notou-se discreto edema. No centro do defeito, identificaram-se áreas de hemorragia antiga. Foi observada também uma quantidade de neoformação vascular.

Aos 45 dias, em toda a extensão do defeito, foi observada a produção de matriz osteoide. É importante salientar que houve uma ocupação da matriz osteoide entre 60 a 90% da extensão de todo o defeito, mas o reparo apresentou uma espessura muitíssimo delgada, resultado muito aquém do tecido ósseo remanescente.

Nas bordas do defeito, aos 120 dias desse grupo experimental, foram observadas características morfológicas muito similares às identificados e descritas anteriormente no ponto biológico de 45 dias. Portanto, não houve progressão para o fechamento completo do defeito ósseo crítico.

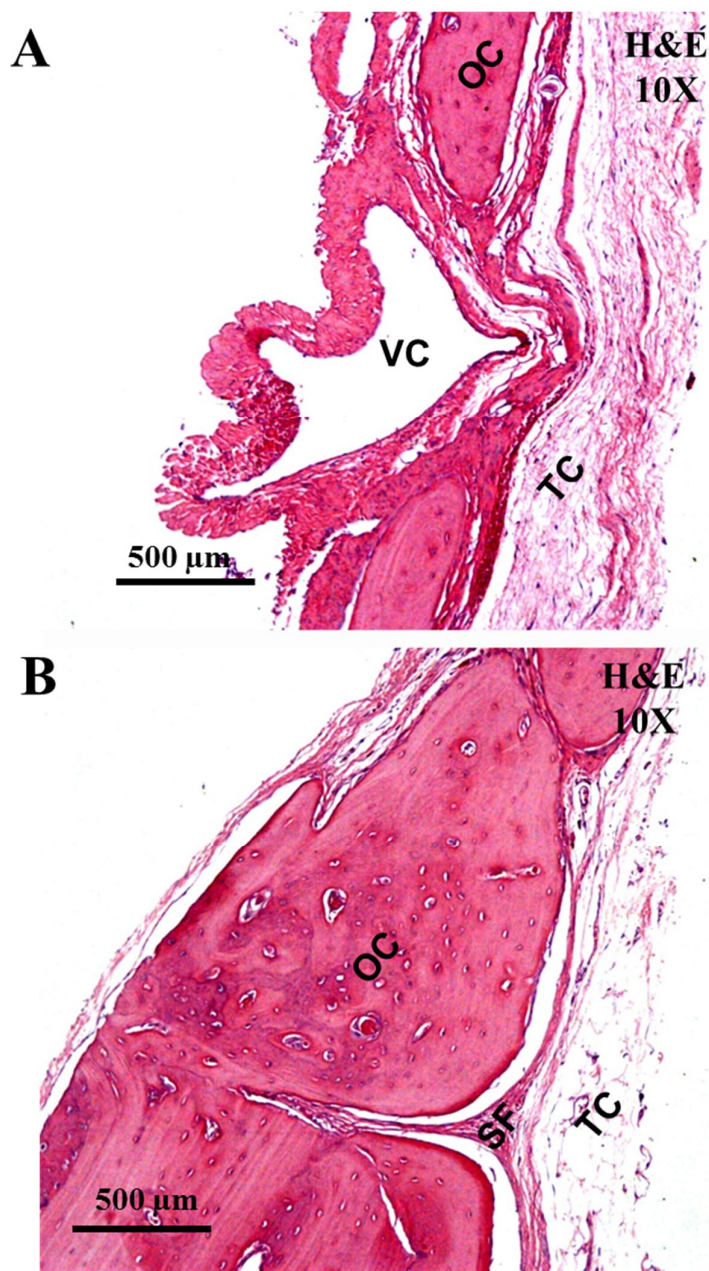
### Centro e Borda GEOVRE 15d

**Figura 29** – GEOVRE 15 dias. A e B – Centro do defeito e borda óssea (BO): veia central (VC) com sangue na luz no centro do defeito; matriz osteoide neoformada (MON) restrita a BO; TCF de permeio a MON; osteócito no osso remanescente; células inflamatórias e tecido conjuntivo desorganizado. Coloração: H&E.



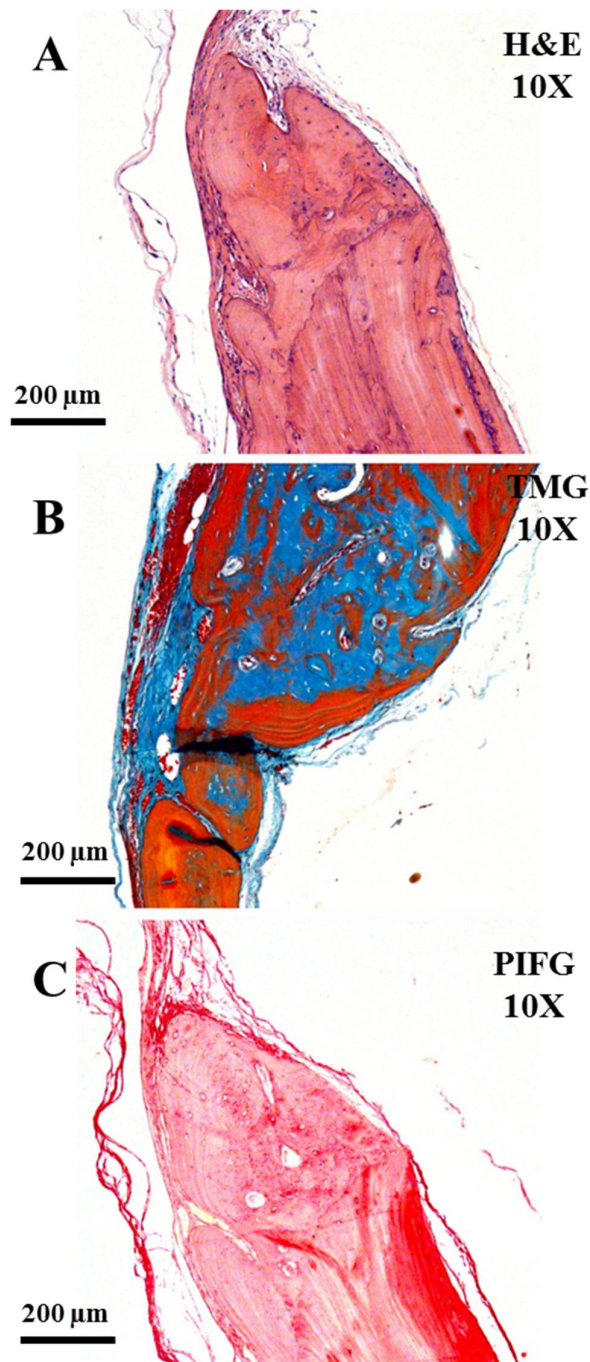
### Centro e Borda GEVRE 45d

**Figura 30** – GEVRE 45 dias. A e B – Centro do defeito e borda óssea (BO): matriz osteoide neoformada (MON) ocupando toda a extensão linear do defeito em direção centrípeta, espessura diminuída; TCF de permeio a MON; TC adjacente ao retalho; septo fibroso proximal a BO; osteócito no osso remanescente e no tecido ósseo mineralizado; poucas células inflamatórias e tecido conjuntivo desorganizado. Coloração: H&E.



**Borda GEOVRE 120d**

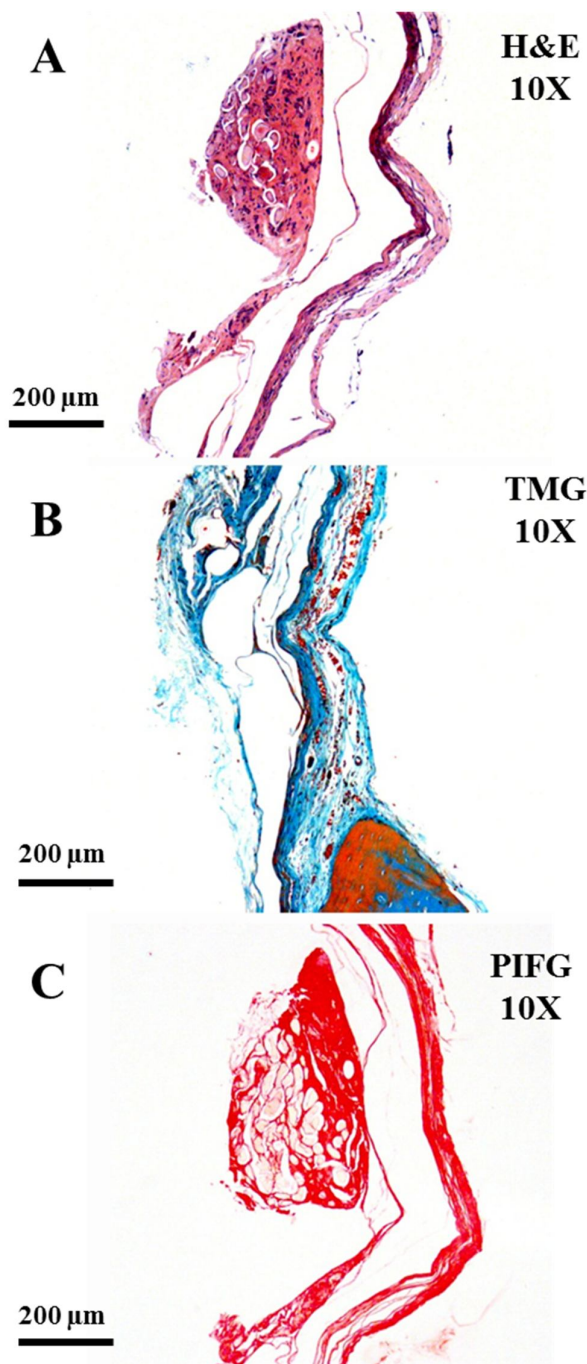
**Figura 31** – GEOVRE 45 dias. A, B e C – Borda óssea (BO): matriz osteoide neoformada (MON) ocupando toda a extensão linear do defeito em direção centrípeta, espessura diminuída; TC adjacente ao retalho; osteócito no osso remanescente. Colorações: H&E, TMG e PIFG, respectivamente.





**Centro GEOVRE 120d**

**Figura 32** – GEOVRE 45 dias. A, B e C – Centro do defeito: matriz osteoide neoformada (MON) em toda a extensão linear do defeito, espessura muito diminuída; TCF adjacente ao retalho. Colorações: H&E, TMG e PIFG, respectivamente.



### 5.1.6 Grupo experimental ondas vibratórias e hidroxiapatita alginato (GEOVHA) (Figuras 33-42)

Nas bordas do defeito, aos 15 dias, foram observadas características morfológicas parecidas com as identificadas no GEHARE, em comparação à formação óssea reparativa reacional, a qual permaneceu mais restrita às bordas e com a presença de osteoblastos ativos. Padrão basofílico. Notou-se o defeito completamente ocupado pelo biomaterial. Aos 15 dias, identificou-se também que as microesferas de hidroxiapatita de cálcio e alginato foram observadas acumuladas no centro do defeito, em várias camadas. Tecido conjuntivo frouxo foi observado aos 15 dias, próximo à região central, quando foi observada a presença de biomateriais permeados por esse mesmo tecido. Nesse local, as fibras colágenas apresentavam-se com orientações do TCD diversas. A presença de infiltrado inflamatório mononuclear distribuído de forma difusa no interstício foi identificada aos 15 dias. Notou-se a proliferação de células endoteliais linfocitárias e macrófagos espumosos em atividade fagocitária. Foi observado que algumas áreas do defeito se apresentavam com um aspecto de um estroma frouxo, que se caracteriza pela presença de discreto edema. A intensa formação neovascular e a proliferação de células fusiformes foram observadas. O estroma, antes muito mais frouxo, aos 15 dias encontra-se mais adensado, com média ocupação e presença de células fusiformes. Aos 15 dias, não foi notada intensa migração celular para o interior do biomaterial, havendo a formação de finas camadas concêntricas em torno das microesferas. Notou-se a presença de septos fibrosos de permeio entre o material particulado. Cada microesfera apresentava-se como um componente particulado não homogêneo, mas parcialmente fragmentado, pouco íntegro. Algumas vezes, o aspecto basofílico, foi observado em função da manutenção do formato de microesferas. Com muita frequência, foi observado o deslocamento do biomaterial encapsulado. Observou-se ainda reação granulomatosa com células gigantes multinucleadas. Exsudato fibrinolítico leucocitário em alguns casos caracterizou áreas de abscesso e substância purulenta.

A neoformação óssea, aos 45 dias, também se ampliou para as extremidades do defeito, sendo muito mais observada nas bordas do que na região central. A intensidade foi menor na proximidade da veia central. As bordas ósseas demonstraram-se estáveis, observando-se mais formação óssea. O osso neoformado apresentava, nesse ponto biológico, característica de osso lamelar. Aos 45 dias, a matriz osteoide circundou toda a extensão e a profundidade do defeito. Dentre as células mesenquimais, notaram-se muitos macrófagos de aspecto espumoso. Nessas áreas, foram observados fragmentos do biomaterial particulado,

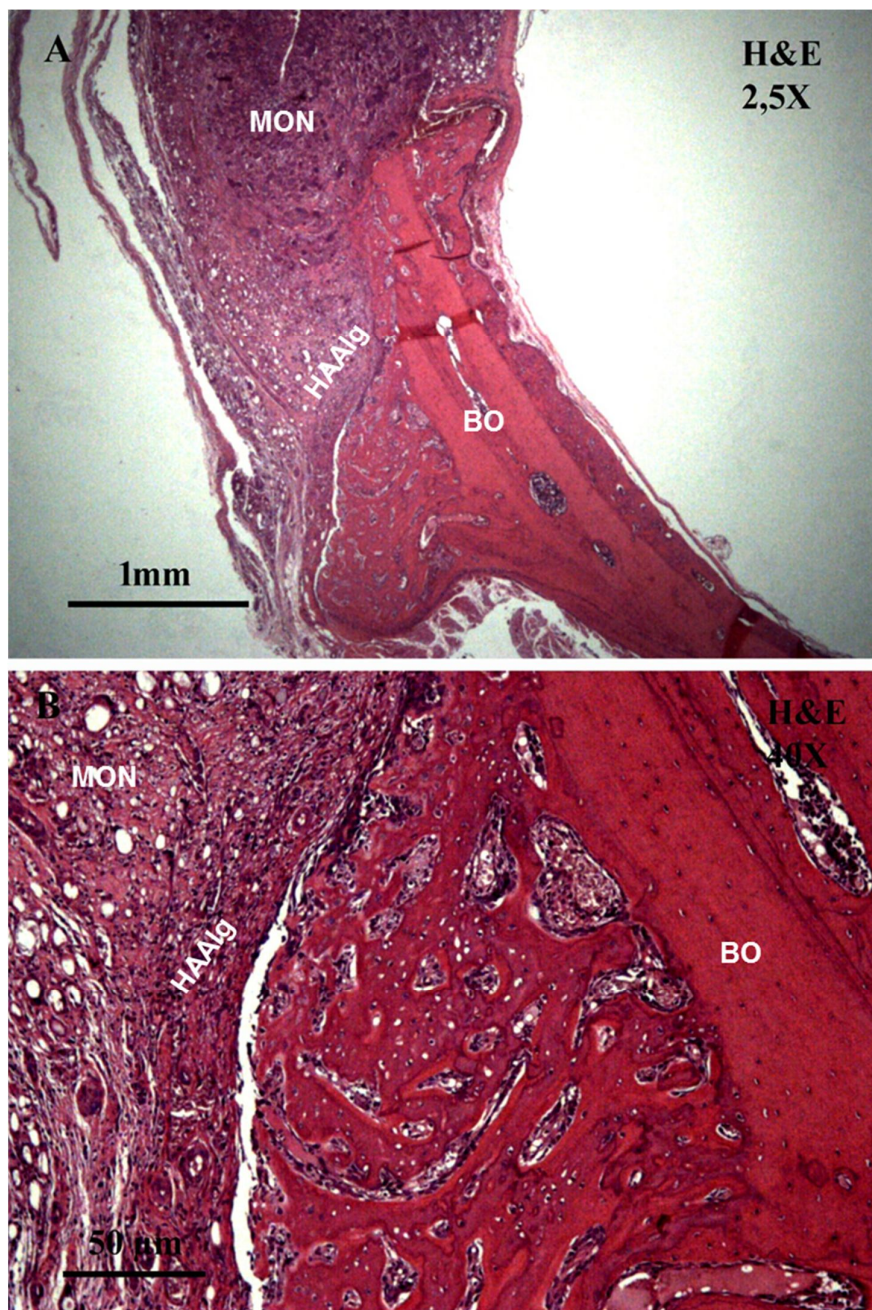
compatível com sua catabolização. Identificou-se a presença de macrófagos isolados e agrupados, que formavam a reação granulomatosa. Nesse mesmo ponto biológico, foi notada grande quantidade de capilares. Aos 45 dias, o processo inflamatório permaneceu acentuado, com grande formação de capilares em toda a extensão do defeito e denso infiltrado mononuclear. Aos 45 dias, notou-se mais evidente a presença de fibras colágenas concêntricas, e observou-se a formação de uma cápsula em torno do biomaterial, em maior número de camadas e com padrão de espessura maior do que a observada aos 15 dias. Os septos fibrosos mais espessos foram identificados.

Osso recém-formado foi observado nos pontos biológicos de 45 e 120 dias (esse último descrito a seguir), com evidências da presença de osteócitos. Nesses pontos biológicos, o defeito se encontrava todo preenchido com as microesferas de hidroxiapatita, e foi notada a neoformação óssea reparativa nas margens do defeito, que se estendia à região central, onde se observou a presença de osteoblastos e osteócitos.

Aos 120 dias, observou-se uma redução do edema, resultando na formação de um estroma mais denso e celuloso, com muitos espaços capilares luminares sem, no entanto, haver formação de novos vasos. Uma redução do espaço entre as microesferas foi identificada e atribuída à diminuição do edema. Uma reação granulomatosa, constituída por macrófagos e poucas células gigantes multinucleadas, foi notada, circunscrita ao contorno das microesferas. O tecido conjuntivo frouxo e o tecido conjuntivo denso foram identificados na periferia e no centro, respectivamente. Foi identificada a formação de matriz osteoide que não permite a constituição de fibrose. Uma fina fibrose foi precedida de uma reação granulomatosa. Puderam ser observadas algumas áreas de intensa hemorragia e pontos de abscessos. Aos 120 dias, observou-se uma diminuição no processo inflamatório, com reação granulomatosa em menor evidência. Na periferia, observaram-se delgados septos fibrosos com direção centrípeta e a presença de células fusiformes de permeio às partículas fragmentadas do biomaterial. Vale ressaltar que, nesse ponto biológico, houve acentuação de alguns aspectos, tais como: fragmentação mais acentuada do biomaterial e maior produção de matriz osteoide e de tecido ósseo neoformado. Aos 120 dias, a formação capsular, com fibrose concêntrica em torno das microesferas, torna-se mais espessa, com a presença de muitas células fusiformes. A ausência de coesão entre as partículas de cada microesfera foi ainda mais evidente aos 120 dias, não somente na região periférica mas também próxima à veia central, embora, nessa última, com menor intensidade.

**Borda GEOVHA 15d**

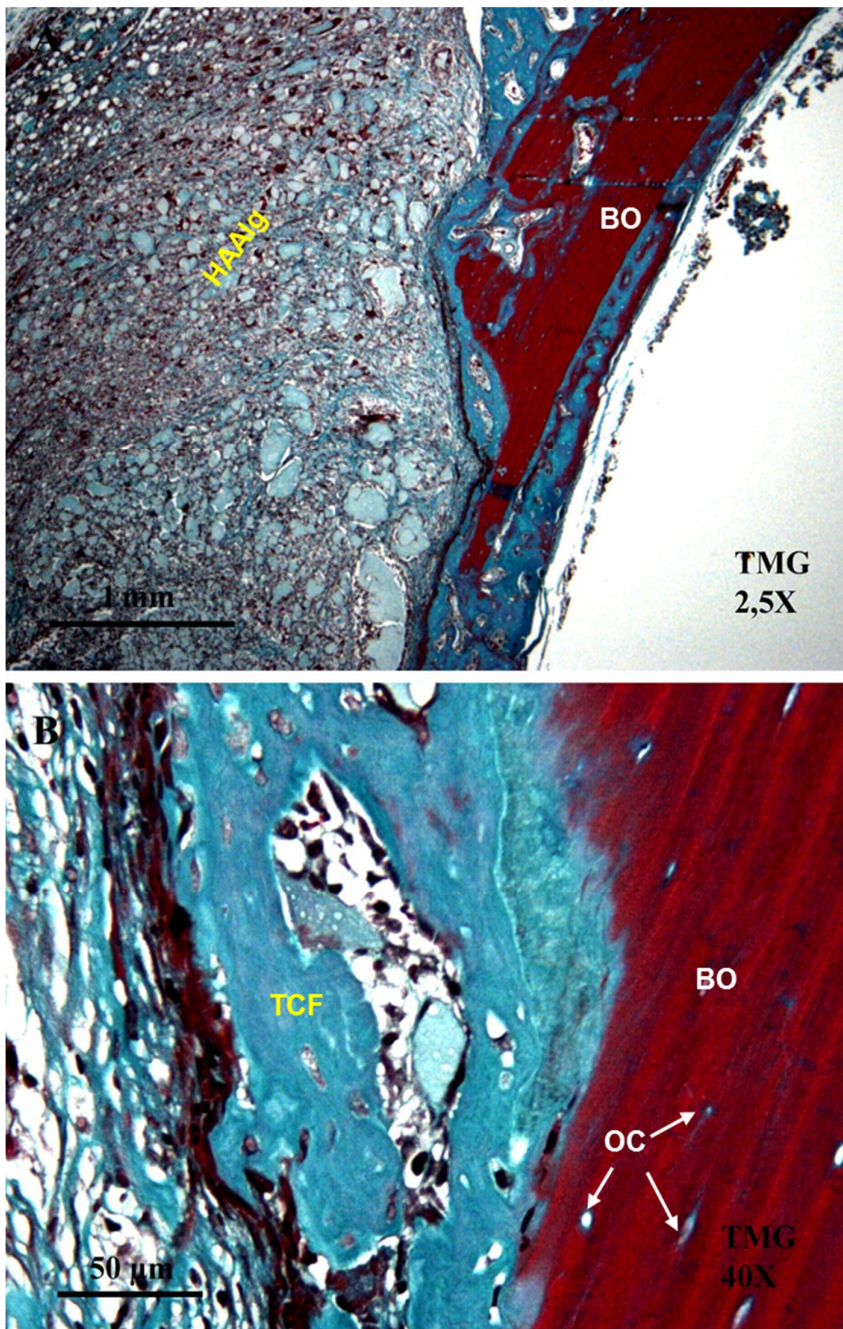
**Figura 33** – GEOVHA 15 dias. A e B – Borda óssea (BO): matriz osteoide neoformada (MON) em toda a extensão do defeito, maior espessura do reparo, proximal a BO; HAAIlg preenchendo o defeito ósseo.  
Coloração: HE.





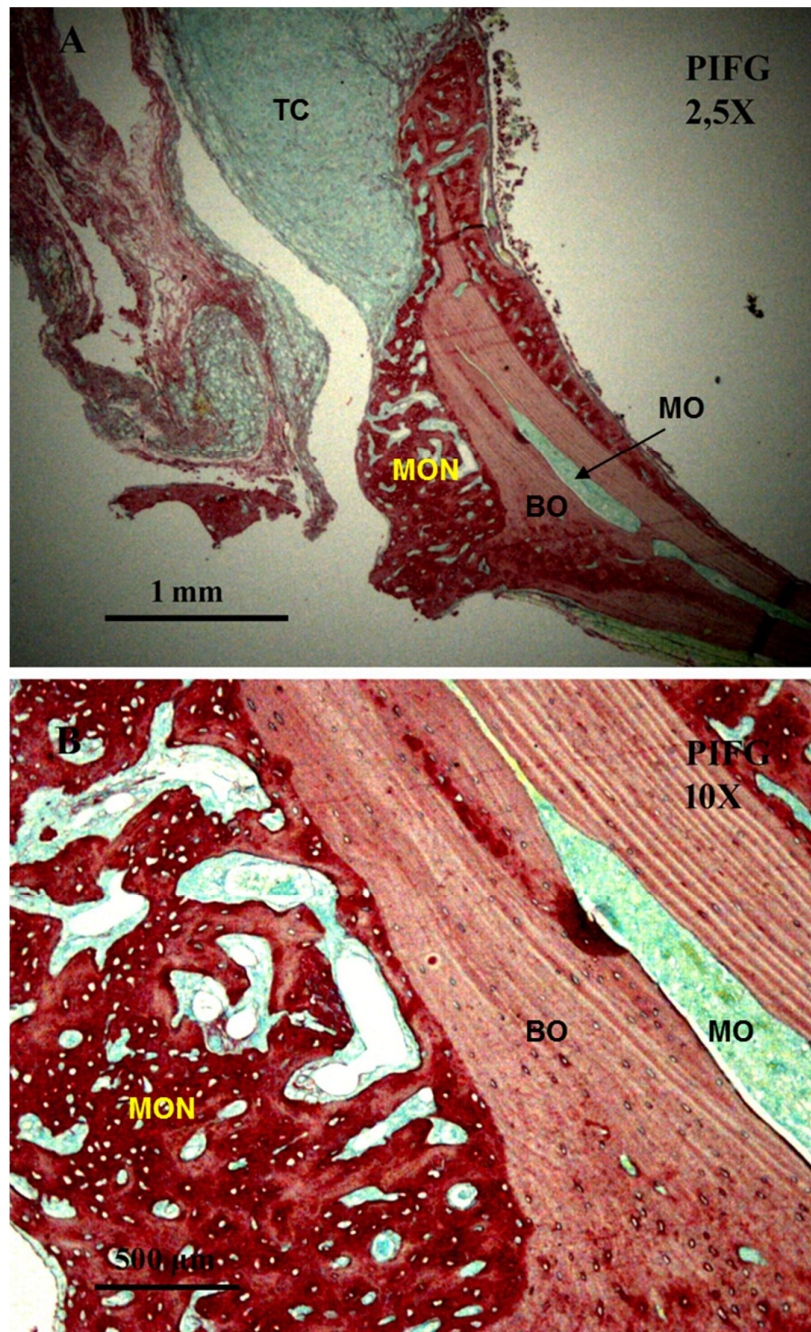
### Borda GEOVHA 15d

**Figura 34** – GEOVHA 15 dias. A e B – Borda óssea: presença de matriz osteoide neoformada (MON), proximal às bordas ósseas (BO); célula gigante (CG) e infiltrado inflamatório difuso; tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio ao biomaterial, a HAAlg (HAAlg); defeito ósseo ocupado por HAAlg. Coloração: T.M.G.



**Borda GEOVHA 15d**

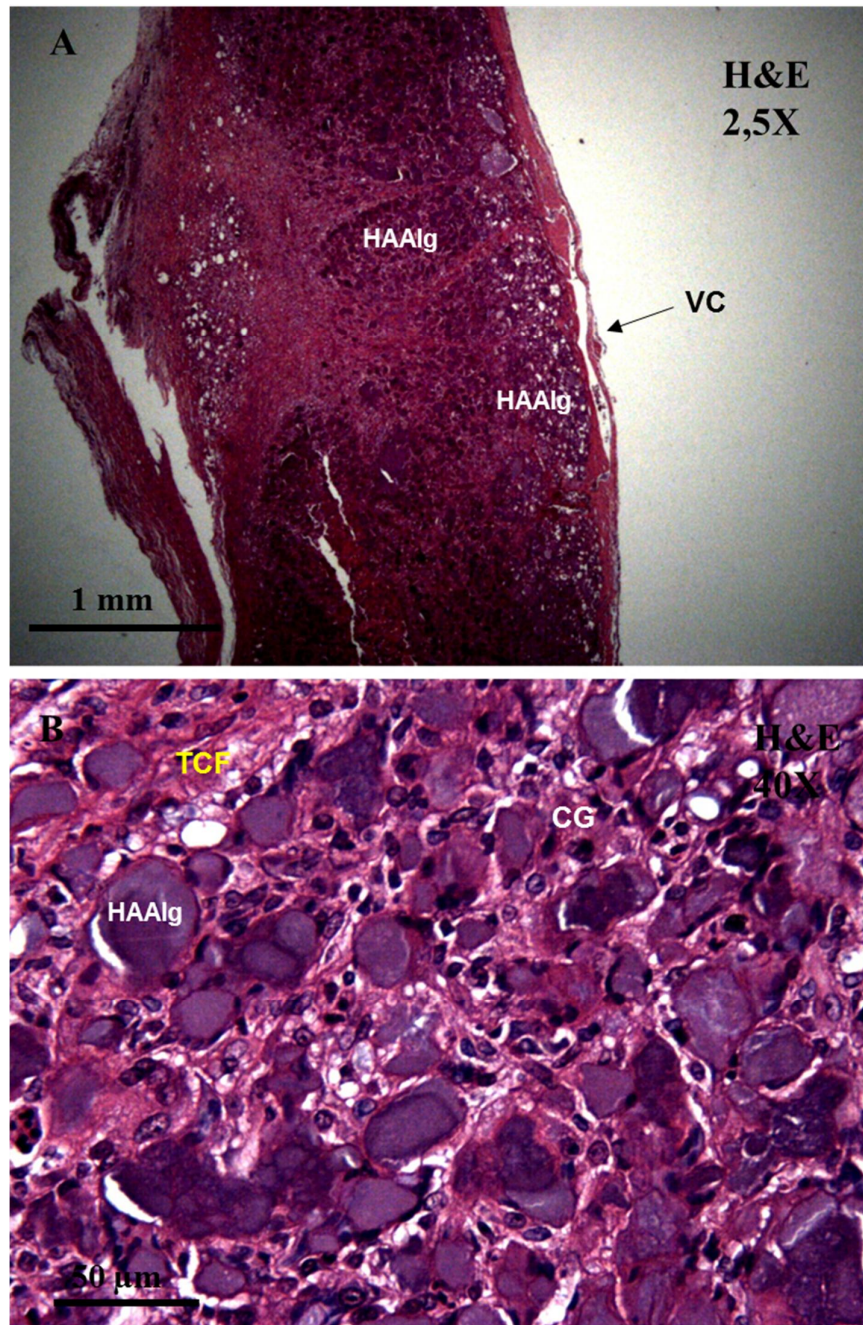
**Figura 35** – GEOVHA 15 dias. A, B e C – Borda óssea (BO): matriz osteoide neoformada (MON) reparativa, proximal a BO; tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio à HAAI<sub>g</sub> fragmentada; vasos sanguíneos (VS); TC adjacente ao retalho. Coloração: PIFG.





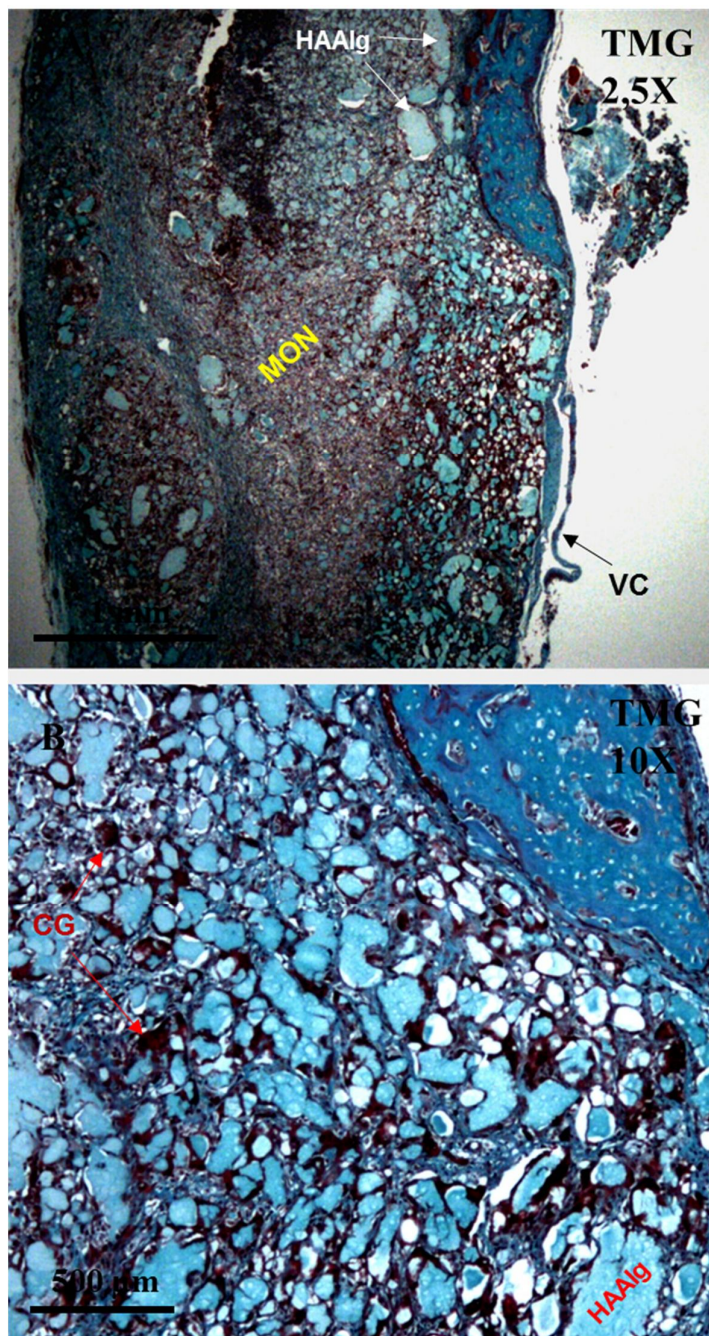
### Centro GEOVHA 15d

**Figura 36** – GEOVHA 15 dias. A e B – Centro do defeito: matriz osteoide neoformada (MON), espessura compatível em profundidade e extensão ao osso remanescente; veia central (VC); tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio à HAAIlg fragmentada; células gigantes (CG); vasos sanguíneos (VS). Coloração: HE.



**Centro GEOVHA 15d**

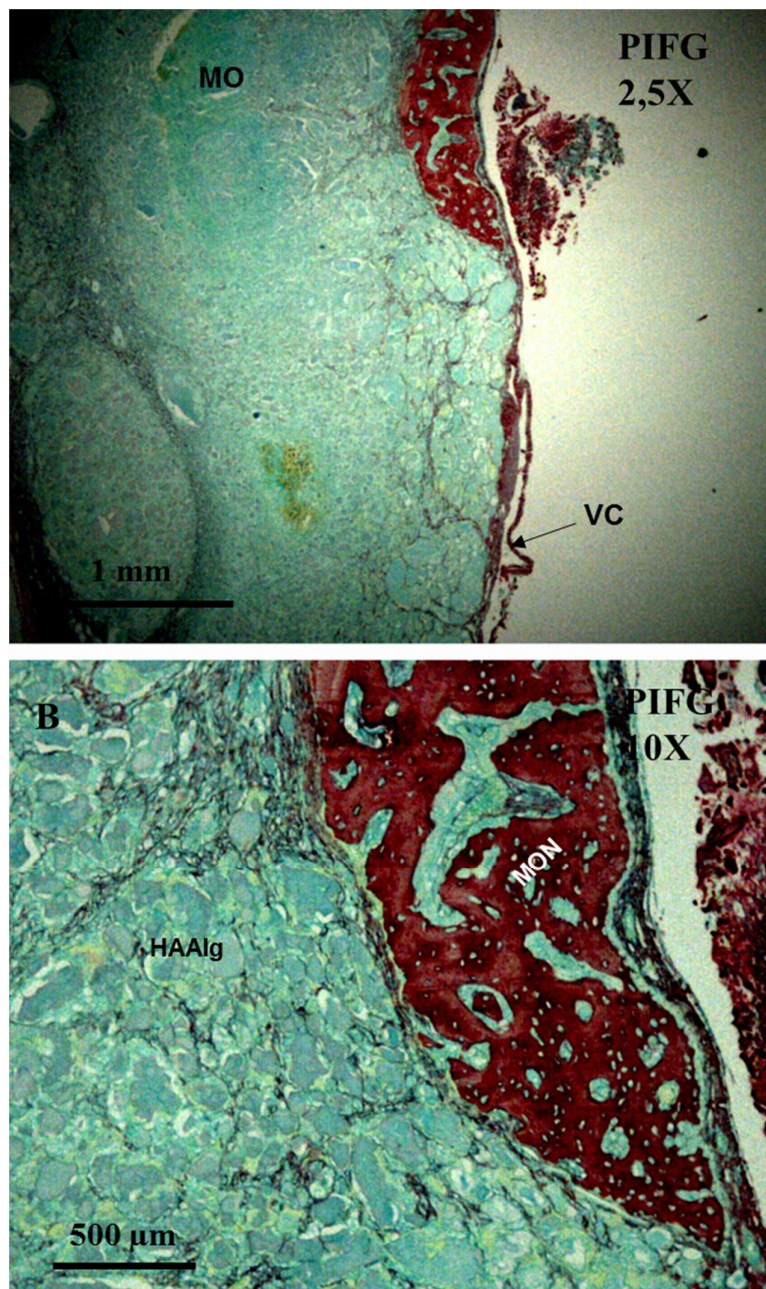
**Figura 37** – GEOVHA 15 dias. A e B – Centro do defeito: matriz osteoide neoformada (MON), espessura similar ao remanescente; tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio à HAAlg fragmentada; células gigantes (CG); células inflamatórias; vasos sanguíneos (VS). Coloração: TMG.





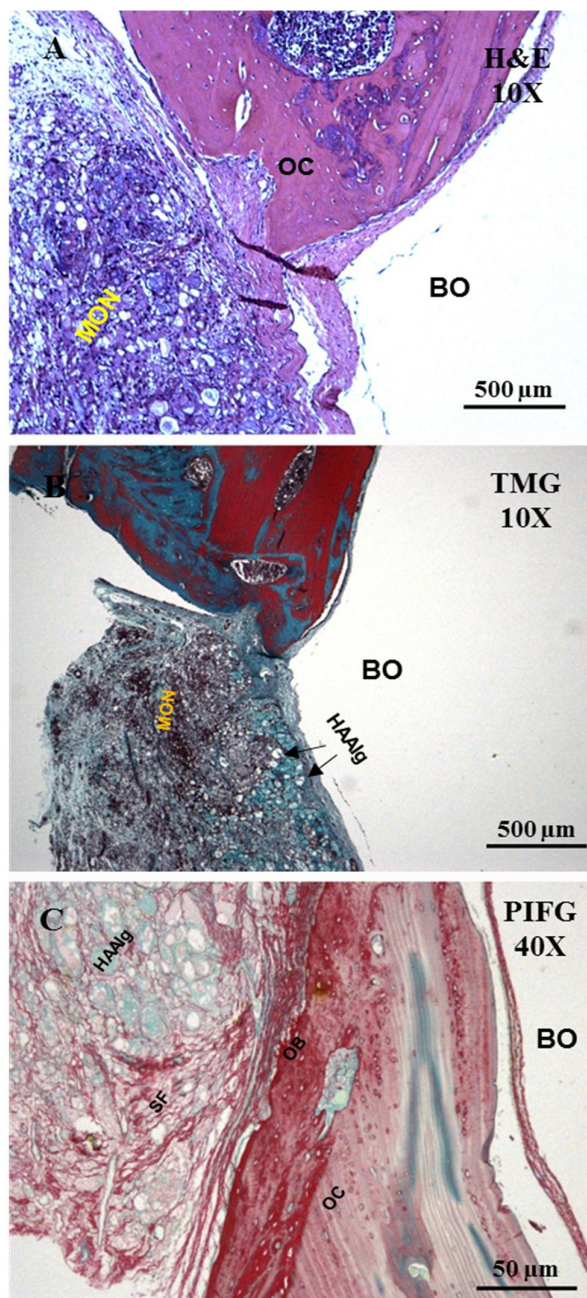
**Centro GEOVHA 15d**

**Figura 38** – GEOVHA 15 dias. A e B – Centro do defeito: veia central (VC); matriz osteoide neoformada (MON) reparativa; defeito preenchido por HAAIlg fragmentada; TCF circundando o biomaterial. Coloração: PIFG.



**Borda GEOVHA 45d**

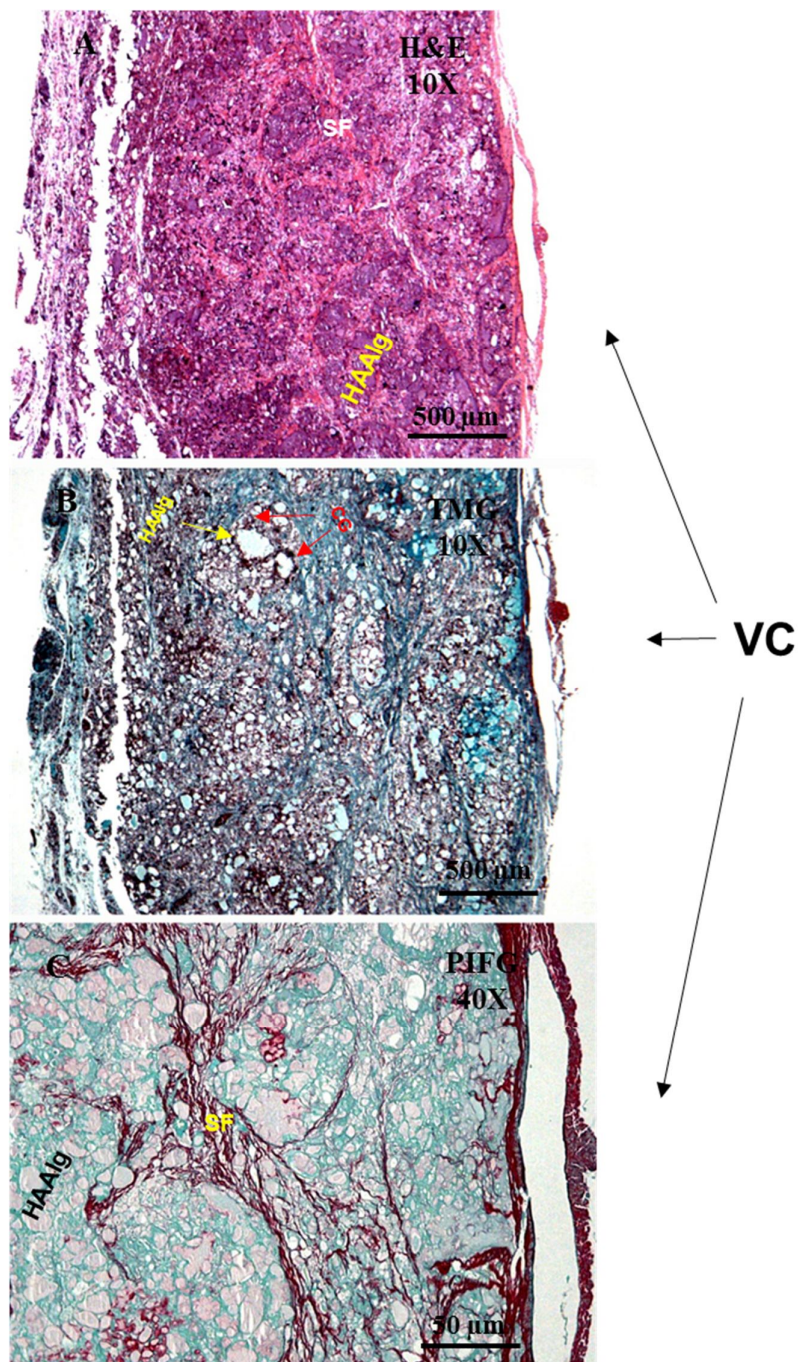
**Figura 39** – GEOVHA 45 dias. A, B e C – Borda óssea (BO): presença de matriz osteoide neoformada (MON) reacional, proximal a BO e em toda a extensão do defeito em direção centrípeta; TCF de permeio a HAALg; HAALg preenche todo o defeito ósseo; osteócitos (OC) no tecido ósseo mineralizado remanescente. Colorações: HE, PIFG e TMG, respectivamente.





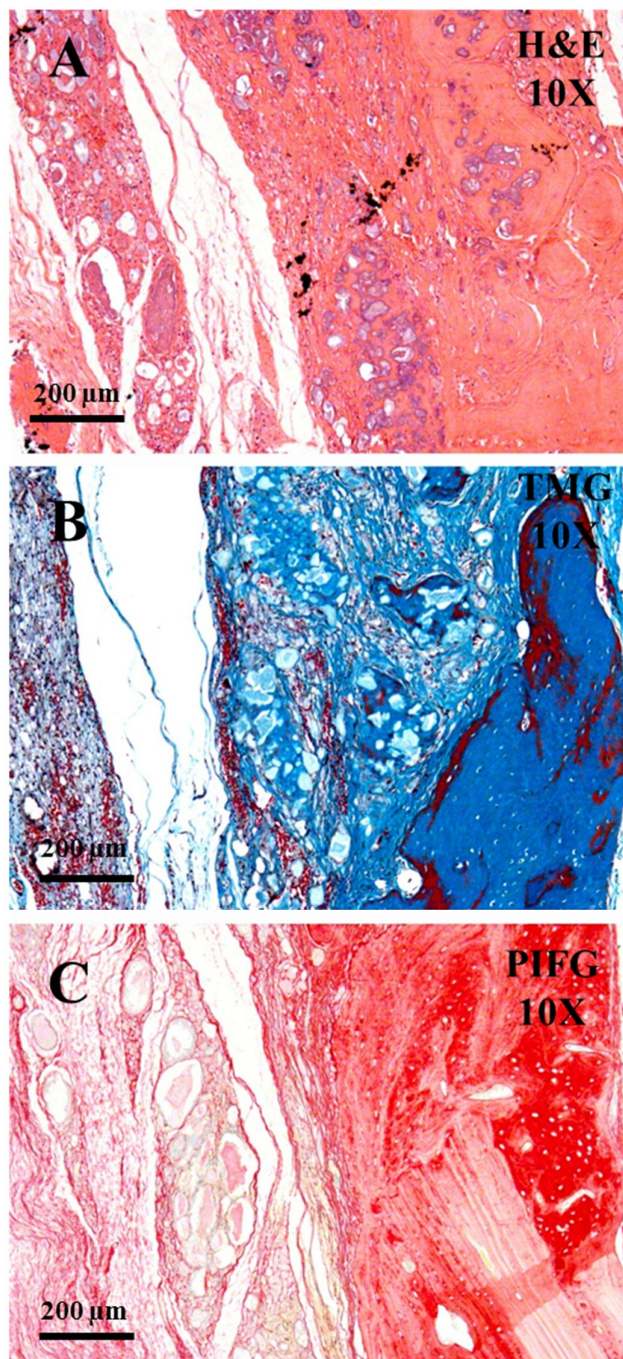
**Centro GEOVHA 45d**

**Figura 40** – GEOVHA 45 dias. A, B e C – Centro do defeito: veia central (VC); presença de matriz osteoide (MON) reparativa em toda a extensão do defeito; células mesenquimais (macrófagos de aspecto espumoso); tecido conjuntivo fibroso adjacente a HAAIlg fragmentada; septos fibrosos (SF). Colorações: H&E, TMG e PIFC, respectivamente.



**Borda GEOVHA 120d**

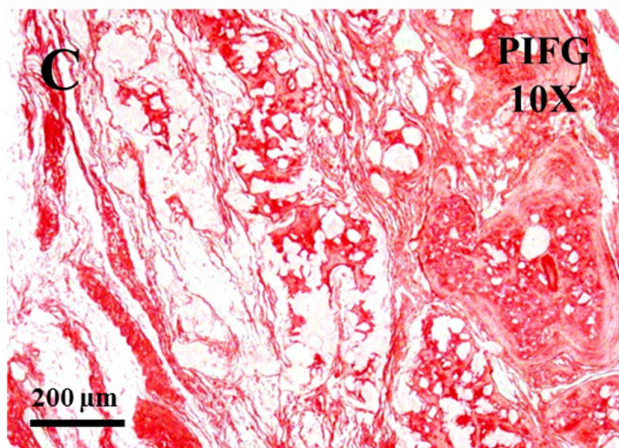
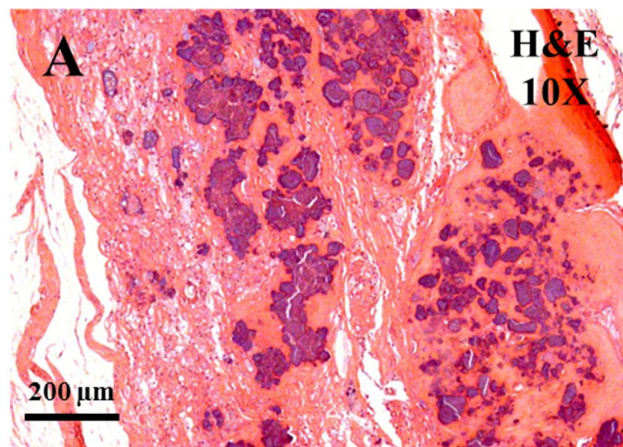
**Figura 41** – GEOVHA 45 dias. A, B e C – Centro: presença de matriz osteoide reparativa (MON) em toda a extensão do defeito; TCF de permeio ao biomaterial; HAAHlg osteointegrada à matriz neoformada; zonas com osteócitos (OC) no osso remanescente; TC proximal à área do retalho. Colorações: H&E, TMG e PIG, respectivamente.





**Centro GEOVHA 120d**

**Figura 42** – GEVHA 120 dias. A, B e C – Matriz osteoide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO) e ocupando toda a extensão e profundidade do defeito: tecido conjuntivo fibroso de permeio à HAAAlg. Colorações H&E, TMG e PIFG, respectivamente.



### 5.1.7 Grupo experimental hidroxiapatita alginato e ranelato de estrôncio (GEHARE) (Figuras 43-45)

Nas bordas ósseas, aos 15 dias, a neoformação óssea reparativa reacional foi restrita a essa região. A região do defeito crítico, aos 15 dias, estava preenchida pelas microesferas fragmentadas e ocupava toda a sua extensão. Essas microesferas estavam circundadas por tecido conjuntivo denso edemaciado. Notaram-se células fusiformes em proliferação, células gigantes e macrófagos. Identificou-se que as fibras de colágeno estavam mais densas e distribuídas paralelamente, com proliferação de fibroblastos e maior ordenamento do tecido de granulação. Em outras zonas do reparo, os fragmentos foram notados com pequenos septos no interior das microesferas fragmentadas. Na região central e nas áreas próximas ao retalho cutâneo, o tecido conjuntivo foi evidenciado mais frouxo. Algumas áreas do defeito apresentavam-se edemaciadas, resultando na formação de um estroma de aspecto frouxo. Notou-se, em algumas zonas do defeito, que havia inflamação aguda, com presença dos polimorfonucleares. Foi evidenciada grande reação inflamatória granulomatosa crônica, aos 15 dias, com presença de células mononucleares – os linfócitos, células gigantes na região proximal à borda óssea de permeio aos fragmentos do biomaterial. Na região periférica, próxima à borda óssea, observou-se a proliferação de células fusiformes, os fibroblastos, e fibras colágenas. No centro do defeito, mais próximo à região do retalho, observaram-se exsudado fibrinoleucocitário e numerosas células da inflamação aguda, as células polimorfonucleares. Próximo à dura-máter, aos 15 dias, havia um tecido de granulação organizado e com muitos capilares sanguíneos em toda a extensão do defeito. Mas não se observou, nos demais pontos biológicos (45 e 120 dias), a neoformação vascular, embora houvesse vasos capilares sanguíneos residentes e estáveis.

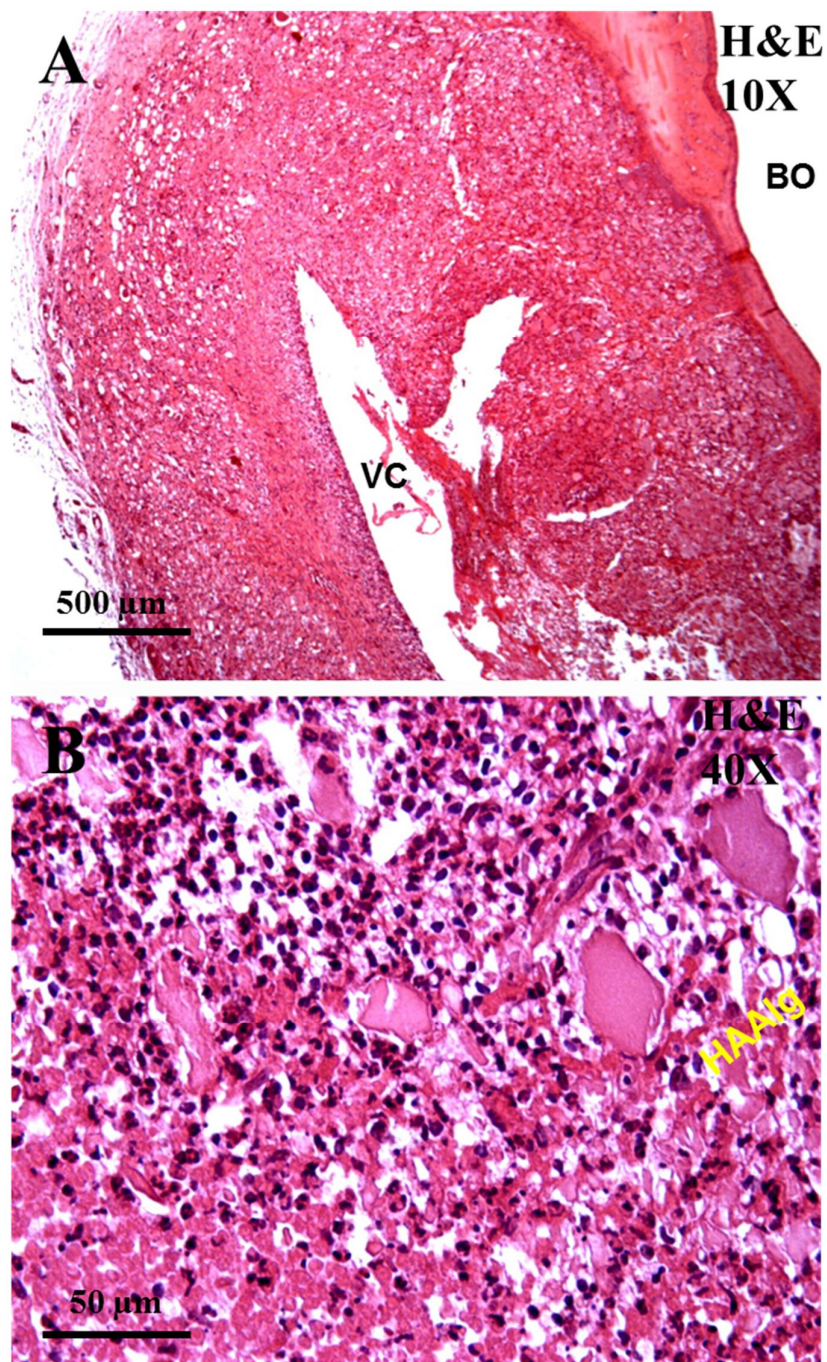
Aos 45 dias, o tecido mineralizado foi observado circunscrito aos vasos sanguíneos e proximais à borda. Nesse local, evidenciaram-se osteócitos ativos. Nesse mesmo ponto biológico, a matriz osteoide ocupou cerca de um terço do defeito. A espessura do reparo foi menor em comparação ao osso remanescente nas bordas ósseas do defeito. Fragmentos do biomaterial foram observados circundados pela matriz osteoide. Aos 45 dias, o biomaterial foi observado muito mais microparticulado do que aos 15 dias. Entre o biomaterial fragmentado notou-se, de permeio, locais com matriz osteoide e tecido conjuntivo frouxo. O tecido conjuntivo foi notado mais adensado e espesso ao redor do biomaterial fragmentado, formando uma cápsula fibrosa, com a evidência de delgados septos fibrosos em direção ao centro. A reação inflamatória crônica granulomatosa foi maior, em extensão, aos 45 dias.

Evidenciou-se a presença de células gigantes multinucleares, macrófagos e alguns linfócitos ocasionalmente distribuídos.

O tecido mineralizado, aos 120 dias, foi observado com áreas de matriz osteoide e áreas com um padrão de deposição em lamelas concêntricas. Tal tecido mineralizado manteve-se circunscrito pelos fragmentos do biomaterial. Na periferia, em algumas áreas, observaram-se osteoblastos ativos. O tecido conjuntivo denso, aos 120 dias, era repleto em fibras colágenas entre os fragmentos do biomaterial, e o tecido conjuntivo frouxo, na área do retalho cutâneo. A inflamação, aos 120 dias, foi discreta, com poucos acúmulos de linfócitos na área proximal à dura-máter e à borda óssea. A inflamação crônica foi notada com a reação granulomatosa, a qual foi seguida por uma delgada fibrose. Aos 120 dias, essa formação capsular, com fibrose em torno das microesferas, tornou-se mais espessa, com presença de células fusiformes. Aos 120 dias, observou-se a diminuição do edema, resultando na formação de um estroma mais denso e com maior celularidade, e alguns espaços capilares luminares, mas sem a neoformação de vasos.

**Borda e Centro GEHARE 15d**

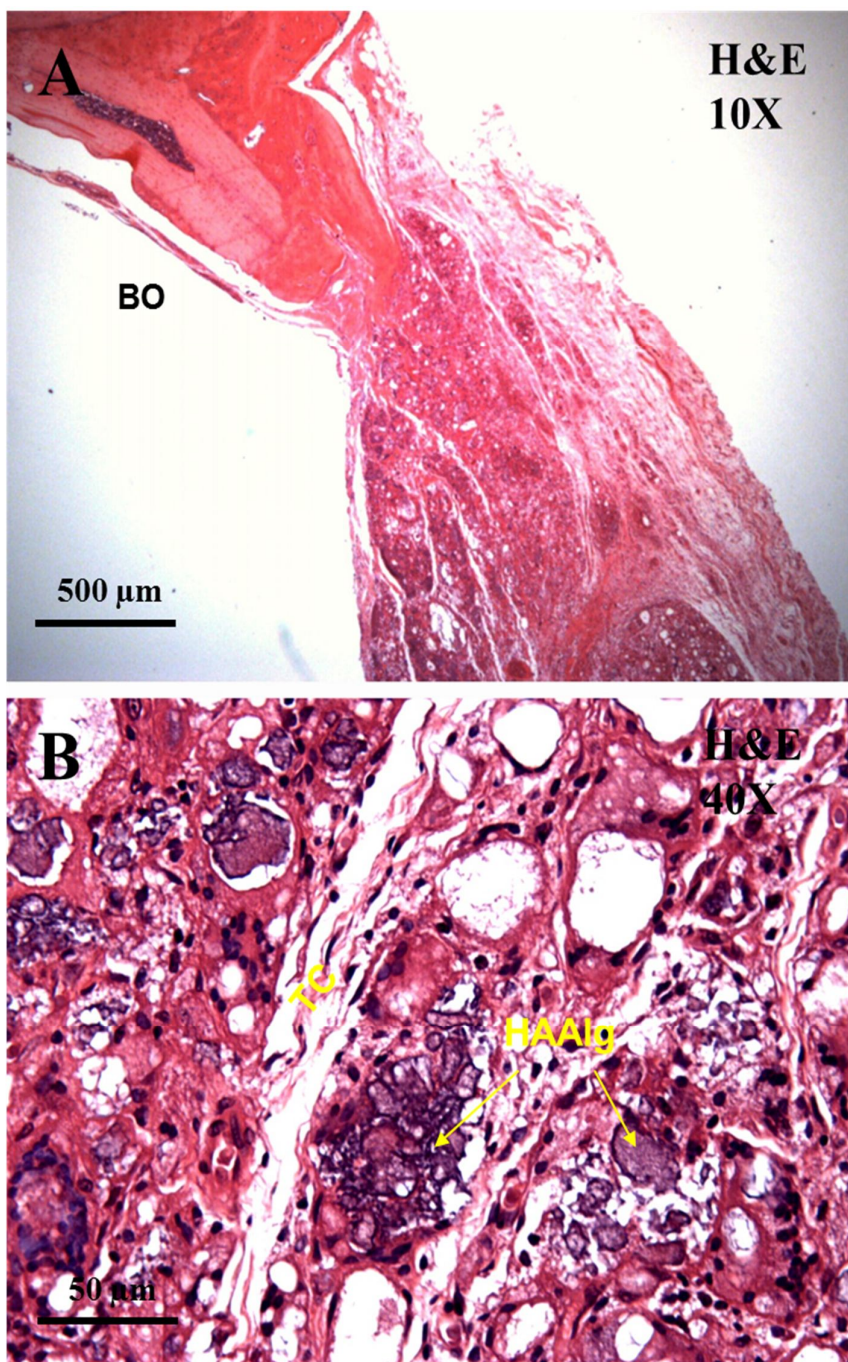
**Figura 43** – GEHARE 15 dias. A e B – Borda e centro do defeito: veia central (VS). matriz osteoide neoformada (MON) em direção centrípeta; células inflamatórias; tecido conjuntivo fibroso de permeio a HAAIlg fragmentada; septos fibrosos dentro da microesfera de HAAIlg. Coloração: H&E.





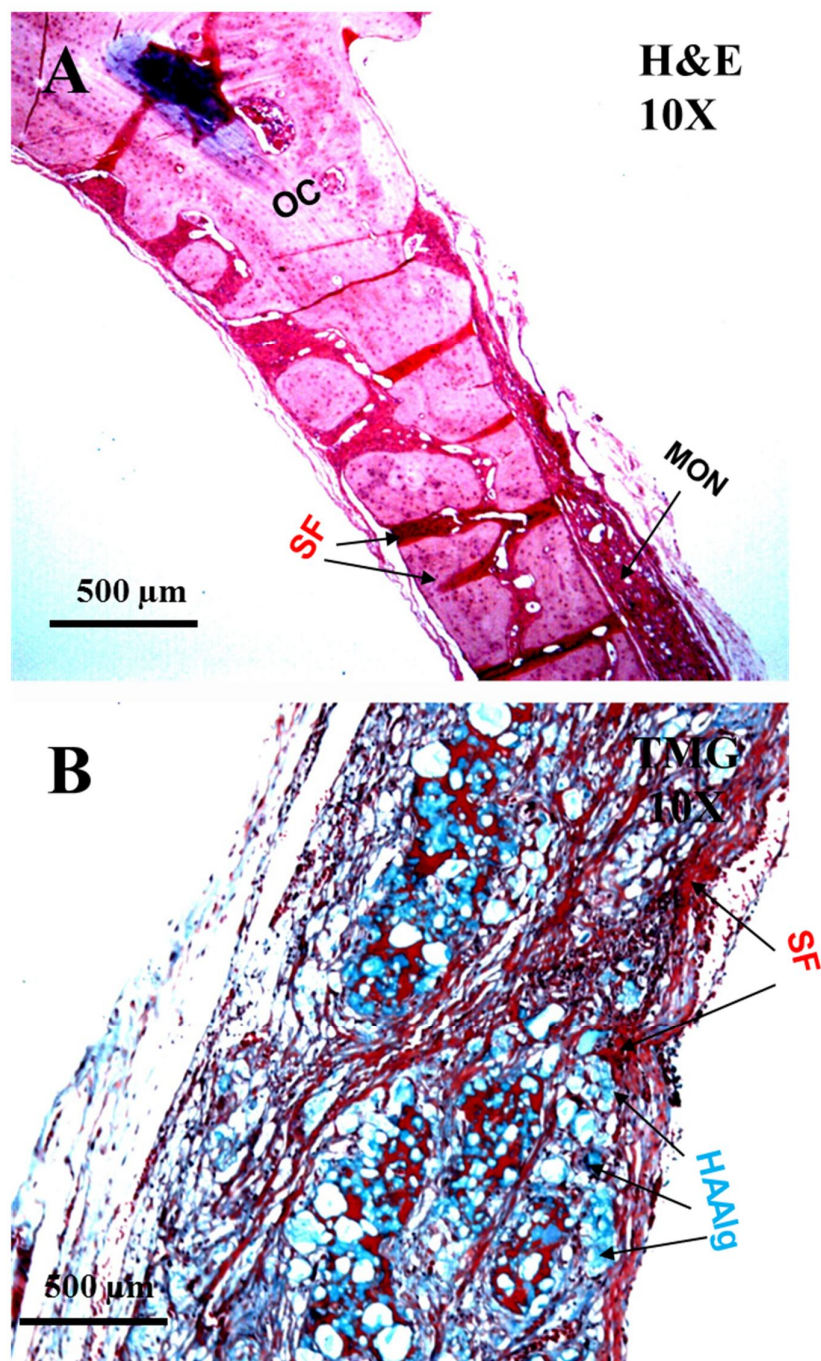
**Borda e Centro GEHARE 45d**

**Figura 44** – GEHARE 45 dias. A e B – Borda e centro do defeito: matriz osteoide neoformada (MON) em direção centrípeta, células inflamatórias; tecido conjuntivo fibroso de permeio a HAAI<sub>g</sub> fragmentada; septos fibrosos dentro da microesfera de HAAI<sub>g</sub>; macrófagos espumosos e células fusiformes. Coloração: H&E.



### Borda e Centro GEHARE 120d

**Figura 45** – GEHARE 120 dias. A e B – Borda e centro do defeito: matriz osteoide neoformada (MON) em direção centrípeta; células inflamatórias; tecido conjuntivo fibroso de permeio à HAAlg fragmentada; osteócitos no tecido ósseo remanescente; TC proximal ao retalho. Colorações: H&E e TMG, respectivamente.

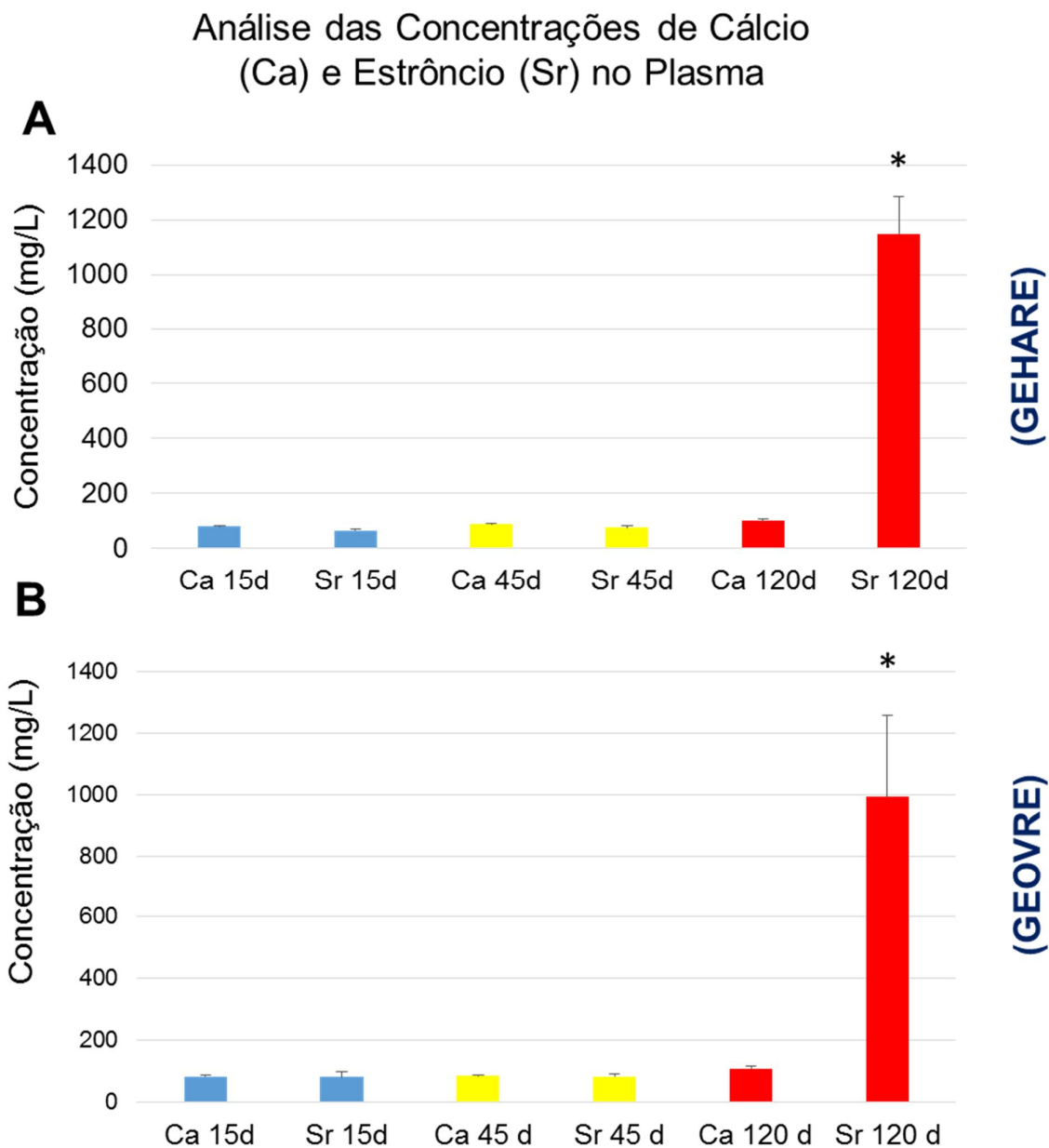


## 5. 2 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DOS ELEMENTOS CÁLCIO E ESTRÔNCIO

### 5. 2. 1 Análise das concentrações de Cálcio e Estrôncio (Sr) no Plasma do GEHARE e GEOVRE

As concentrações plasmáticas de cálcio e estrôncio foram obtidas por meio da espectrometria de absorção atômica com chama e de absorção atômica com forno de grafite, respectivamente, e mensuradas em mg/L. Quando comparados grupos de 15 e 45 dias pós-cirurgia, observa-se que não há diferença nas concentrações plasmáticas de ambos os elementos químicos. Porém existe uma diferença significativa entre ratos tratados com Estrôncio 120 dias após a cirurgia, se comparados aos ratos que sofreram administração de Cálcio, em ambas as condições de tratamento. Especificamente, o Gráfico 4 (A) mostra as médias dos valores relativos à concentração de Cálcio (ca) e Estrôncio (Sr), na situação GEHARE, e Gráfico 4 (B), na condição GEOVRE.

**Gráfico 4** – Análise das concentrações de cálcio e estrôncio (Sr) no plasma



As concentrações de cálcio e estrôncio são equivalentes entre grupos avaliados separadamente (A e B) em 15 e 45 dias pós-cirurgia. Aos 120 dias pós-cirurgia, há diferença significativa entre sujeitos tratados com estrôncio, se comparados aos tratados com cálcio em ambas as condições (A e B).  $P < 0.0002$ , teste de Mann-Whitney para  $n = 5$  ratos em cada período e de cada condição experimental.

O gráfico representa as concentrações plasmáticas de  $Sr^{+2}$  e  $Ca^{+2}$  entre os grupos, nos tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias. Ao comparar as concentrações plasmáticas do estrôncio entre os grupos, no tempo biológico de 15 dias, observou-se que os resultados



obtidos quanto à comparação das concentrações plasmáticas de  $Sr^{+2}$ , no tempo biológico de 15 dias foi superior às concentrações de cálcio no mesmo ponto biológico. Foi possível determinar que, no tempo biológico de 15 dias, em todos os grupos, as concentrações plasmáticas de estrôncio aumentaram, quando comparadas às do grupo de controle. Os teores de  $Sr^{+2}$  encontrados nos grupos tratados com a utilização do fármaco ranelato de estrôncio foram maiores.

### **COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE CÁLCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 15 DIAS**

Identificaram-se, no gráfico acima, os resultados obtidos quanto à comparação das concentrações plasmáticas de  $Ca^{+2}$ , no tempo biológico de 15 dias. Foi possível notar que, no tempo biológico de 15 dias, em todos os grupos, as concentrações plasmáticas de  $Ca^{+2}$  foram diminuídas.

### **COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO ESTRÔNCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 45 DIAS**

Quanto à comparação das concentrações plasmáticas de  $Sr^{+2}$ , no tempo biológico de 45 dias, notou-se que, no tempo biológico de 45 dias, em todos os grupos, que as concentrações plasmáticas de  $Sr^{+2}$  estavam aumentadas.

### **COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO CÁLCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 45 DIAS**

Quanto à comparação das concentrações plasmáticas de  $Ca^{+2}$ , no tempo biológico de 45 dias, observou-se, em todos os grupos, que as concentrações plasmáticas de  $Ca^{+2}$  estavam diminuídas.

### **COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO ESTRÔNCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 120 DIAS**

O gráfico demonstra também os resultados obtidos quanto à comparação das concentrações plasmáticas de  $Sr^{+2}$ , no tempo biológico de 120 dias. Notou-se que, no ponto

biológico de 120 dias, em todos os grupos, as concentrações plasmáticas de  $Sr^{+2}$  estavam, extremamente, aumentadas.

### **COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO CÁLCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 120 DIAS**

No gráfico, é possível observar os resultados obtidos quanto à comparação das concentrações plasmáticas de  $Ca^{+2}$ , no tempo biológico de 120 dias. Notou-se que, nesse tempo, em todos os grupos, as concentrações plasmáticas de  $Ca^{+2}$  se apresentaram diminuídas.

**6 DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo experimental, pesquisou-se a influência das ondas vibratórias obtidas do equipamento Juvent<sup>®</sup>, do fármaco ranelato de estrôncio e do implante de biomaterial na regeneração de defeitos ósseos críticos.

Nesta pesquisa, as condições experimentais basearam-se na adoção de medidas para o tratamento sistêmico ou local. As terapêuticas consistiram na utilização de procedimentos como mobilizações passivas precoces e cinesioterapia ativa, bem como utilização de fármacos ou implante de biomaterial no local do defeito ósseo. O entendimento sobre as possíveis contribuições dessas terapêuticas experimentais é necessário para ampliar as perspectivas sobre o emprego de inovações biotecnológicas para o reparo de defeito ósseo crítico.

Essas estratégias terapêuticas foram utilizadas, experimentalmente, no GOSDPO, GEDCPO, GEOV, GEOVRE, GEOVHA. De acordo com o padrão de reparo tecidual ósseo, observaram-se, nos grupos de controle, resultados morfológicos semelhantes aos descritos por outros autores (BARRETO, 2011; CAMPOS, 2012; CARVALHO, 2010; ROLIM, 2013). Nesse grupo controle, em toda a extensão linear do defeito, houve o preenchimento da área por um tecido conjuntivo frouxo, e, por outro lado, houve a neoformação de matriz osteoide restrita às bordas do defeito em todos os pontos biológicos. Infere-se que, em um defeito com grandes dimensões, necessita-se de um arcabouço que possa produzir, no local, condições adequadas à síntese de fatores morfogenéticos e à migração celular, dentre outros.

Em outras estratégias de terapêuticas experimentais deste estudo, o padrão de resposta tecidual no GEOVHA foi caracterizado pela neoformação vascular. Esses vasos neoformados foram encontrados proximais ao biomaterial implantado, a HAAlg. A permanência desses vasos foi observada em todos os pontos biológicos. Nesse mesmo grupo, a celularidade local estava aumentada. A matriz osteoide neoformada ocupou toda a área do defeito, e essa ocupação foi caracterizada por um incremento não somente em profundidade, mas também na espessura da deposição de matriz osteoide reparativa no recente reparo. Tal característica, no padrão de reparo desse grupo, possibilitou inferir que o preenchimento do defeito de grandes dimensões pelo biomaterial reestabelece o volume. As propriedades do bioenxerto implantado no sítio da lesão desse grupo foram importantes para a obtenção de uma melhor resposta tecidual, quando comparada à dos grupos de controle. Esses resultados são similares aos de outros estudos, nos quais se observou que o implante de biomaterial no defeito crítico

promoveu e restabeleceu a funcionalidade e a forma da região lesionada (MEROLLI; THOMAS, 2009; SIKAVITSAS TEMENOFF; MIKOS, 2001; SOLTAN; SMILER; CHOI, 2009). Salienta-se que o benefício do implante da HAAlg no defeito crítico no GEOVHA experimental foi o de preencher o defeito, servir de arcabouço e promover osteoindução e osteocondução, fatores essenciais à angiogênese e o consequente reparo.

As características da resposta tecidual observadas no GEOV revelaram a presença de neoformação de matriz osteoide reparativa reacional nos pontos biológicos estudados, restrita às bordas ósseas no GEOV. É conhecido que, na etapa cirúrgica, durante a criação do defeito, pode haver sangramento em menor ou maior intensidade. No grupo GEOV, é possível que a aplicação de ondas vibratórias tenha aumentado a modulação de fatores relacionados ao controle do sangramento e à estabilização do coágulo formado no interior do defeito. Esse mecanismo pode ser explicado pela ampliação das forças de tensão biomecânica necessárias para o alinhamento das fibras de colágeno e o recrutamento de células responsáveis pela reabsorção e remodelação óssea. Essa resposta de neoformação óssea é similar àquelas obtidas em outros estudos, mas vale salientar que em defeitos ósseos não críticos (AUER et al., 2007; GUSMÃO et al., 2009; TALISH, 2006; KLENKE, 2008). Este padrão de reposta tecidual foi reproduzido em nossos experimentos, mas em defeito de dimensões críticas. Nesse grupo, observou-se o reparo ósseo em toda a extensão do defeito ósseo crítico. Infere-se que o padrão de defeito ósseo com grandes dimensões pode ser tratado com a aplicação de ondas vibratórias com algum benefício. Entretanto, a profundidade e a espessura do reparo constituído por matriz osteoide neoformada reparativa foram muito inferiores quando comparadas às do osso remanescente. As forças de tensão biomecânica são essenciais para o alinhamento das fibrilas de colágeno (FRANKEL, 2005), a organização da matriz osteoide neoformada e, posteriormente, a sistematização do padrão lamelar concêntrico (WALSH, 2006). Mas, situações de reparo de defeito ósseo crítico caracterizam-se pela não possibilidade de reparo espontâneo, em função de sua grande dimensão (CAMPOS, 2012). Tais fatos, provavelmente, possibilitaram a neoformação osteoide reparativa já aos 15 dias e a melhora dos resultados nos pontos biológicos subsequentes.

A outra possibilidade de terapêutica sistêmica examinada neste estudo foi a utilização de fármacos como o ranelato de estrôncio, uma droga que previne e controla a osteoporose (WANG, 2008). Neste estudo, foi realizada a associação de ondas, através da plataforma vibratória, e a administração enteral do fármaco ranelato de estrôncio. Entretanto, quando observado o efeito da aplicação de ondas vibratórias e do ranelato de estrôncio, notou-se que

o reparo ósseo, em toda a extensão linear do defeito, foi muito inferior, quando comparado ao do GEOV.

Acredita-se que o potencial osteogênico da terapêutica combinada de aplicação de ondas vibratórias e a administração do fármaco no GEOVRE foram influenciados por mecanismos que promovem uma intensa reabsorção óssea. Apesar de não muito conhecido, o mecanismo de ação desse medicamento consiste em agir através da inibição da linhagem celular óssea: os pré-osteoclastos e os osteoclastos (MARIE, 2001; SHARAN et al., 2008; LI et al., 2009; HALBOUT,2010). A administração do ranelato de estrôncio promove modulação do receptor extracelular cálcio-dependente, regulada por uma proteína: a osteoprotegerina (LI et al., 2010). Acredita-se que, neste estudo, as ondas vibratórias na dosimetria aplicada interfiram na atividade celular osteoclástica. Alguns pesquisadores demonstraram que a dose é dependente nos casos de defeitos não críticos e processos osteopênicos, ou quando a osteoporose já se instalou (FONSECA, 2008). Neste estudo, é provável que a dose de ondas vibratórias estabelecida pelo protocolo e aplicadas no rato tenha potencializado o efeito da remodelação óssea. É aceitável que a combinação da terapêutica sistêmica com o ranelato de estrôncio e as ondas vibratórias, culminou numa exacerbação da remodelação óssea e uma pior resposta ao reparo do defeito ósseo crítico em GEOVRE. Outra possibilidade é que a aplicação de ondas terapêuticas com a frequência de 60Hz, durante 20 minutos, por 3X, tenha permitido alterações dos níveis de cálcio em concentrações plasmáticas.

As concentrações plasmáticas dos elementos cálcio e estrôncio, após a administração de ranelato de estrôncio, foram analisadas nos grupos tratados. Nesses grupos, as concentrações plasmáticas de cálcio estavam aumentadas, e as concentrações de estrôncio diminuídas. O tecido ósseo adsorve, aproximadamente, cerca de 80% do estrôncio encontrado no corpo. Entretanto, o cálcio e o estrôncio competem pelos mesmos sítios de ligação no osso (FROMIGUÉ, 2009). A adsorção do estrôncio no tecido ósseo está associada às concentrações plasmáticas, à oferta desse íon e à atividade de remodelação óssea (BASURTO et al., 2009). É conhecido que o efeito anabólico do íon cálcio no tecido ósseo é modulado pela ligação da proteína de ligação, a osteoprotegerina, e o incremento deste complexo ligante ao receptor RANKL (HALBOUT,2010). O estrôncio e o cálcio apresentam isoformas química e fisiológica (NASCIMENTO, 2010) e podem disputar o mesmo sítio de ligação. Infere-se que os níveis plasmáticos de estrôncio, possivelmente, se apresentaram mais baixos que os de cálcio em virtude de sua grande adsorção no tecido ósseo. Aos 45 e 120 dias, não se observou a formação de novos vasos. Infere-se, então, que a manutenção dos espaços vasculares, mas sem o surgimento de novos vasos, é compatível com a diminuição da reação inflamatória vista

aos 15 dias em todos os grupos. A reação granulomatosa seguida por zonas de septos fibrosos aumentou nesses pontos biológicos e, principalmente, para o GEOVHA. Nesses grupos, com a implantação das microesferas de hidroxiapatita no sítio da lesão, observou-se uma reação granulomatosa, com a presença de macrófagos e células gigantes multinucleadas circunjacentes às microesferas do biomaterial. Aos 45 e 120 dias, essa reação granulomatosa foi observada, e notou-se uma redução significativa nesses últimos pontos biológicos. Essa reação caracteriza o que se pode chamar de uma reação de corpo estranho. Resposta semelhante foi encontrada em estudos similares, mas não em pontos biológicos superiores a 120 dias (CHANG, 2008).

Em defeitos com o modelo de lesão não crítico, o coágulo estável não somente contribui para a neoformação óssea, mas mantém as condições ideais de alinhamento, proliferação, diferenciação, migração e adesão celular ao local da lesão (ALLEN, 2006). No GEOVHA, observou-se a presença do biomaterial osteointegrado à matriz osteoide neoformada, os septos fibrosos circunjacentes aos grânulos das microesferas de HAAlg. Através desses achados, pode-se considerar que a estabilidade do coágulo foi relativamente mantida, e o biomaterial implantado no sítio do defeito, em todos os grupos implantados, não se deslocou. Em situações de defeito ósseo crítico, apesar de as ondas vibratórias (cinesioterapia) constituírem um recurso sistêmico coadjuvante e recente, quando empregadas isoladamente não são totalmente satisfatórias para o reparo do defeito ósseo crítico. Na prevenção da diminuição de densidade mineral óssea, muito comum em indivíduos vitimados por traumas ortopédicos, por exemplo, seu uso continua necessitando ser melhor documentado (FRANKEL, 2006). Os efeitos dos fármacos como o ranelato de estrôncio e outros à base de cálcio, que são comercializados e utilizados em humanos como terapêutica profilática e de controle em situações de osteoporose, necessitam de mais investigações quanto a seu uso em reparo de defeito ósseo crítico.

Outros recursos indicados e utilizados para auxiliar o processo de reconstituição tecidual, tais como os substitutos biológicos (biomateriais como as microesferas de hidroxiapatita), são utilizados com a finalidade de mimetizar as respostas no local do osso lesionado e com algumas vantagens. Aceleram a atividade orgânica no microambiente comprometido de defeitos críticos, nos quais são observadas as limitações ao reparo espontâneo, e permitem a diminuição do tempo de imobilidade, bem como a alteração da função locomotora. Mas as reações ao enxerto ou a um corpo estranho constituem um desafio para assegurar uma terapêutica sem complicações. Essas estratégias terapêuticas (uso de

ondas vibratórias, ranelato de estrôncio e hidroxiapatita), pelos seus efeitos isolados, induzem a osteogênese. Essa é uma descoberta que, até então, era desconhecida na literatura científica.

Em medidas para o tratamento sistêmico, as terapêuticas consistem na utilização de procedimentos como as mobilizações passivas precoces e a cinesioterapia ativa (AUGAT, 2006). Elas podem ser empregadas em muitas condições do osso lesionado e visam a aperfeiçoar as forças de tensão biomecânica (CHEUNG, 2006), na proximidade do sítio da lesão (FENGYUAN, 2006). Esse efeito biomecânico é imprescindível para o alinhamento das fibras de colágeno, cuja molécula estrutural é secretada pelas células mesenquimais e fusiformes (LING, 2006; McCLEOD, 2006). Essa matriz colagênica constitui o principal meio orgânico e é essencial ao reparo tecidual ósseo (PHILP, 2006). Em situações como na síndrome da imobilidade, em que as mobilizações precoces e a cinesioterapia não são possíveis como terapêutica, o reparo ósseo fica prejudicado (DELECLUSE et al., 2011; TALISH; CUTTS, 2006; WALSH, 2006). Outra situação é aquela na qual o reparo não ocorre de forma espontânea, em virtude da extensão do defeito. Diante dessas limitações, neste estudo, alguns dos objetivos específicos foram: avaliar o potencial osteogênico no reparo de defeito ósseo crítico através de aplicação de ondas vibratórias, administração do fármaco ranelato de estrôncio e o implante do biomaterial, HAALg.

Nos grupos em que foram produzidos os defeitos críticos nos animais e realizada a cinesioterapia, o resultado foi surpreendente, incomum para esse ponto biológico de observação. A análise histológica apresentou, no grupo submetido à terapêutica sistêmica através da cinesioterapia, a melhor resposta ao reparo ósseo, quando comparado ao grupo submetido à terapêutica com ranelato de estrôncio. Notou-se que, no grupo tratado com a cinesioterapia, a partir da análise histológica, no centro do defeito, a neoformação óssea, caracterizada pelo agregado de células fusiformes proliferativas, migratórias e áreas de mineralização, obteve uma resposta mais satisfatória. Em nossos achados, algumas vezes, foi identificada a presença de infiltrado inflamatório difuso nos grupos tratados com a plataforma vibratória. Mas, apesar do resultado comum, nesse último, notou-se maior desorganização da estrutura celular, o que interferia na quantidade e na qualidade da neoformação óssea. Na análise do grupo submetido à vibração, verificaram-se, como evidência de processo inflamatório discreto, vasos na periferia das bordas ósseas e raros fibroblastos de permeio ao tecido conjuntivo frouxo. Em nossos estudos, a alta frequência e o tempo de exposição à terapêutica a que os animais estavam expostos, nos grupos que receberam a aplicação de ondas vibratórias, são discutíveis quanto à manutenção da estabilidade dinâmica dos seus biosistemas celulares. A provável potencialização do efeito do ranelato de estrôncio na



remodelação óssea, quando associado à aplicação das ondas vibratórias, necessita de outros estudos (BRENAN et al., 2009; BRUYERE et al., 2007).

Em todos esses grupos, a resposta inflamatória esteve presente. Entretanto, essa resposta era distinta em cada grupo, inclusive no GEDCPO, utilizado como controle. Nos grupos de controle, o padrão de resposta inflamatória consistiu em uma menor observação da presença de infiltrado mononuclear difuso, zonas de hemorragia e edema bastante discreto. Infere-se que tais características inflamatórias do grupo de controle podem ser decorrentes da ausência de exposição desses animais aos bioenxertos, fármacos ou outros. Em outros estudos semelhantes, os grupos não tratados obtiveram uma resposta semelhante (CARVALHO, 2010; ROLIM, 2013). No entanto, a exacerbação do padrão de resposta inflamatória foi muito mais intensa no GEOVHA, quando comparado aos demais. É possível que essa diferença entre os grupos GEOV, GEOVRE e GEOVHA tenha sido resultante do implante de biomaterial, a HAALg, no sítio da lesão. A presença de vasos sanguíneos, de zonas de inflamação granulomatosa e de fragmentação contínua do biomaterial implantado caracteriza a reação de enxerto. É possível que esse biomaterial, composto por HAALg, seja não somente biocompatível, mas possua uma necessária propriedade para o reparo ósseo: a possibilidade de ser osteocondutivo. Estudos demonstraram que tais propriedades são essenciais para o melhor processo regenerativo de tecidos como o ósseo (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). Pesquisas recentes indicam que tais substitutos biológicos são também necessários não somente pelas propriedades de osteocondução, mas pela possibilidade de contribuir como um arcabouço em situações de grandes áreas a serem reconstituídas (AHMED; DARE; HINCKE, 2008).

A reação granulomatosa evidenciada nos grupos tratados foi também mais proeminente naqueles em que os substitutos biológicos foram utilizados. É possível que a formação mais intensa de áreas com granulomas, nesses casos, também, tenha sido resultante do implante do bioenxerto. É conhecido que a ruptura de vasos é acompanhada por hemorragia e formação de tampão de fibrina. Esse marco caracteriza o início de uma sequência de eventos que determinam o estado de inflamação aguda inicial e a crônica, subsequente. A neoformação óssea é precedida do recrutamento de fatores morfogenéticos, citocinas, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, necessários ao reparo tecidual (FINDIKCIOGLU et al., 2009). Esses fatores, que objetivam a homeostase celular e a permanência plena, contínua e adequada dos potenciais celulares, são essenciais à síntese de fatores tróficos, os quais estimulam a angiogênese e a vasculogênese (FELLAH et al., 2007), necessárias ao reparo tecidual ósseo. Em outros estudos, em que houve o implante de

hidroxiapatita de cálcio, a formação de tecido de granulação foi precedida de zonas vascularizadas (DOROZHKIN, 2009). Apesar de a presença de reação inflamatória crônica ter sido observada em todos os grupos, ela foi muito mais acentuada nos grupos onde houve a implantação do biomaterial no defeito ósseo crítico: GEOVHA e GEHARE.

Infere-se que essa resposta inflamatória atesta a necessidade de recrutamento de fatores inflamatórios para o reparo tecidual, devido à lesão tecidual causada pela confecção do defeito ósseo. A resposta inflamatória foi semelhante em outros estudos, cujas condições foram similares às do presente estudo (CEBESOIY et al., 2007; CHATTOPADHYAY et al., 2007). O infiltrado inflamatório difuso não foi observado no GSDPO, o que já era esperado. Mas a determinação do padrão ouro morfológico da calvária do rato, nos pontos biológicos em estudo, possibilitaram ampliar o entendimento sobre o potencial terapêutico de alguns agentes físicos (a cinesioterapia) e químicos (o ranelato de estrôncio e o biomaterial ósseo) em defeito crítico.

Diante das possíveis estratégias terapêuticas experimentais elaboradas, protocoladas, adotadas e testadas neste estudo, todas essas condições foram essenciais.



## 7 CONCLUSÃO

Após o estudo do reparo ósseo com as terapias sistêmicas com ondas vibratórias, a administração de fármaco ranelato de estrôncio no reparo ósseo e a implantação local de biomaterial, conclui-se que:

- a aplicação de ondas vibratórias é uma terapêutica que influenciou satisfatoriamente o reparo ósseo em defeito crítico de calvárias de ratos;
- a combinação terapêutica de aplicação das ondas vibratórias e implantação de microesfereas de HAAI<sub>g</sub> possibilitou melhor reparo em toda a extensão linear do defeito;
- o biomaterial utilizado foi biocompatível e osteocondutor;
- a administração de ranelato de estrôncio por via enteral promoveu o aumento do elemento estrôncio nas concentrações plasmáticas.

**REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

- AHMED, T. A. E.; DARE, A. V.; HINCKE, M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev*, New York, v.14, n.2, p.199-215, jun. 2008.
- ALLEGRETTI, K. M. G. et al. Os efeitos do treino de equilíbrio em crianças com paralisia cerebral diparética espástica. *Rev. Neurocienc.*, São Paulo, v.15, n. 2, p.108-113, 2007.
- AMMANN, P. et al. Strontium ranelate treatment improves trabecular and cortical intrinsic bone tissue quality, a determinant of bone strength. *J. Bone and Miner. Res.*, Cambridge, UK, v. 22, n. 7, p. 1419-1425, 2007.
- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*, Filadelfia, v.20, n.2, p.86-100, apr. 2008.
- ANDREOLLO, N. A. et al. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *ABCD*, Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 49-51, 2012.
- AUER, J. A. et al. Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord*, London, v. 8, p.1-13, aug. 2007.
- AUGAT, P. The role of biomechanical signals in bone repair. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIBRATION THERAPY. *Anais...*, Hong Kong, 2006.
- BARRETO, I. C. *Avaliação in vivo do reparo de defeito ósseo com biomaterial do tipo microesferas cerâmicas*. 2006. 103f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2006.
- BARRETO, I. C. *Utilização de microesferas de hidroxiapatita no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos*. 2008. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2008.
- BARRETO, I. C. *Utilização de ranelato de estrôncio associado a biometrias para regeneração óssea*. 172f. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.
- BARRIAS, C. C. et al. Effect of calcium phosphate addition to alginate microspheres: modulation of enzyme release kinetics and improvement of cell adhesion. *Key Eng Mater*, Stafa-Zurich, v.284-286, p.689-692, apr. 2005.
- BASURTO L. et al. Eficacia del ranelato de estroncio para la mineralización ósea em mujeres posmenopáusicas. *Ginecol. Obstet. Mex.*, Mexico, v. 77, n. 5, p. 227-230, 2009.
- BEST, S. M. et al. Bioceramics: past, present and for the future. *J Eur Ceramic Society*, Amsterdam, v.28, n.7, p.1319-1327, 2008.
- BOROJEVIC, R. Terapias celulares e bioengenharia. *Gazeta Médica da Bahia*, Salvador, v. 78, Supl. 1, p. 42-46, 2008.

BOSCO, C. et al. Respostas adaptativas do músculo-esquelético à exposição vibratória: resposta do músculo-esquelético à vibração. *Clinical Physiology*, Malmö, v. 19, n.2, p.183-187, 1999.

BRENNAN, T. C. et al. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *British Journal of Pharmacology*, Glasgow, v. 157, n. 7, p. 1291- 1300, aug., 2009.

BRUYERE, O. et al. Relationship between bone mineral density changes and fracture risk reduction in patients treated with strontium ranelate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Chavy Chase, v. 92, n. 8, p. 3076-3081, 2007.

CAMPOS, L. S. *Estudo do comportamento biológico de biomaterial xenogénico em defeito ósseo crítico*. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas e Medicina) – Universidade do Algarve, Faro, Portugal, 2012.

CARVALHO, A. A. *Reparo ósseo de defeito crítico em calvária de rato com microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina*. 120f. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2010.

CASALS, J. B. et al. The use of animal models for stroke research: a review. *Comparative Medicine*, Memphis, v. 61, n. 4, p. 305, 2011.

CEBESOI, O. et al. Effect of strontium ranelate on fracture healing in rat tibia. *J. Bone Spine*, Paris, v. 74, n. 6, p. 590-593, 2007.

CHATTOPADHYAY, N. et al. The calcium sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. *Biochem. Pharmacol.*, Kansas City, v. 74, n. 3, p. 438-447, 2007.

CHEUNG, W.H. et al. Effect of low magnitude, high frequency vibration therapy on fracture healing-rat model. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIBRATION THERAPY. 2006. *Anais...* Hong Kong, 2006.

CONZ, M. B.; GRANJEIRO, J. M.; SOARES, G. A. Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical/dental applications as bone graft. *Journal of Applied Oral Science*, Bauru, SP, v. 13, p. 136-140, 2005.

CORTINA, E. L.; LÓPEZ, M. G. El ranelato de estroncio en el tratamiento de la osteoporosis. *Actual. en Farmacol. y Terapêut.*, Barcelona, v. 6, n. 2, p. 99-103, 2008.

COSTA, A. et al. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. *Rev. Eletr. de Mat. e Proc.*, Campina Grande, PB, v. 4, n. 3, p. 29-38, 2009.

CURY, R. L. S. M; MAGALHÃES, L. C. Criação de protocolo de avaliação do equilíbrio corporal em crianças de quatro, seis, oito anos de idade: uma perspectiva funcional. *Rev. Bras. Fisioter.*, São Carlos, SP, v.10, n.3, p.347-354, jul./set. 2006.

D'HAESE, P. C. et al. Measurement of strontium in serum, urine, bone, and soft tissues by zeeman atomic absorption spectrometry. *Clin. Chem.*, Washington, v. 43, n. 1, p. 121-128, 1997.

- DALTRO, G. C. et al. Tratamento da osteonecrose da cabeça femoral com células progenitoras autólogas em anemia falciforme. *Acta Ortop. Bras.*, São Paulo, v. 16, n. 1, 2008.
- DELECLUSE C. et al. The effects of whole-body vibration training and vitamin D supplementation on muscle strength, muscle mass, and bone density in institutionalized elderly women: a 6-month randomized, controlled trial. *J Bone Miner Res.* Cambridge, UK, v. 26, n. 1, p.:42-49, jan. 2011.
- DELECLUSE, C; ROELANTS, M; VERSCHUEREN,S. Aumento da força após vibração de corpo inteiro comparado com treino de resistência. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, Indianapolis, p. 1033-1041, 2003.
- DOROZHKIN, S.V. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*, Guildford, v.31, n.7, p.1465-1485, mar. 2009.
- FELLAH, B.H. et al. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles. *J Mater Sci Mater Med*, London, v.18, n.2, p.287-294, feb, 2007.
- FENGYUAN Z.; JINGWEN, H. Aging and space flight. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIBRATION THERAPY. *Anais...* Hong Kong, 2006.
- FINDIKCIOGLU, K. et al. Effect of platelet-rich plasma and fibrin glue on healing of critical-size calvarial bone defects. *J Craniofac Surg*, Boston, v.20, n.1, p.34-40, jan. 2009.
- FONSECA, J. E. Rebalancing bone turnover in favour of formation with strontium ranelate: implications for bone strength. *Rheumatology*, v. 47, Oxford, UK, p. iv17-iv19, 2008.
- FRANKEL, V. H.; McLEOD, K. J. Calf muscle stimulation as an adjunct to orthopaedic surgery. *Surg Technol Int.*, San Francisco, n. 14, p. 297-304, 2005.
- FROMIGUÉ, O. et al. Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, New York, v. 13, n. 8B, p. 2189-2199, aug. 2009.
- GELI, E. A. *Tratamiento sintomático de la fibromialgia mediante vibraciones mecánicas*. 313f. Tesis (Doctoral) Facultat de Medicina Universitat de Barcelona, 2008. Disponível em: <<http://www.tesisenxarxa.net/TDX-0114109-120852/>>. Acesso em: 09 set. 2009.
- GEOFFROY, V. et al. Strontium ranelate decreases the incidence of new caudal vertebral fractures in a growing mouse model with spontaneous fractures by improving bone microarchitecture. *Osteoporos. Int.*, Nyon, v. 2011, n. 22, p. 289-297, 2010.
- GIANNOUDIS, P.V.; DINOPOULUS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. *Injury*, Bristol, v.36, n.3, p.S20-S27, nov. 2005.
- GOODSHIP, A. The mechanobiology of bone repair and implications for vibration therapy in fracture management In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIBRATION THERAPY. 2006. *Anais...* Hong Kong, 2006.
- GUSMAO, C. V. B. de; BELANGERO, W. D. Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico? *Rev. Bras. Ortop.* São Paulo, v. 44, n.4, p. 299-305, 2009.



- HADJIDAKIS, D.J.; ANDROULAKIS, I. I. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*, New York, v.1092, p.385-396, dec. 2006.
- HALBOUT, P. Better bone health for osteoporotic patients: protelos decreases fracture risk and improves bone quality. *Medicographia*, Suresnes Cedex, v. 32, n. 4, 2010.
- HING, K. A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series A*, London, v. 362, n. 1825, p. 2821-2850, 2004.
- HOLZER, G. et al. Hip fractures and the contribution of cortical versus trabecularbone to femoral neck strength. *J. Bone and Miner. Res*, Cambridge, UK, v. 24, n.3, p. 468-474, 2009.
- HONMA, T. et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Dis*, Houndmills, v.14, n.5, p.457-464, jul. 2008.
- INTINI, G. et al. A comparative analysis of bone formation induced by human demineralized freeze-dried bone and enamel matrix derivative in rat calvaria critical-size bone defects. *J Periodontol*, Indianapolis, v.79, p.1217-1224, jul. 2008.
- KLENKE, F.M. et al. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *J Biomed Mater Res A*, Hoboken, v.85, n.3, p.777-786, jun. 2008.
- LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, Park Ridge, v. 395, p. 81-98, 2002.
- LEUNG, K. S. Effect of whole body vibration on the BMD and balancing ability in postmenopausal women. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIBRATION THERAPY. 2006. *Anais...* Hong Kong, 2006.
- LI, Y. et al. Strontium ranelate treatment enhances hydroxyapatite-coated titanium screws fixation in osteoporotic rats. *J. Orthop. Res.*, New York, v. 28, n. 5, p. 578-582, 2010.
- LI, Y. et al. Strontium-calcium coadministration stimulates bone matrix osteogenic factor expression and new bone formation in a large animal model. *J. Orthop. Res.*, New York, v. 27, n. 6, p. 758-752, 2009.
- LING, Q. Biomechanics and biological responses of bone during mechanical loading. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIBRATION THERAPY. 2006. *Anais...* Hong Kong, 2006.
- LIINAS, P. et al. Structural studies of human alkaline phosphatase in complex with strontium: implication for its secondary effect in bones. *Protein Sci.*, New York, v. 15, n. 7, p. 1691-1700, 2006.
- LONG, P. H. Medical devices in orthopedic applications. *Toxicologic Pathology*, Reston, v. 36, n. 1, p. 85-91, 2008.
- MADHAVAN, G; STEWART J. M.; McLEOD K. J. Cardiovascular systemic regulation by plantar surface stimulation. *Biomed Instr Tech*. Arlington, v. 40, n. 1, p. 78-84, jan./feb. 2006.

MAÏMOUN L. et al. Strontium ranelate improves implant osseous integration. *Bone*, New York, n. 5, p. 1436-1441, 2010.

MARCACCI, M. et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng*, New York, v.13, n.5, p.947-955, may, 2007.

MARIE, P. J. et al. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcified Tissue International*, New York, v. 69, n. 3, p. 121-129, 2001.

MARIE, P. J. Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. *Current Opinion in Rheumatology*, London, v. 18, Supl. 1, S11-15, 2006.

MARSH, D. Modulation of cytokine expression by motion in a murine fracture model. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIBRATION THERAPY. 2006. *Anais...* Hong Kong, 2006.

MAVROPOULOS, E. *A hidroxiapatita como absorvedor de metais*. 1999. 105f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 1999.

McLEOD, K. J. Effects of plantar stimulation on venous and lymphatic return. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIBRATION THERAPY. 2006. *Anais...* Hong Kong, 2006.

MEROLLI, A.; THOMAS, J. *Biomaterials in Hand Surgery*. Milan: Springer, 2009.

MIGUEL, F. B. *Avaliação do potencial osteogênico de matrizes tridimensionais colagênicas aniônicas, reticuladas ou não em glutaraldeído, na regeneração de defeitos críticos, em calvária de rato*. 2008. 158f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2008.

MIGUEL, F. B. et al. Morphological assessment of the behavior of three-dimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. *J Biomed Mater Res*, Hoboken, v.78, n.2, p.334-339, aug. 2006.

NASCIMENTO, M. A. *Avaliação dos níveis plasmáticos de estrôncio e de cálcio na regeneração de defeito crítico em calvária de rato*. 2010. 77f. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2010.

NIELSEN, S. P. The role biological of strontium. *Bone*, New York, v. 35, n. 3, p. 583-588, 2004.

PAULA, F. L. *Avaliação in vivo um compósito de hidroxiapatita e alginato no reparo ósseo*. 2008. 98f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2008.

PAULA, F. L. et al. Hydroxyapatite- alginate biocomposite promotes bone mineralization in different length scales in vivo. *Front. Mater. Sci.China.*, Pequim, v. 3,n. 2, p. 145-153, 2009.

PHILP, O. Procter tissue stimulation and disruptive technologies: an Orthopaedic industry perspective. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIBRATION THERAPY. 2006. *Anais...* Hong Kong, 2006.

REGINSTER, J. Y. et al. Effects of long-term strontium ranelate treatment on the risk of nonvertebral and vertebral fractures in postmenopausal osteoporosis: results of a five-year, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheumatology*, Atlanta, v. 58, n. 6, p. 1687-1695, 2008.

RIBEIRO, C.C.; BARRIAS, C.C.; BARBOSA, M.A. Preparation and characterisation of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med*, London, v.17, n.5, p.455-463, may, 2006.

ROLIM, A. E. H. *Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito crítico, em calvária de rato*. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2010.

ROLIM, A. E. H. *Estudo in vivo de materiais biomiméticos, associados ou não à administração enteral de estrôncio, para o reparo de defeito ósseo*. 2013. 201f. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

ROSCHEGER, P. et al. Bone mineralization density distribution in health and disease. *Bone*, New York, v. 42, n.3, p.456-466, mar. 2008.

SHARAN, K. et al. Role of calcium-sensing receptor in bone biology. *Indian J. Med. Res.*, New Delhi, v. 127, n. 3, p. 274-286, 2008.

SIKAVITSAS, V. I.; TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*, Guildford, v. 22, n.19, p.2581-2593, oct. 2001.

SOLTAN, M.; SMILER, D.; CHOI, J. H. Bone marrow: orchestrated cells, cytokines and growth factors for bone regeneration. *Implant Dent*, Baltimore, v.18, n.2, p.132-141, apr. 2009.

TALISH, R. J.; CUTTS I. G. Safety issues of whole body vibration and industry perspective of vibration therapy. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIBRATION THERAPY. 2006. *Anais...* Hong Kong, 2006.

TERRA, J. et al. The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, London, v.11, n. 3, p. 568-577, 2009.

TIAN, M. et al. In vivo study of porous strontium-doped calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications. *J. Mater. Sci.: Materials in Medicine.*, New York, v. 20, n. 7, p. 1505-1512, 2009.

TORVINEN S. et al. Effect of 4-min vertical whole body vibration on muscle performance and body balance: a randomized cross-over study. *Int J Sports Med.*, Newlands, v. 23, n. 5, p. 374-379, jul. 2002.

VERSCHUEREN, M. P. S. et al. Efeito do Treino de vibração de corpo inteiro durante 6 Meses na densidade da anca, força muscular e controlo postural das mulheres pós menopausa: efeito do treino de vibração de corpo inteiro na densidade do osso e na força muscular. *J. Bone and Miner. Res.*, Cambridge, UK, v.19, n.3, p.352-359, dez. 2003.

WALSH, W. Effect of dynamic motion therapy on bone defect healing with bone graft substitutes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIBRATION THERAPY. 2006. *Anais...* Hong Kong, 2006.

WANG, X.; YE, J. Variation of crystal structure of hydroxyapatite in calcium phosphate cement by the substitution of strontium ions. *J. Mater. Sci: Materials in Medicine*, New York, v. 19, n. 3, p. 1183-1186, 2008.



**ANEXO A – OFÍCIO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício: 57/2012

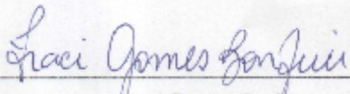
Feira de Santana, 08 de dezembro de 2012.

DE: Iraci Gomes Bonfim  
CEUA/UEFS

PARA: Fabiana Paim Rosa  
Prezada Senhora,

Estamos encaminhando para a V.Sa. cópia do parecer do projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação do Reparo Ósseo e Muscular em Rato, com uso de Biomateriais e Administração Enteral de Estrôncio**" sob a vossa coordenação, submetido nesta instituição sob o número de protocolo 004/2010. O projeto de pesquisa citado, foi analisado em reunião ocorrida no dia 21 de setembro de 2010, tendo sido aprovado.

Atenciosamente,

  
\_\_\_\_\_  
Iraci Gomes Bonfim  
Coordenadora em exercício na CEUA-UEFS

**ANEXO B – PARECER FINAL DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**Projeto de Pesquisa:** "Avaliação do Reparo Ósseo e Muscular em Rato, com Uso de Biomateriais e Administração Enteral de Estrôncio"

**Protocolo nº** 004/2010

**Pesquisador Responsável:** Prof.<sup>a</sup> Fabiana Paim Rosa

**PARECER FINAL**

O parecerista foi **FAVORÁVEL** à execução do projeto por considerar que:

- 1- A pesquisa está em consonância com a norma ética no uso de animais na experimentação (aplicação do princípio dos 3Rs)
- 2- O objetivo proposto busca analisar o comportamento biológico de biomateriais, associados ou não à administração enteral de hidroxiapatita dopada com estrôncio, no reparo ósseo em defeitos críticos e não críticos, e, do efeito da cinesioterapia no tecido ósseo e muscular.
- 3- Há adequação e consistência teórica e metodológica, tendo em vista a subdivisão organizada, clara e embasada em referências atualizadas.
- 4- Considera-se ainda que o projeto irá gerar conhecimento, formando jovens pesquisadores na graduação, mestrado e doutorado, além de ser relevante e exequível.

Os pesquisadores deverão remeter a CEUA-UEFS os relatórios parciais e final para que sejam encaminhados ao CONCEA via CIUCA, conforme o Decreto 6999/2009, Artigo 44<sup>o</sup>, parágrafo VII e Artigo 9<sup>o</sup>, parágrafos de I a X, em obediência à Lei 11.794/2008.

Parecer aprovado *em Reunião*, no dia 21 de setembro de 2010.

Feira de Santana, 08 de dezembro de 2012.

Iraci Gomes Bonfim  
Coordenadora em exercício da CEUA-UEFS

2013



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>