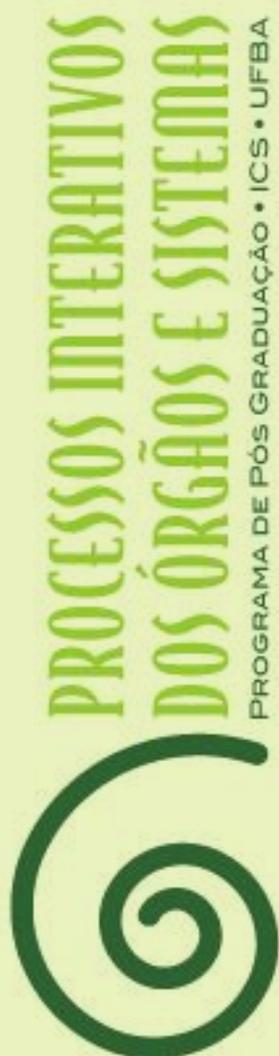


UFBA

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde

Iorrana Índira dos Anjos Ribeiro



**EFEITOS DO ESTRÔNCIO, LOCAL E
SISTÊMICO, NA REGENERAÇÃO DE
DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS**

Salvador
2018

IORRANA ÍNDIRA DOS ANJOS RIBEIRO

**EFEITOS DO ESTRÔNCIO, LOCAL E SISTÊMICO, NA
REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa
Coorientador: Prof. Dr. Fúlvio Borges Miguel

Salvador
2018

Ribeiro, Iorrana Índira dos Anjos
Efeitos do estrôncio, local e sistêmico, na
regeneração de defeitos ósseos críticos / Iorrana Índira
dos Anjos Ribeiro. -- Salvador, 2018.
53 f. : il

Orientadora: Fabiana Paim Rosa.
Coorientador: Fúlvio Borges Miguel.
Tese (Doutorado - Processos Interativos dos Órgãos
e Sistemas) -- Universidade Federal da Bahia,
Universidade Federal da Bahia, 2018.

1. Alginato. 2. Biomateriais. 3. Estrôncio. 4.
Hidroxiapatita. 5. Reparo ósseo. I. Rosa, Fabiana
Paim. II. Miguel, Fúlvio Borges. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DA DOUTORANDA
IORRANA ÍNDIRA DOS ANJOS RIBEIRO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de dois mil e dezoito, às 14 horas, reuniu-se em sessão pública a Comissão Examinadora constituída pelos Professores Fabiana Paim Rosa, , Eliana Cristina da Silva Rigo, Gabriela Botelho Martin Marcelo Henrique Prado da Silva e José Antonio Menezes Filho designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, com a finalidade de apreciar a Defesa Pública da Tese intitulada, Efeito da administração enteral de estrôncio na regeneração de defeitos ósseos críticos, da Doutoranda Iorrana Índira dos Anjos Ribeiro, sob a orientação do Prof.^a Dr.^a Fabiana Paim Rosa. Ao final dos trabalhos, os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Prof.^a Dr.^a Fabiana Paim Rosa Aprovada

Prof.^a Dr.^a Eliana Cristina da Silva Rigo ECRigo aprovada

Prof.^a Dr.^a Gabriela Botelho Martins APROVADA

Prof. Dr. Marcelo Henrique Prado da Silva APROVADA

Prof. Dr. José Antonio Menezes Filho aprovada

Franqueada a palavra, como não houve quem desejasse fazer uso da mesma lavrou-se a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada por todos.

Salvador, Bahia, 27 de fevereiro de 2018

Prof.^a Dr.^a Fabiana Paim Rosa Fabiana Paim Rosa

Prof.^a Dr.^a Eliana Cristina da Silva Rigo ECRigo

Prof.^a Dr.^a Gabriela Botelho Martins Gabriela Botelho Martins

Prof. Dr. Marcelo Henrique Prado da Silva Marcelo Henrique Prado da Silva

Prof. Dr. José Antonio Menezes Filho José Antonio Menezes Filho

A

Raimundo Nonato (*in memoriam*), meu querido pai, por sempre demonstrar seu orgulho por mim.

Eunice, Itana, Ivana e Ilana, minha amada mãe e irmãs, por acreditarem em mim e me incentivar em cada passo da minha jornada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa, pela dedicação, ensinamentos, paciência e compreensão. E, principalmente, pelo esforço na reestruturação do nosso Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB).

Ao Prof. Dr. Fúlvio Borges Miguel, meu coorientador, pela mão estendida, cuidado e ensinamentos. Sou muito grata pela sua presença em minha vida acadêmica e pessoal. Sem você não chegaria ao fim desta caminhada.

Ao Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior agradeço o tempo dedicado à análise histológica deste trabalho.

Aos pesquisadores do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF-RJ), em especial, Alexandre Malta Rossi e Sílvia Raquel Albuquerque Santos, pela produção, caracterização e concessão dos biomateriais. Obrigada pela disposição em me esclarecer dúvidas e responder aos meus pedidos.

Ao Prof. Dr. José Antônio Menezes Filho e aos demais pesquisadores do Laboratório de Toxicologia Clínica, Ambiental e Ocupacional da Universidade Federal da Bahia, pela colaboração com a realização das análises plasmáticas. Obrigada pela presteza e dedicação.

Aos colegas do LBTB, especialmente, Anderson Cunha, Flávia Daltro, George Gonçalves, Guillermo Lopez, Luísa Queiroz e Renata Almeida, pela contribuição para execução e publicação deste trabalho, pelos ouvidos atentos e pela parceria de sempre.

Às técnicas de laboratório, Elisângela e Cristina, pelo cuidado no processamento dos espécimes.

À Júnior, funcionário do biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), pela contribuição com a manipulação dos animais, eficiência e dedicação.

Aos alunos de iniciação científica pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPESB pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

RIBEIRO, Iorrana Índira dos Anjos. **Efeitos do estrôncio, local e sistêmico, na regeneração de defeitos ósseos críticos**. Salvador, 2018. 52f. il. Tese (Doutorado em Processos interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia. 2018.

RESUMO

O estrôncio (Sr) é um elemento traço não essencial, química e fisiologicamente semelhante ao cálcio (Ca), que tem duplo efeito sobre o metabolismo ósseo, por meio do estímulo à formação óssea pelos osteoblastos, o outro mediante a inibição da reabsorção óssea pelos osteoclastos. Diante disso, as pesquisas que relacionam o Sr com o tecido ósseo passaram a ter mais destaque após o desenvolvimento do fármaco ranelato de estrôncio (RS), utilizado para diminuir o risco de fraturas em pacientes osteoporóticos. Com isso, estudos passaram a avaliar a ação do Sr sobre a regeneração óssea, tanto sistêmica quanto localmente, em indivíduos/animais sem osteoporose. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do Sr, mediante o uso local e sistêmico, de hidroxiapatita nanoestruturada substituída por Sr/alginate (nHASr) na regeneração de defeitos ósseos críticos. Uma amostra de 30 animais foi utilizada e distribuída para a composição de três grupos experimentais, avaliados aos 15, 30 e 60 dias de pós-operatório: **GnHASr** – defeito ósseo preenchido com microesferas de hidroxiapatita nanoestruturada substituída por 1% de Sr/alginate (nHASr1%) e sem administração enteral; **GnHASrAlg** – defeito ósseo vazio e administração enteral de microesferas de hidroxiapatita nanoestruturada substituída por 50% de Sr/alginate; **GC** – defeito ósseo vazio e sem administração enteral (grupo controle). Os resultados histológicos demonstraram, em todos os pontos biológicos e grupos experimentais, neoformação óssea reacional restrita às bordas do defeito e preenchimento da área residual por tecido conjuntivo fibroso. As análises bioquímicas evidenciaram que as concentrações plasmáticas de Sr apresentaram valores próximos ao grupo controle. Diante disso, o Sr tanto local quanto sistemicamente não favoreceu o incremento da regeneração dos defeitos ósseos críticos.

Palavras-chave: Alginate, Biomateriais, Estrôncio, Hidroxiapatita, Reparo ósseo.

RIBEIRO, Iorrana Índira dos Anjos. **Effects of strontium, local and systemic, in the regeneration of critical bone defects.** Salvador, 2018. 52f. il. Theses (Doctorate degree in Interactive processes of systems and organs) – Health Science Institute, Federal University of Bahia. 2018.

ABSTRACT

Strontium (Sr) is a trace element non-essential, chemically and physiologically similar to calcium (Ca), which has a double effect on bone metabolism, by stimulating bone formation by osteoblasts, the other by inhibiting bone resorption by osteoclasts. Therefore, the research that correlates the Sr with the bone tissue has become more prominent after the development of the drug strontium ranelate (RS), used to reduce the risk of fractures in osteoporotic patients. With this, studies began to evaluate the action of Sr on bone regeneration, both systemically and locally, in individuals/animals without osteoporosis. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of Sr, through the local and systemic use, of strontium-containing nanostructured hydroxyapatite/alginate in the regeneration of critical bone defects. A sample of 30 animals was used and distributed for the composition of three groups, evaluated at 15, 30 and 60 postoperative days: **GnHASr** – critical bone defect filled with microspheres of 1% strontium-containing nanostructured hydroxyapatite/alginate (nHASr1%) and without enteral administration; **GnHASrAlg** – critical bone defect without implantation of biomaterial and enteral administration of 50% strontium-containing nanostructured hydroxyapatite/alginate (nHASrAlg); and **GC** – critical bone defect without implantation of biomaterial and without enteral administration (control group). The histological results demonstrated, in all biological points and experimental groups, a reactive bone neoformation restricted to the edges of the defect and filling of the residual area by fibrous connective tissue. Biochemical analyzes showed that plasma concentrations of Sr presented values close to the control group. Therefore, Sr both locally and systemically did not favor the increment of regeneration of critical bone defects.

Keywords: Alginate, Biomaterials, Strontium, Hydroxyapatite, Bone Repair.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 A1	DRX (A) e EVITF (B) das microesferas de nHASr1% e HA padrão.	22
Figura 2 A1	Fotomicrografias do GnHASrAlg (A, C, E e G) e GC (B, D, F e H)	24
Figura 3 A1	Percentual de matriz osteoide neoformada nos grupos GC e GnHASr.	25
Figura 1 A2	DRX (A) e EVITF (B) das microesferas de nHASrAlg e HA padrão.	33
Figura 2 A2	Fotomicrografias do GnHASrAlg (A, C e E) e do GC (B, D e F).	35
Figura 3 A2	Percentual de matriz osteoide neoformada (%MO) nos grupos GC e GnHASrAlg.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 A1	Espectrometria por Absorção Atômica das microesferas de nHASr1% e HA padrão.	22
Tabela 1 A2	Espectrometria por Absorção Atômica das microesferas de nHASrAlg e HA padrão.	33
Tabela 2 A2	Concentrações plasmáticas de Sr^{+2} e Ca^{+2} , média ($\pm DP$), do GnHASrAlg e GC, aos 15 e 60 dias de pós-operatório	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%MO	Percentual de matriz osteoide neoformada
®	Marca registrada
°C	Graus celsius
µm	Micrometro
A1	Artigo 1
A2	Artigo 2
<i>ad libitum</i>	Expressão latina que significa “à vontade”
Ba	Bário
BV	Biovidro
Ca	Cálcio
Ca ⁺²	Cálcio ionizado
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio dihidratado
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm ⁻¹	Comprimento de onda recíproco
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMO	Densidade mineral óssea
DP	Desvio padrão
DRX	Difração de Raios-X
EAA	Espectrometria de Absorção Atômica
EAAC	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama
EAAFG	Espectrometria de Absorção Atômica com forno de grafite
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>et al.</i>	Abreviatura de et ali que significa “e outros”
EVITF	Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por transformada de Fourier
F	Flúor
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
g	Gramma
GC	Grupo controle
GnHASr	Grupo com implantação de microesferas de hidroxiapatita nanoestruturada substituída com 1% de estrôncio/alginato
GnHASrAlg	Grupo com implantação de microesferas de hidroxiapatita nanoestruturada substituída com 50% de estrôncio/alginato

h	Hora
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina-eosina
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IFBA	Instituto Federal da Bahia
IPAC	Instituto de Patologia Geral e Cutânea
Kg	Quilograma
L	Litro
LAS	<i>Leica Application Suite</i>
M	Molar
m ²	Metros quadrados
Mg	Magnésio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
MO	Matriz osteoide
Na	Sódio
nHA	Hidroxiapatita nanoestruturada
nHASr	Hidroxiapatita nanoestruturada substituída com estrôncio
nHASr1%	Hidroxiapatita nanoestruturada substituída com 1% de estrôncio
nHASr50%	Hidroxiapatita nanoestruturada substituída com 50% de estrôncio
nHASrAlg	Hidroxiapatita nanoestruturada substituída com 50% de estrôncio/alginato
n ^o	Número
P	Fósforo
RI	Resposta inflamatória
RS	Ranelato de estrôncio
Sr	Estrôncio
Sr(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Nitrato de estrôncio
Sr ⁺²	Estrôncio ionizado
Tc	Tecido conjuntivo
TCP	Fosfato tricálcico
TG	Tricômico de Masson-Goldner
UFBA	Universidade Federal da Bahia
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	ARTIGO 1 (A1).....	18
2.1	Introdução.....	20
2.2	Materiais e Métodos.....	21
2.3	Resultados.....	23
2.4	Discussão.....	25
2.5	Conclusão.....	27
3	ARTIGO 2 (A2).....	29
3.1	Introdução.....	31
3.2	Materiais e Métodos.....	32
3.3	Resultados.....	35
3.4	Discussão.....	37
3.5	Conclusão.....	39
4	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS.....	43
	ANEXO.....	52

1 INTRODUÇÃO

O estrôncio (Sr) é um elemento alcalino-terroso, do grupo IIA da tabela periódica, assim como magnésio (Mg), cálcio (Ca) e bário (Ba)^{1,2}, e pode existir em dois estados de oxidação: 0 e +2³. Este último é mais estável em condições ambientais normais (3). Devido a sua alta reatividade, o Sr não é encontrado puro na natureza e sim associados a outros elementos²⁻⁵.

Química e fisiologicamente o Sr é semelhante ao Ca, e, desta forma, competem por proteínas transportadoras, são absorvidos no intestino delgado, depositados no tecido ósseo e nos dentes, e excretados, principalmente, pela urina¹⁻⁶. Alguns estudos têm mostrado que o Sr é absorvido, em sua maioria, por difusão passiva⁷. Porém, outros estudos relatam que este metal pode, também, ter sua absorção mediada por transportador, assim como o Ca⁷. Quanto a excreção, ocorre, principalmente, pela urina e em menor quantidade nas fezes e no suor^{3,6,7}.

Embora o Sr seja considerado um elemento traço não essencial, este metal tem papel duplamente relevante no metabolismo ósseo⁸, uma vez que, estimula à formação óssea e inibe a reabsorção deste tecido^{1,2,9,10}. Este metal é encontrado, principalmente, no tecido ósseo recém-formado e em ossos esponjosos, tendo em vista que a captação de Sr no tecido ósseo está intimamente correlacionada com a remodelação óssea^{1,11-14}. Assim, regiões que evidenciam maior taxa de reabsorção/neoformação óssea são aquelas que apresentam maior percentual de deposição deste metal^{1,13,14}. Vale ressaltar que, a incorporação do Sr ao tecido ósseo depende da dose, do sexo, da duração do tratamento e do *turnover* ósseo; e, ocorre por meio de dois mecanismos: (I) adsorção na superfície do cristal de hidroxiapatita (HA) ou (II) substituição iônica nos cristais de HA¹. O primeiro é o principal e o mais rápido. Por outro lado, a substituição iônica é um processo mais lento e ocorre em menor proporção, a cada 10 moléculas de Ca uma é substituída por Sr¹.

Após o desenvolvimento do fármaco ranelato de estrôncio (RS), o papel deste íon associado ao metabolismo ósseo passou a ter maior destaque^{4,9,14,15}. O RS é utilizado no tratamento da osteoporose, para aumento da densidade mineral óssea, com o intuito de diminuir o risco de fraturas, em função da sua dupla ação

farmacológica¹⁶⁻¹⁹. Baseado nestes conceitos, novos estudos têm sido realizados para compreender o uso deste íon na regeneração óssea em animais e indivíduos não osteoporóticos²⁰⁻²⁴. Vale ressaltar que, o uso prolongado do RS pode desencadear efeitos colaterais que ponham em risco a saúde do indivíduo, como, por exemplo, desenvolvimento de doenças cardiovasculares e intoxicação²⁵⁻²⁸, desta forma, faz-se necessário, o desenvolvimento de um fármaco que possa atuar como substituto do RS.

Neste sentido, um biomaterial que tem sido amplamente utilizado para regeneração de defeito ósseo é a HA sintética. Devido aos avanços científicos ocorridos nas últimas décadas esta cerâmica deixou de ser utilizada apenas como *scaffold* para a regeneração óssea e passou a ter outras aplicações, como, por exemplo, liberação controlada de drogas, especialmente quando produzida pelos princípios da nanociência²⁹. Os quais favorecem aumento da solubilidade, modificações na porosidade, redução do tamanho da partícula, o que conseqüentemente aumenta a área de superfície, a biodegradação e a bioabsorção dos biomateriais^{29,30}.

Durante a síntese da HA nanoestruturada (nHA) a estabilidade e flexibilidade da sua estrutura possibilita diferentes substituições iônicas³¹, deste modo diversos cátions e ânions podem ser permutados, modificando a estrutura da HA estequiométrica, assemelhando-se a HA biológica^{32,33}. Nestas técnicas um cátion bastante utilizado na substituição do Ca é o Sr^{34,35}. Este, por apresentar dimensões maiores que o Ca³⁶, altera a estrutura do cristal, e algumas propriedades do material, tais como, estabilidade de fase, solubilidade, reatividade^{33,37,38} e diminui a resistência mecânica da cerâmica^{38,39}.

Tendo em vista a maior solubilidade da nHA substituída por Sr (nHASr) comparada com a HA estequiométrica, os pesquisadores têm utilizado diferentes polímeros com o objetivo de melhorar a taxa de biodegradação deste biomaterial, dentre estes, destaca-se o alginato. Um polissacarídeo extraído de algas marrons (*Phaeophyceae*), biocompatível, biodegradável^{40,41}, e que, quando em contato com íons divalentes tem a capacidade de formar um hidrogel, que possibilita a formação de microesferas num modelo conhecido como *egg box*^{41,42}.

Estes compósitos normalmente são utilizados localmente a fim de proporcionar a liberação direta do Sr na região de implantação. Todavia, o propósito deste estudo

foi utilizar também o biomaterial nHASr, como carreador deste íon, com o objetivo de atingir uma concentração plasmática que poderia ter efeito benéfico sobre o metabolismo ósseo. Segundo Ammann *et al.*⁴³, uma concentração plasmática de 0,30 a 0,35 mmol/L, após tratamento com uma dose de 900 mg/kg/dia de RS foi suficiente para promover aumento da massa e volume ósseo, e, conseqüentemente, aumento da resistência óssea; e melhora da qualidade do tecido ósseo.

Isto posto, fica evidente a necessidade e relevância de desenvolver estudos que evidenciem benefícios de nHASr na regeneração de defeito ósseo em animais sem osteoporose, bem como, desenvolver uma alternativa ao RS utilizado atualmente no tratamento da osteoporose.

Para isto, esta tese foi dividida em 4 capítulos: Introdução, Artigo 1, Artigo 2 e Conclusão. O artigo 1 intitulado “Microesferas de hidroxiapatita nanoestruturada substituída por estrôncio/alginate para regeneração óssea” teve como objetivo analisar, histomorfometricamente, o potencial osteogênico de microesferas de nHASr. Em contrapartida, o artigo 2 intitulado “Efeito da administração enteral de hidroxiapatita nanoestruturada substituída com estrôncio/alginate no reparo ósseo” objetivou avaliar o efeito da administração enteral do Sr, mediante o uso de hidroxiapatita nanoestruturada substituída com estrôncio/alginate, (nHASrAlg) no reparo de defeito ósseo crítico.

*Capítulo 2 – Microesferas de hidroxiapatita nanoestruturada
substituída por estrôncio/alginato para regeneração óssea*

2 ARTIGO 1

Microesferas de hidroxiapatita nanoestruturada substituída por estrôncio/alginate para regeneração óssea

Microspheres of strontium-containing nanostructured hydroxyapatite/alginate for bone regeneration

Iorrana Índira dos Anjos RIBEIRO^a; Alexandre Malta ROSSI^b; Aryon de Almeida BARBOSA JÚNIOR^c; Sílvia Rachel de Albuquerque SANTOS^b; Guillermo Alberto LÓPEZ^d; Renata dos Santos ALMEIDA^a; Fúlvio Borges MIGUEL^e; Fabiana Paim ROSA^a

^aInstituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil; ^bCentro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ^cInstituto de Patologia Geral e Cutânea (IPAC), Salvador, BA, Brasil; ^d Instituto Federal da Bahia (IFBA), Salvador, BA, Brasil; ^eCentro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Santo Antônio de Jesus, BA, Brasil

Resumo

Objetivo: Analisar, histomorfometricamente, o potencial osteogênico de microesferas de hidroxiapatita nanoestruturada substituída com estrôncio/alginate (nHASr). **Métodos:** 20 ratos *Wistar*, machos, adultos, foram distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos experimentais, com cinco animais em cada grupo/ponto biológico: GnHASr – defeito ósseo crítico preenchido com microesferas de hidroxiapatita nanoestruturada substituída com 1% de estrôncio/alginate; e GC – defeito ósseo crítico sem implantação de biomaterial (grupo controle); avaliados nos pontos biológicos de 30 e 60 dias de pós-operatório. Na análise histológica avaliou-se a resposta inflamatória (RI), a neovascularização, a neoformação de matriz osteóide (MO) e a formação de tecido conjuntivo (TC). No estudo histomorfométrico quantificou-se a área de matriz osteóide neoformada. **Resultados:** Na análise histológica observou-se, nos dois pontos biológicos, em ambos os grupos, deposição de MO próxima às bordas do defeito; RI crônica discreta; formação de TC na área residual do defeito; e neovascularização. Estes dois últimos achados foram mais evidentes no GnHASr. Neste grupo, a deposição de MO ocorreu tanto no interior das microesferas quanto de modo circunjacente às partículas do biomaterial, o qual apresentou-se fragmentado nos dois pontos biológicos. Na análise histomorfométrica, o nHASr evidenciou um percentual de deposição de MO de 7,54%, enquanto que no GC este valor foi de 6,80%, aos 60 dias de pós-operatório. **Conclusão:** As microesferas de nHASr apresentaram potencial osteogênico limitado

às partículas próximas às bordas, foram biocompatíveis e osteocundutoras e, desta forma, são apropriadas para aplicação como biomaterial de preenchimento.

Palavras-chave: Defeito ósseo crítico; Estrôncio; Hidroxiapatita; Reparo ósseo; Materiais biocompatíveis.

Introdução

Lesões ósseas extensas consequentes de traumatismos, osteotomias, ressecções tumorais, acidentes automobilísticos, dentre outros, podem comprometer a funcionalidade e estética da área acometida^{44,45}, uma vez que, estas perdas teciduais não regeneram espontaneamente e tem o reparo finalizado por fibrose⁴⁵. Estas situações representam grande desafio para os profissionais da área da saúde e para os pesquisadores da área da Bioengenharia Tecidual Óssea, os quais têm pesquisado e/ou aperfeiçoado e, quando possível, utilizado clinicamente, diferentes técnicas regenerativas e biomateriais com o intuito de estimular a regeneração tecidual nestas condições inóspitas.

Dentre os biomateriais sintéticos mais utilizados nas técnicas regenerativas ósseas, os fosfatos de cálcio, em especial a hidroxiapatita (HA), o biovidro (BV) e o fosfato tricálcico (TCP) têm sido amplamente investigados⁴⁶, principalmente, devido à bioatividade, ausência de toxicidade e similaridade com a fase mineral do tecido ósseo^{35,47-49}, bem como pela biocompatibilidade^{47,48} que estes materiais apresentam. Todavia, a taxa de biodegradação destes biomateriais depende das técnicas utilizadas durante a síntese e processamento destas cerâmicas⁴⁹.

Neste sentido, alguns pesquisadores têm desenvolvido materiais biomiméticos, como, por exemplo, a HA nanoestruturada (nHA), substituída ou não, por metais presentes no tecido ósseo, como o flúor (F), o estrôncio (Sr), o magnésio (Mg), o zinco (Zn), e outros^{50,51}. A nHA resultante apresenta alterações nas suas propriedades físico-químicas e na resposta biológica após implantação *in vivo*, haja visto que esta cerâmica possui baixa cristalinidade, maior biodegradabilidade e bioatividade, o que a aproxima da HA biológica^{29,35,37,52}.

Dentre os metais utilizados como substituto do cálcio (Ca) na estrutura da HA, o Sr tem atraído grande interesse científico e clínico, posto que, este íon, quando utilizado na forma de ranelato de estrôncio (RS), estimula a diferenciação e a proliferação de osteoblastos com consequente formação de matriz mineralizada,

bem como, promove a redução da diferenciação e atividade dos osteoclastos^{9,10,53}, o que proporciona aumento da densidade mineral óssea (DMO)⁴³. Este duplo papel tem instigado o desenvolvimento de novos estudos que subsidiem a compreensão da influência do Sr no reparo ósseo, em animais não osteoporóticos^{49,52,54,55}, especialmente, quando associado aos biomateriais.

Segundo Bootchanont *et al.*⁵⁶, a substituição do Sr na estrutura da HA modifica sua estabilidade térmica, solubilidade, textura e reatividade de superfície. Ademais, altera a porosidade do biomaterial³⁵, o que pode impactar positivamente na adesão, proliferação e diferenciação dos osteoblastos com consequente, neoformação de matriz mineralizada^{35,48}. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi analisar, histomorfometricamente, o potencial osteogênico de microesferas de hidroxiapatita nanoestruturada substituída com estrôncio/alginate (nHASr) após a implantação em defeito ósseo crítico, em calvária de rato adulto.

Materiais e Métodos

Biomateriais

A síntese, o processamento e a caracterização dos biomateriais foram realizadas no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Processamento das Microesferas de Hidroxiapatita Nanoestruturada Substituída com 1% de Estrôncio – nHASr1%

Para a produção das microesferas, misturou-se o pó de nHASr1% a uma solução de alginate de sódio na proporção 15:1, sob leve agitação até a obtenção de uma pasta homogênea. Em seguida, gotejou-se esta pasta em uma solução de cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.15M), com finalidade de formação imediata das microesferas, que permaneceram nesta solução por 24 horas, para completa geleificação. Posteriormente, o biomaterial foi lavado em água deionizada e seco em estufa a 60°C, durante 24 horas. Após, as microesferas foram separadas de acordo com a faixa granulométrica de 425 a 600 μm e acondicionadas em frascos apropriados, esterilizadas e armazenadas até a realização do procedimento cirúrgico.

Caracterização Físico-Químicas das Microesferas de nHASr1%

As microesferas de nHASr1% foram caracterizadas quanto a área superficial pelo método BET; a composição química pela Espectrometria por Absorção Atômica (EAA); a cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX); a presença de grupos funcionais pela Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por Transformada de Fourier (EVITF). A área superficial das microesferas de nHASr1% foi de 75,38 m²/g e os percentuais de Ca, fósforo (P) e Sr estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Espectrometria por Absorção Atômica das microesferas de nHASr1% e HA padrão.

Amostra	Ca %	mol do Ca	P %	mol do P	Metal %	mol do Metal	Razão Ca/P
HA	36,28	0,905	16,73	0,540	-	-	1,675
nHASr	43,80	1,093	17,50	0,565	0,43	0,005	1,935

O DRX evidenciou que as microesferas de nHASr1% apresentaram a base dos picos principais ligeiramente mais larga que os picos da HA padrão (Figura 1A), demonstrando menor cristalinidade deste biomaterial. O EVITF revelou bandas correspondentes à HA padrão, exceto nas regiões 1438 cm⁻¹, 1365 cm⁻¹ e 870cm⁻¹, que indicam a presença do íon carbonato, em função do alginato utilizado durante o processamento das microesferas. A presença das bandas de água no espectro do EVITF comprova que as microesferas não foram tratadas termicamente (Figura 1B).

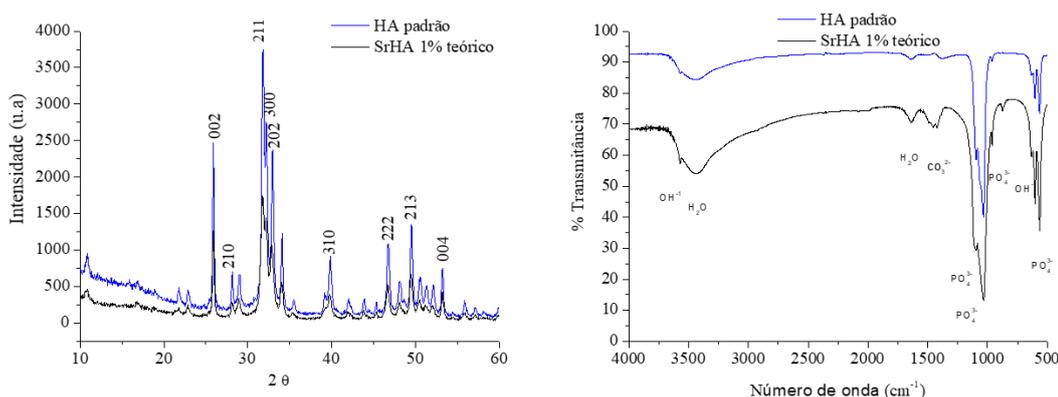


Figura 1 – DRX (A) e EVITF (B) das microesferas de nHASr1% e HA padrão. **Fonte:** CBPF.

Procedimentos Experimentais

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciência da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), sob o protocolo nº 063/2014.

Vinte ratos *Wistar*, machos, adultos, com peso médio de 375 g e três a quatro

meses de idade, foram separados, aleatoriamente, em dois grupos experimentais: GnHASr – defeito ósseo crítico preenchido com microesferas de nHASr1%; e GC – defeito ósseo crítico sem implantação de biomateriais (grupo controle), avaliados nos pontos biológicos de 30 e 60 dias de pós-operatório, com cinco animais em cada grupo/período. Durante todo período experimental, os animais foram mantidos separados em caixas de propileno, adequadas para animais, e alimentados com dieta sólida padrão e água *ad libitum*.

O procedimento cirúrgico para confecção do defeito ósseo crítico criado na porção mediana da calvária foi idêntico ao descrito por Miguel *et al.*⁵⁷. Contudo, no presente estudo, os defeitos ósseos foram confeccionados com, aproximadamente, 8,5 mm de diâmetro e, aproximadamente, 0,8 mm de espessura.

Etapa Laboratorial e Análise Histomorfométrica

Nos pontos biológicos de 30 e 60 dias os animais foram eutanasiados por dose letal de anestésico, de acordo com a Resolução Normativa nº 37 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)⁵⁸. Logo após, removeu-se a porção superior da calvária com retirada dos tecidos moles e fixação em formaldeído a 4%, por 72h. Posteriormente, as amostras foram descalcificadas em EDTA 5%, por 7 dias, e encaminhadas para processamento histológico de rotina. Os espécimes foram cortados com 5 µm de espessura e os cortes histológicos foram corados por hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de *Masson-Goldner* (TG) e examinados por microscopia de luz comum.

Na análise histomorfométrica mensurou-se, por meio do *software* LAS - *Leica Application Suite* (*Leica*®, *Biosystems Nussloch GmbH, Germany*), o percentual de matriz osteoide neoformada (%MO). Para tanto, uma área medindo 8,5 x 0,8 mm foi delimitada de modo a equivaler à área total do defeito. Os valores obtidos foram descritos por média e desvio padrão e avaliados pelo teste estatístico de Wilcoxon.

Resultados

Análise histológica

Nos dois grupos experimentais, aos 30 dias, notou-se neoformação de matriz osteoide (MO) restrita às bordas do defeito, com presença de osteócitos. Aos 60 dias, no GnHASr, este achado estendeu-se, em direção centrípeta, de forma adjacente e de permeio às partículas do biomaterial, e mostrou-se mais organizado

do que no período anterior, com formação de lamelas concêntricas (Figura 2A e 2B). No GC, a neoformação de MO manteve-se restrita às bordas ósseas, contudo sem formação de lamelas concêntricas (Figura 1C e 1D). Neste grupo, a área residual do defeito foi preenchida por tecido conjuntivo (TC) com espessura reduzida em relação à borda óssea, nos dois pontos biológicos, principalmente, aos 60 dias, quando este tecido foi visto mais delgado e adensado que aos 30 dias. (Figura 2C e D).

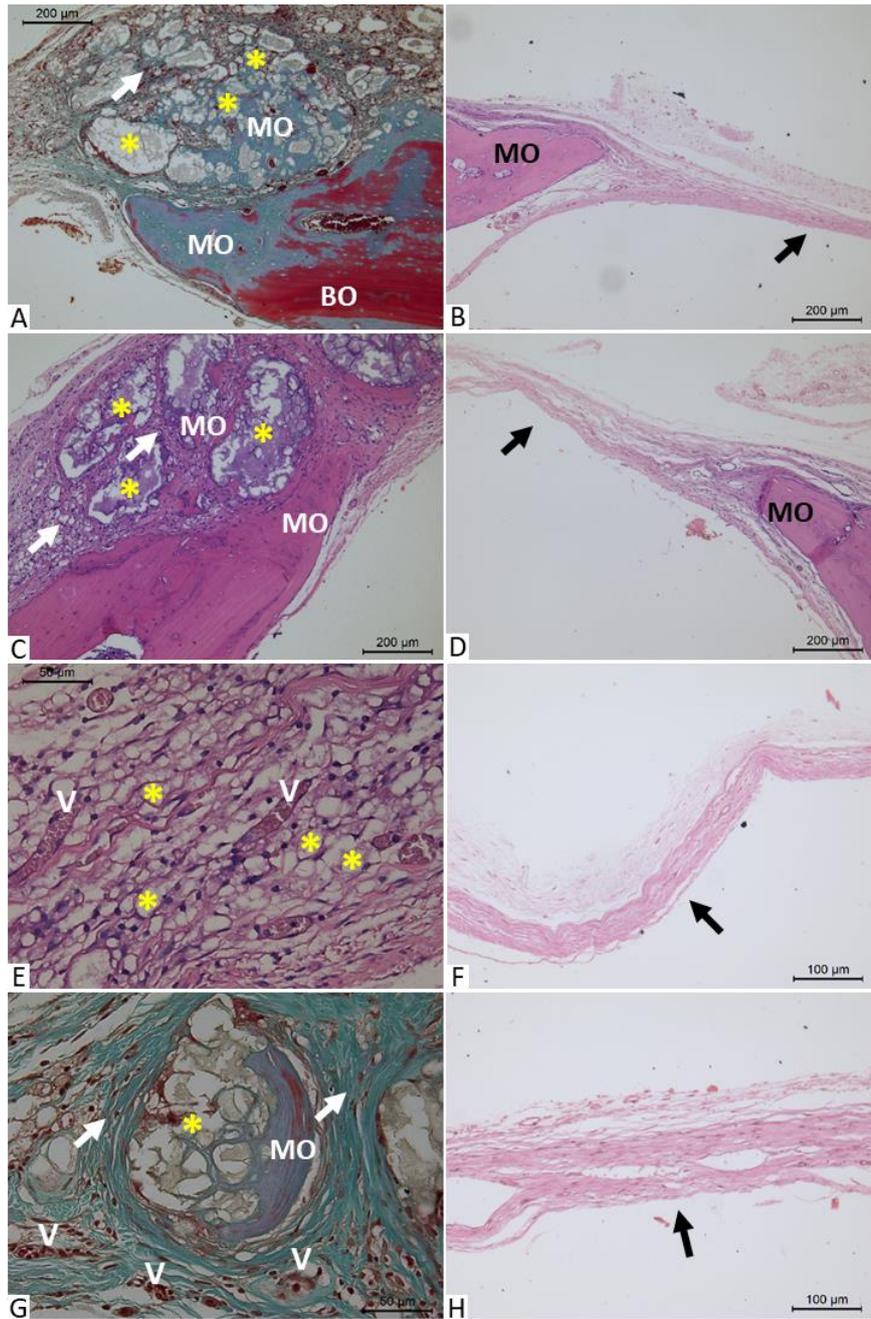


Figura 2 – Fotomicrografias do GnHASrAlg (A, C, E e G) e GC (B, D, F e H). MO – matriz osteoide neoformada; BO – borda do defeito ósseo; asterisco (*) – partículas de biomaterial; V – vasos sanguíneos; seta (→) – tecido conjuntivo. Coloração HE – B, C, D, E, F e H; Coloração TG – A e G.

No GnHASr, durante todo o período experimental, o biomaterial mostrou-se ora íntegro ora fragmentado, ocupando toda a extensão do defeito. Nas regiões próximas às bordas ósseas, as microesferas apresentaram-se permeadas por neoformação de MO e por TC frouxo. Na região central do defeito, as partículas do biomaterial foram vistas circundadas por TC frouxo rico em vasos sanguíneos.

Em ambos os grupos experimentais, nos dois pontos biológicos, notou-se inflamação crônica discreta. No GnHASr, esta inflamação foi do tipo crônica granulomatosa com escassa presença de células gigantes multinucleadas circunjacentes às partículas do biomaterial.

Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica da neoformação de MO evidenciou que este tecido foi observado nos dois grupos, ao longo do experimento. Todavia, a comparação, pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, entre as médias obtidas nos grupos, mostrou que não houve diferenças estatisticamente significantes, em nenhum dos pontos biológicos ($p = 0,686$) (Figura 3).

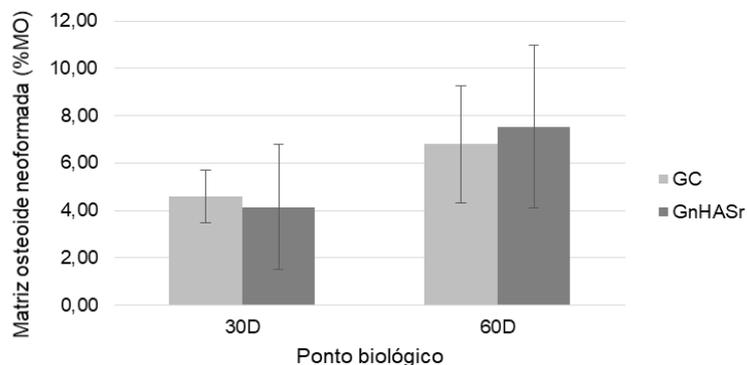


Figura 3 – Percentual de matriz osteoide neoformada nos grupos GC e GnHASr.

Discussão

No presente estudo, defeitos ósseos críticos foram confeccionados na calvária de ratos adultos, com o objetivo de avaliar o potencial osteogênico de microesferas de nHASr, tendo vista que este modelo experimental tem sido amplamente utilizado nos estudos *in vivo* que envolvem a avaliação do mecanismo de regeneração óssea. Esta escolha ocorre porque este sítio possui características anatômicas e fisiológicas que possibilitam fácil acesso, reprodutibilidade e manipulação cirúrgica; não requer fixação pós-operatória; e tem risco reduzido de complicações pós-cirúrgicas^{45,59}. Além disto, o defeito ósseo produzido possui

características morfológicas críticas de extensão e largura, em que a regeneração óssea espontânea não ocorre ao longo da vida do animal⁶⁰. Os achados histológicos do GC demonstraram estas características ao longo do nosso estudo, uma vez que a neoformação óssea reparativa foi restrita às bordas do defeito, com formação de TC fibroso na área remanescente⁶¹⁻⁶³.

Estudos têm demonstrado que a HA biológica é uma apatita carbonatada, não estequiométrica⁶⁴ que possui alguns íons na sua estrutura, como, por exemplo, F, Mg, Zn e Sr⁴⁷. Assim, realizar substituições iônicas, com íons específicos, na estrutura da HA sintética, pode aproximá-la da biológica, modificar sua cristalinidade e solubilidade e interferir diretamente na sua biodegradabilidade, características relevantes na regeneração óssea. No presente estudo, a substituição de uma parte dos íons de Ca da nHA por Sr, 1% teórico e 0,43% prático, pode ter influenciado na biodegradação das microesferas após a implantação, tendo em vista que a presença deste metal no biomaterial diminui sua cristalinidade quando comparado com uma HA padrão. A biodegradação evidente também pode estar correlacionada com as características nanoestruturais das microesferas avaliadas, o que melhora a bioatividade e aumenta a área de superfície do material, favorecendo, desta forma, a migração, fixação, diferenciação e proliferação das células circunjacente às microesferas^{37,65}.

As microesferas de nHASr avaliadas em nosso estudo mostraram-se biocompatíveis, biodegradáveis, bioativas e osteocondutoras haja vista que exibiram deposição de MO em contato direto com as partículas do biomaterial. Sabe-se que o Sr atua de forma positiva sobre a neoformação óssea, com estímulo da diferenciação e proliferação de osteoblastos, e negativamente sobre a reabsorção óssea, por meio da inibição da ação dos osteoclastos¹⁰. Contudo, a análise histomorfométrica evidenciou que não houve diferença significativa entre o %MO no GnHASr e no GC. Isto corrobora com os resultados encontrados por Machado *et al.*⁴⁷, que também não observaram maior neoformação óssea no grupo em que houve implantação de microesferas de nHA substituídas com 1% de Sr em defeitos ósseos criados em tíbias de ovelhas, quando comparado ao controle. Já no estudo realizado por Luo *et al.*⁶⁶, em que foi avaliado uma *scaffold* de HA dopada com Sr em defeitos críticos na calvária de coelhos, os resultados demonstraram que houve maior formação óssea, em relação à HA sem este metal. Ressalta-se, porém, que estes autores utilizaram o Sr na concentração de 5% teórico e 1,61% prático, o que,

provavelmente, interferiu de forma positiva na resposta biológica após a implantação do biomaterial^{34,67}.

O biomaterial avaliado em nosso estudo desencadeou uma resposta inflamatória (RI) crônica discreta, que, segundo Anderson, Rodrigues e Chang⁶⁸, é comum após a implantação de biomateriais, porquanto as rupturas vasculares conseqüentes de lesões teciduais promovem a liberação de citocinas e mediadores químicos que iniciam uma RI em paralelo à formação do coágulo sanguíneo. Nossos resultados estão em consonância com outros estudos que também avaliaram, em defeito ósseo crítico, biomateriais para regeneração óssea^{57,69-71}. A intensidade e duração da RI evidenciada comprovam a biocompatibilidade dos biomateriais, conseqüentemente, norteiam a aplicação clínica destes.

Diante dos resultados encontrados no nosso estudo no que refere à biocompatibilidade e discreto estímulo à neoformação de MO, novas pesquisas utilizando biomateriais substituídos com maior concentração de Sr devem ser desenvolvidas com objetivo de produzir materiais altamente bioativos e promissores à regeneração de perdas ósseas extensas.

Conclusão

O percentual de Sr utilizado não favoreceu maior potencial osteogênico ao biomaterial; as microesferas foram biocompatíveis, biodegradáveis, bioativas e osteocondutoras; e adequadas para a utilização como biomaterial de preenchimento.

Abstract

Objective: Analyze, histomorphometric, the osteogenic potential of microspheres of strontium-containing nanostructured hydroxyapatite/alginate. **Methods:** Twenty male Wistar rats were randomly divided into two experimental groups, with five animals in each group/biological point: GnHASr – critical bone defect filled with microspheres of 1% strontium-containing nanostructured hydroxyapatite/alginate; and GC – critical bone defect without implantation of biomaterial (control group); evaluated at the biological points of 30 and 60 postoperative days. In the histological analysis evaluated the inflammatory response (RI), neovascularization, neoformation of the osteoid matrix (MO) and the formation of connective tissue (TC). In the histomorphometric analysis, quantify the area of newly formed osteoid matrix. **Results:** In the histological analysis it was observed, in both biological points, in both groups,

deposition of MO near the edges of the defect; chronic discrete RI; TC formation in the residual area of the defect; and neovascularization. These two latter findings were more evident in nHASr. In this group, the deposition of MO occurred both inside the microspheres and around the particles of the biomaterial, which was fragmented at the two biological points. In the histomorphometric analysis, the nHASr showed a percentage of MO deposition of 7,54%, whereas in GC this value was 6,80%, at 60 postoperative days. **Conclusions:** The microspheres of nHASr presented osteogenic potential limited to the particles near the edges, were biocompatible and osteoconductive and, in this way, are appropriate for application as fill biomaterial.

Keywords: Critical bone defect; Strontium; Hydroxyapatite; Bone repair; Biocompatible materials.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [SUS0010/2013] para o desenvolvimento deste estudo.

Capítulo 3 – Efeito da administração enteral de hidroxiapatita nanoestruturada substituída com estrôncio/alginato no reparo ósseo

3 ARTIGO 2

Efeito da administração enteral de hidroxiapatita nanoestruturada substituída com estrôncio/alginato no reparo ósseo

Effect of enteral administration of strontium-containing nanostructured hydroxyapatite/alginate in bone repair

Iorrana Índira dos Anjos RIBEIRO^A; Alexandre Malta ROSSI^B; José Antônio MENEZES FILHO^C; Aryon de Almeida BARBOSA JÚNIOR^D; Sílvia Rachel de Albuquerque SANTOS^B; Guillermo Alberto LÓPEZ^E; Fúlvio Borges MIGUEL^F; Fabiana Paim ROSA^A

^aLaboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil. ^bCentro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ^cLaboratório de Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil. ^dInstituto de Patologia Geral e Cutânea, Salvador, BA, Brasil. ^eInstituto Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil. ^fCentro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Santo Antônio de Jesus, BA, Brasil.

Resumo

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração enteral do estrôncio (Sr), mediante o uso de hidroxiapatita nanoestruturada substituída com estrôncio/alginato, (nHASrAlg) no reparo de defeito ósseo crítico. **Métodos:** Para tanto, utilizou-se 20 ratos, *Wistar*, machos, adultos, distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos experimentais, com 10 animais em cada, avaliados nos pontos biológicos de 15 e 60 dias de pós-operatório: GnHASrAlg – defeito ósseo vazio e administração enteral de nHASrAlg; e grupo controle (GC) – defeito ósseo vazio sem administração enteral de Sr. Avaliou-se o reparo tecidual dos defeitos ósseos críticos confeccionados na calvária de ratos, por meio das análises histológica e histomorfométrica, e mediante correlações com as concentrações plasmáticas de Sr e cálcio (Ca). **Resultados:** Os resultados demonstraram, em todos os pontos biológicos e grupos experimentais, neoformação de matriz osteoide (MO) reacional restrita às bordas do defeito ósseo e preenchimento da área residual por tecido conjuntivo (TC) fibroso. As análises bioquímicas evidenciaram, nos dois pontos biológicos, que as concentrações plasmáticas de Sr no GnHASrAlg apresentaram valores maiores, estatisticamente significante ($p = 0,043$), que no GC. **Conclusão:** A administração enteral de Sr, nas condições experimentais deste estudo, não favoreceu aumento da formação de MO e o reparo ósseo ocorreu por cicatrização.

Palavras-chave: Administração oral. Estrôncio. Hidroxiapatita. Regeneração óssea.

Introdução

Nos últimos anos, estudos que correlacionam o uso do estrôncio (Sr) com o aumento da capacidade regenerativa do tecido ósseo vêm sendo cada vez mais realizados, principalmente, após o desenvolvimento do fármaco ranelato de estrôncio (RS)^{10,72}. Este fármaco tem sido utilizado para o tratamento da osteoporose, devido ao estímulo do Sr à diferenciação e proliferação de osteoblastos, com consequente formação de matriz óssea; e redução da diferenciação e atividade dos osteoclastos^{9,10,53}. Somado a isto, o Sr apresenta similaridades químicas e fisiológicas com o cálcio (Ca), especialmente quanto ao sítio e forma de absorção, local de deposição e excreção^{10,73}.

Além da utilização em indivíduos com osteoporose, estudos têm investigado o efeito do RS no reparo de defeitos ósseos em modelos animais de fratura da tíbia, e defeitos ósseos críticos e não críticos no fêmur e na calvária, principalmente^{6,17,74,75}. Estes estudos demonstraram benefícios do uso deste fármaco nestas situações por meio de estímulo da neoformação óssea. Apesar dos benefícios já comprovados, o uso deste fármaco tem se restringido a indivíduos com osteoporose grave e que não tem possibilidade de tratamento com outras drogas, pois o uso do RS tem sido relacionado a risco de desenvolvimento de doenças cardíacas²⁵. Com isso, o uso do Sr associado a biomateriais tem se tornado uma alternativa promissora para a regeneração de defeitos e lesões ósseas.

A hidroxiapatita (HA) tem sido amplamente investigada como biomaterial para a regeneração óssea, e, recentemente, também passou a ser estudada como carreadora de medicamentos, devido a sua estrutura porosa, estabilidade química e, a depender do método de síntese e processamento, extensa área superficial⁷⁶, especialmente quando sintetizada pelos princípios da nanociência²⁹. Neste sentido, a HA nanoestruturada (nHA) apresenta modificações na porosidade e redução do tamanho da partícula, o que, consequentemente, aumenta a área de superfície, a biodegradação, a solubilidade e a bioabsorção^{29,30}.

Diante de algumas limitações que a nHA ainda apresenta, diferentes estudos têm realizado substituições isomórficas na estrutura desta biocerâmica^{32,33} com objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas. Assim, dentre os íons que podem substituir o Ca na estrutura hexagonal da nHA, o Sr³⁶ tem sido vastamente utilizado devido à sua relação com o metabolismo ósseo e por promover

alterações na estrutura do cristal, estabilidade de fase, aumentar a solubilidade, reatividade superficial^{33,37,38} e a resistência mecânica da cerâmica^{38,39}.

A nHA substituída com Sr (nHASr) normalmente é utilizada em diferentes aplicações locais, a fim de proporcionar a liberação direta deste metal na região de implantação^{37,67,73,77-79}. Todavia, neste estudo objetivou-se utilizar esta biocerâmica, por meio de administração enteral, como um biomaterial carreador de Sr.

Vale ressaltar que, a nHA quando utilizada como carreadora de medicamentos, pode promover uma rápida liberação da molécula carreada e, deste modo, trazer desvantagens para a sua utilização clínica⁸⁰. Assim, associar esta biocerâmica com um polímero, como, por exemplo, o alginato, pode reduzir a velocidade e quantidade de droga liberada e, assim, garantir uma melhor resposta biológica⁸⁰. O alginato é um polímero extraído de algas marrons e quando em contato com íons divalentes tem a capacidade de formar um hidrogel, que possibilita a formação de microesferas em um modelo conhecido como *egg box*^{41,42,80}.

Diante do exposto, fica evidente a relevância de estudos que busquem desenvolver métodos alternativos aos empregados atualmente na regeneração de perdas ósseas extensas. Assim, o objetivo do estudo foi analisar o efeito da administração enteral de Sr, mediante o uso de hidroxiapatita nanoestruturada substituída por Sr/alginato (nHASrAlg), no reparo de defeito ósseo crítico.

Materiais e Métodos

Síntese e caracterização da Hidroxiapatita Nanoestruturada Substituída com 50% de Estrôncio – nHASrAlg50%

A nHASrAlg utilizada neste estudo foi sintetizada e caracterizada no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. O pó nanométrico de HA foi sintetizado pelo método de precipitação por via úmida sob temperatura de síntese de 90°C. Durante este processo, o Sr foi substituído na estrutura da HA por meio da adição de nitrato de estrôncio [Sr(NO₃)₂.4H₂O] na concentração de 50%. Para obtenção das microesferas adicionou-se o pó de nHASr à solução de alginato de sódio, na proporção 15:1, sob leve agitação até a obtenção de uma pasta homogênea, a qual foi gotejada em uma solução de cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂.2H₂O, 0.15M) para formação imediata das microesferas de nHASrAlg. Essas microesferas permaneceram nesta solução, de CaCl₂.2H₂O, por 24

horas para completa geleificação, e, em seguida, foram lavados em água deionizada, secas em estufa a 60°C, durante 24 horas, separadas de acordo com a faixa granulométrica de 1 a 2 mm e acondicionados em frascos apropriados, até a realização do procedimento cirúrgico experimental.

O biomaterial obtido foi caracterizado quanto a área superficial, pelo método BET; a composição química pela Espectrometria por Absorção Atômica (EAA); a cristalinidade por Difração de Raios-X (DRX); a presença de grupos funcionais pela Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por Transformada de Fourier (EVITF).

A área superficial das microesferas de nHASrAlg foi de 116,7094 m²/g e os percentuais de Ca, fósforo (P) e Sr estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Espectrometria por Absorção Atômica das microesferas de nHASrAlg e HA padrão.

Amostra	Ca %	mol do Ca	P %	mol do P	Metal %	mol do Metal	Ca+Sr/P	Ca/P
HA	36,28	0,905	16,73	0,540	-	-	-	1,675
nHASr	16,20	0,404	15,00	0,484	23,00	0,263	1,377	-

O DRX evidenciou que as microesferas de nHASrAlg apresentaram a base dos picos principais semelhante à base dos picos principais da HA padrão (Figura 1A), o que demonstra uma cristalinidade semelhante entre os biomateriais. O EVITF revelou bandas correspondentes à HA padrão, exceto nas regiões 1438 cm⁻¹, 1365 cm⁻¹ e 870cm⁻¹, que indicam a presença do íon carbonato, em função do alginato utilizado durante o processamento das microesferas. A presença das bandas de água no espectro do EVITF comprova que as microesferas não foram tratadas termicamente (Figura 1B).

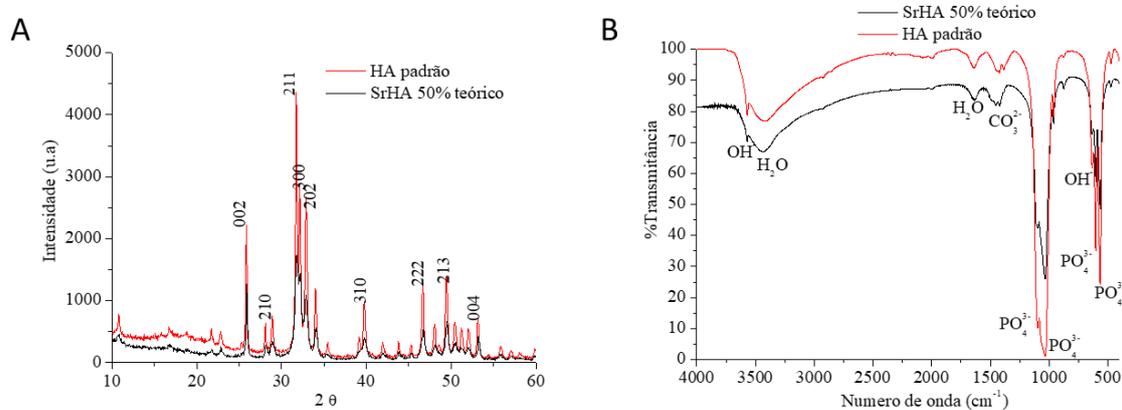


Figura 1 – DRX (A) e EVITF (B) das microesferas de nHASrAlg e HA padrão. **Fonte:** CBPF.

Procedimentos experimentais

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), do Instituto de Ciência da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), protocolo nº 063/2014. 20 ratos, *Wistar*, machos, adultos, com peso médio de 375g, 3 a 4 meses de idade, foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos experimentais, com cinco animais em cada ponto biológico: GnHASrAlg – defeito ósseo vazio, associado a administração enteral de microesferas de nHASrAlg; e GC – grupo controle, defeito ósseo vazio e sem administração enteral de Sr; avaliados nos pontos biológicos de 15 e 60 dias de pós-operatório.

O procedimento cirúrgico para confecção do defeito ósseo crítico circular transfixado, com, aproximadamente, 8,5 mm de diâmetro, na porção mediana da calvária foi semelhante ao descrito por Miguel *et al.*⁵⁷ e Ribeiro *et al.*⁶².

Administração enteral

No GnHASrAlg a administração enteral de Sr foi feita na dose de 900 mg/Kg/dia, do segundo ao 15º dia de pós-operatório, por meio da mistura das microesferas à uma dieta pastosa.

Análises bioquímicas

Foram realizadas dosagens da concentração plasmática dos íons de Ca (Ca^{+2}) e Sr (Sr^{+2}). Para tanto, coletou-se amostras de sangue, por meio de punção cardíaca transtorácica, no último dia de pós-operatório, em cada grupo e ponto biológico. As concentrações de Sr^{+2} no plasma foram determinadas por meio da Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (EAAFG), seguindo método descrito por D'Haese *et al.*⁸¹, e as concentrações de Ca por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (EAAC), método adaptado de Welch, Hamar e Fettman⁸². Estas análises foram realizadas no Laboratório de Toxicologia Clínica, Ambiental e Ocupacional da Faculdade de Farmácia da UFBA.

Etapa laboratorial e Análise histomorfométrica

Após a coleta de sangue os animais foram eutanasiados por dose letal de anestésico, a porção superior da calvária foi removida, os tecidos moles foram retirados e o espécime foi fixado em formaldeído a 4% por 72h. Em seguida, estes foram descalcificados com EDTA a 5% por 7 dias, processados e incluídos em

parafina. Os blocos foram cortados com 5 μm de espessura e os cortes foram corados por hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de *Masson-Goldner* (TG), e examinados por microscopia de luz comum.

A análise histomorfométrica foi realizada por meio do programa *Leica® Application Suite* (LAS) para quantificar o percentual de matriz osteoide neoformada (%MO). Para comparar as diferenças entre as médias obtidas para cada grupo/ponto biológico, utilizou-se o teste não paramétrico de médias Wilcoxon.

Resultados

A análise histológica, aos 15 dias, evidenciou, nos dois grupos experimentais, neoformação de matriz osteoide (MO) restrita às bordas do defeito e deposição de tecido conjuntivo (TC) delgado na área remanescente do defeito (Figuras 1A e 1B). O GC teve preenchimento por fibrose, delgado e organizado (Figura 1F). A espessura deste tecido foi menor que no GnHASrAlg, sendo que neste grupo o TC apresentou-se mais frouxo (Figura 1E). A resposta inflamatória (RI) crônica, aos 15 dias, se mostrou discreta com presença de infiltrado inflamatório disperso e a proliferação vascular mostrou-se mais evidente no GnHASrAlg (Figura 1E).

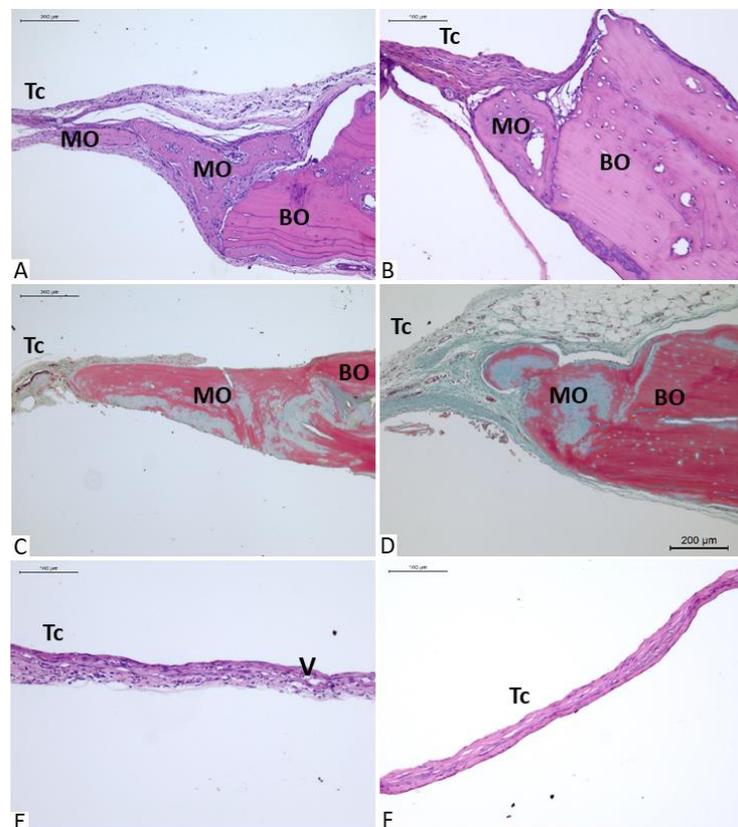


Figura 2 – Fotomicrografias do GnHASrAlg (A, C e E) e do GC (B, D e F). MO – matriz osteoide neoformada; BO – borda do defeito ósseo; V – vasos sanguíneos; Tc – tecido conjuntivo. Coloração HE – A, B, E e F; Coloração TG – C e D.

Em ambos os grupos estudados, no ponto biológico de 60 dias, a neoformação de MO continuou restrita às bordas do defeito ósseo, com aspecto mais maduro e organizado (Figuras 1C e 1D) e a área residual do defeito ósseo foi preenchida por TC, com espessura menor que as bordas ósseas. No GC este tecido apresentou-se delgado e organizado, já no GnHASrAlg observou-se tecido conjuntivo menos denso. A RI observada aos 60 dias foi discreta para todos os grupos, com presença de difuso infiltrado inflamatório mononuclear, mais evidente no GnHASrAlg. Em todos os grupos experimentais foi possível observar que o processo inflamatório tornou-se mais discreto e a proliferação vascular menos evidente aos 60 dias.

Foi possível observar, por meio da análise histomorfométrica, que houve neoformação de MO nos dois grupos (Figura 3), com maior formação deste tecido no GC, aos 30 dias, e no GnHASrAlg, aos 60 dias. Contudo, a comparação, pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, entre as médias obtidas nos grupos, mostrou que não houve diferenças estatisticamente significantes, em nenhum dos pontos biológicos ($p > 0,05$).

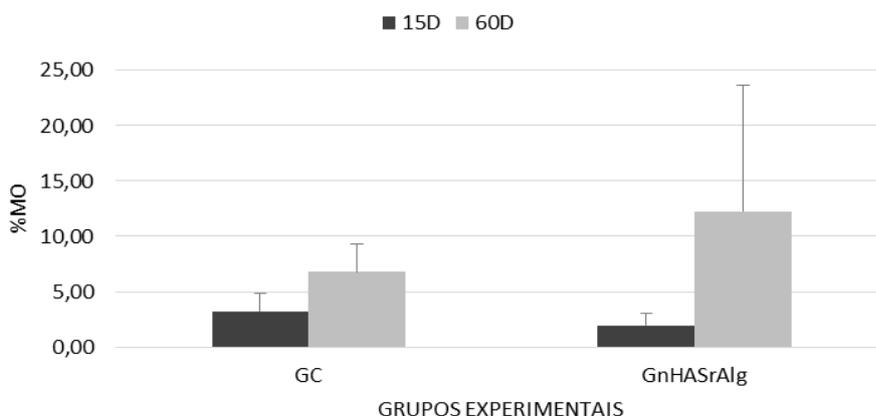


Figura 3 – Percentual de matriz osteiide neoformada (%MO) nos grupos GC e GnHASrAlg.

Na Tabela 2 são apresentados os valores da concentração plasmática de Ca^{+2} e Sr^{+2} , encontrados para os dois grupos experimentais avaliados, aos 15 e 60 dias. No grupo em que houve administração de Sr – GnHASrAlg –, a concentração plasmática desse íon foi maior do que a concentração plasmática encontrada no GC, para todos os pontos avaliados. Em contrapartida, a concentração plasmática de Ca foi menor em todos os pontos biológicos para o GnHASrAlg quando comparado ao GC.

Ao longo do período experimental foi possível notar que a concentração de Sr^{+2} e Ca^{+2} diminuíram aos 60 dias no GnHASrAlg, já no grupo controle tanto o Ca quanto o Sr aumentaram.

Tabela 2 – Concentrações plasmáticas de Sr^{+2} e Ca^{+2} , média (\pm DP), do GnHASrAlg e GC, aos 15 e 60 dias de pós-operatório.

Ponto Biológico	15 dias		60 dias	
	Sr^{+2}	Ca^{+2}	Sr^{+2}	Ca^{+2}
GnHASrAlg	0,01088 ($\pm 0,00091$)	2,4518 ($\pm 0,06466$)	0,00569 ($\pm 0,00187$)	2,3901 ($\pm 0,14916$)
GC	0,00051 ($\pm 0,00006$)	2,4971 ($\pm 0,03108$)	0,00017 ($\pm 0,00003$)	2,6019 ($\pm 0,05071$)

Discussão

O Sr é um metal que tem importante efeito metabólico no tecido ósseo^{10,72}. Este íon tem sido amplamente utilizado na forma de RS, no tratamento da osteoporose^{24,83-85}, e, associado à biomateriais, para o reparo de lesões ósseas^{67,78,79,86}. Estudos que proponham o uso de Sr para a regeneração óssea, de forma sistêmica, sem utilização do RS, são escassos na literatura científica^{87,88}. Neste sentido, este trabalho foi desenvolvido com a perspectiva de colaborar com o desenvolvimento de um método alternativo aos já empregados no reparo ósseo, e, desta forma, avaliou-se o efeito da administração enteral de Sr, mediante o uso de microesferas de nHASrAlg, no reparo de defeito ósseo crítico.

Defeitos ósseos que não regeneram espontaneamente ao longo da vida do animal, são considerados críticos^{44,60}, pois nestes o reparo é finalizado por fibrose⁶¹. Deste modo, este tipo de lesão óssea caracteriza-se como um modelo experimental eficiente para a avaliação de técnicas e/ou biomateriais que visem promover a regeneração óssea. Neste estudo, a administração enteral do nHASrAlg possibilitou aumento da neoformação de MO quando comparado ao GC, contudo, esta formação mostrou-se discreta e restrita às bordas do defeito ósseo. Estudos anteriores destacam que, para que haja estímulo da neoformação óssea, faz-se necessário o uso de arcabouços tridimensionais osteocondutores e/ou osteoindutores, capazes de favorecer os eventos celulares de migração, diferenciação e proliferação e deposição de nova MO pelas células osteogênicas^{62,63,69}. No nosso estudo, a ausência deste arcabouço tridimensional limitou neoformação de MO às bordas

ósseas do defeito, nos dois grupos experimentais, ao longo do estudo. No GnHASrAlg, a análise morfológica evidenciou um maior percentual de deposição desta matriz, porém, não estatisticamente significativa.

Somado a isto, quando administrado de forma enteral, outros fatores interferem para a ação do Sr, como por exemplo, a dose e a concentração plasmática do íon^{1,89}. No nosso estudo, as concentrações plasmáticas observadas ficaram abaixo dos valores determinadas por Ammann *et al.*⁴³, os quais evidenciaram que é necessário uma quantidade de 0,30 a 0,35 mmol/L de Sr para que ocorra incremento da neoformação óssea, tanto em quantidade quanto em qualidade. Estes achados evidenciam a estreita relação entre a concentração plasmática deste metal, a extensão da perda tecidual, e necessidade do uso de arcabouços tridimensionais, com a neoformação óssea.

No atual estudo ficou evidente que no GnHASrAlg a concentração plasmática de Sr foi maior do que no GC, grupo sem administração enteral, para todos os pontos avaliados. As microesferas de nHASrAlg foram sintetizadas a partir de pó de HA nanoestruturado e processadas mediante o uso de alginato de sódio, de forma a promover a liberação do Sr no intestino delgado, para garantir uma absorção adequada deste metal, tendo em vista que o tamanho da partícula e área de superfície, também, influenciam neste mecanismo, quando as microesferas entram em contato com os fluidos biológicos^{73,76}.

Em contrapartida, a concentração plasmática de Ca foi menor, em todos os pontos biológicos, no GnHASrAlg quando comparado ao GC. Isto pode ser explicado pela similaridade entre os metais, Sr e Ca, e, conseqüente, pela competição por transportadores e sítios de absorção^{4,5,7}. Quando há aumento na oferta de Sr, conseqüentemente, haverá diminuição na absorção do Ca^{4,19,90}.

Os achados histológicos do nosso estudo evidenciaram RI crônica, discreta, nos dois grupos, o que, segundo Anderson, Rodrigues e Chang⁶⁸, é comum após a confecção dos defeitos ósseos, porquanto o procedimento cirúrgico promove a liberação local de citocinas inflamatórias, extravasamento sanguíneo e, também, presença e ação de células osteoprogenitoras provenientes do periosteio, que atuam para a neoformação de MO que foi observada nas bordas ósseas. No tecido conjuntivo formado na área remanescente do defeito, nos dois grupos avaliados, notou-se formação vascular mais evidente no GnHASrAlg, em consonância com os resultados de Fu *et al.*⁹¹. Vale ressaltar que, estes autores encontraram, em estudo

in vitro, maior proliferação de células progenitoras endoteliais na presença de um arcabouço à base de Ca, contendo Sr.

Diante dos resultados encontrados no nosso estudo, fica evidente que a administração enteral de Sr incrementou, de forma discreta, a neoformação de MO ao longo do experimento. Todavia, a ausência de um arcabouço tridimensional, limitou a regeneração dos defeitos ósseos críticos. Assim, faz-se necessário, o desenvolvimento de novos estudos, que possibilitem compreender a ação sistêmica do Sr quando associado a um fosfato de cálcio, bem como administrado em concomitância com a implantação de arcabouço tridimensional no defeito ósseo crítico.

Conclusão

Nas condições experimentais deste estudo, a administração enteral do Sr não favoreceu a regeneração do defeito ósseo crítico. Houve discreto incremento na neoformação de MO no GnHASrAlg, e, nos dois grupos avaliados, o reparo tecidual foi finalizado por fibrose.

Abstract

Objective: The objective of this study was to evaluate the effect of enteral administration of Sr, through the use of strontium-containing nanostructured hydroxyapatite/alginate in the repair of critical bone defect. **Methods:** For this, 20 rats, Wistar, male, adult, divided randomly into two experimental groups of 10 animals each, evaluate the biological points 15 and 60 days postoperatively: GnHASrAlg - empty bone defect and enteral administration of nHASrAlg; and control group (GC) - empty bone defect without enteral administration of Sr. The tissue repair of critical bone defects made in the calvaria of rats was evaluated by means of histological and histomorphometric analyzes and by correlations with plasma concentrations of Sr and Ca. **Results:** The results demonstrated, in all the biological points and experimental groups, reactive bone neoformation restricted to the edges of the bone defect and filling of the residual area by fibrous connective tissue. The biochemical analyzes showed, in both biological points, that the plasma concentrations of Sr in the GnHASrAlg presented higher values, statistically significant ($p=0,043$), than in the GC. **Conclusions:** The enteral administration of Sr, under the experimental conditions of this study, did not favor increased osteoid matrix

formation and the bone repair occurred by healing.

Keywords: Oral administration. Strontium. Hydroxyapatite. Bone regeneration.

Agradecimentos

Esse trabalho recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [SUS0010/2013].

4 CONCLUSÃO

O Sr possui um papel muito relevante sobre o metabolismo ósseo, principalmente quanto aos efeitos benéficos na densidade mineral óssea e cicatrização de feridas. Entretanto as pesquisas para elucidar os mecanismos de ação, metabolismo, dose, fatores que interferem sobre seu metabolismo, ainda estão em andamento, tornando esta área muito promissora na Bioengenharia Tecidual Óssea. O objetivo do nosso estudo foi avaliar o efeito do Sr, mediante o uso local e sistêmico, de nHASr na regeneração de defeitos ósseos críticos. Diante dos resultados apresentados, concluiu-se que a utilização de Sr, local ou sistêmico, não favoreceu a regeneração do defeito ósseo crítico, apesar de ter promovido discreto aumento na neoformação de MO. Desta forma, torna-se imprescindível, o desenvolvimento de novos estudos, que possam elucidar o papel do Sr na regeneração óssea e, também, aperfeiçoar as técnicas utilizadas.

REFERÊNCIAS

- 1 Dahl S, Allain P, Marie P, Mauras Y, Boivin G, Ammann P et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone*. 2001;28(4):446-453.
- 2 Cannata-Andía J, Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C. Mecanismo de acción del ranelato de estroncio. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*. 2010;2(1):S5-S9.
- 3 ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile for Strontium. Atlanta: Department of Health and Human Services, Public Health Service. 2004.
- 4 Pors-Nielsen S. The biological role of strontium. *Bone*. 2004;35(3):583-588.
- 5 Kong Y, Guo Y, Zhang J, Zhao B, Wang J. Strontium Promotes Transforming Growth Factors β 1 and β 2 Expression in Rat Chondrocytes Cultured In Vitro. *Biological Trace Element Research*. 2017;184(2):450-455.
- 6 Barneo-Caragol C, Martínez-Morillo E, Rodríguez-González S, Lequerica-Fernández P, Vega-Naredo I, Álvarez Menéndez F. Strontium and oxidative stress in normal pregnancy. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2018;45:57-63.
- 7 Cabrera W, Schrooten I, De Broe M, D'Haese P. Strontium and Bone. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999;14(5):661-668.
- 8 Pemmer B, Roschger A, Wastl A, Hofstaetter J, Wobrauschek P, Simon R et al. Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue. *Bone*. 2013;57(1):184-193.
- 9 Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, Jurdic P. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone*. 2008;42(1):129-138.
- 10 Querido W, Rossi A, Farina M. The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches. *Micron*. 2016;80:122-134.
- 11 Doublier A, Farlay D, Khebbab M, Jaurand X, Meunier P, Boivin G. Distribution of strontium and mineralization in iliac bone biopsies from osteoporotic women treated long-term with strontium ranelate. *European Journal of Endocrinology*. 2011;165(3):469-476.
- 12 Boivin G, Doublier A, Farlay D. Strontium ranelate – a promising therapeutic principle in osteoporosis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2012;26(2-3):153-156.
- 13 Wohl G, Chettle D, Pejović-Milić A, Druchok C, Webber C, Adachi J et al. Accumulation of bone strontium measured by in vivo XRF in rats supplemented with

strontium citrate and strontium ranelate. *Bone*. 2013;52(1):63-69.

14 Pilmane M, Salma-Ancane K, Loca D, Locs J, Berzina-Cimdina L. Strontium and strontium ranelate: Historical review of some of their functions. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;78:1222-1230.

15 Meunier P, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski J, Spector T et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *The new england journal of medicine*. 2004;29(350):459-468.

16 Nardone V, Zonefrati R, Mavilia C, Romagnoli C, Ciuffi S, Fabbri S et al. In vitro effects of strontium on proliferation and osteoinduction of human preadipocytes. *Stem Cells International*. 2015;2015:1-12.

17 Rosa J, Sakane K, Santos K, Corrêa V, Arana-Chavez V, Oliveira J. Strontium Ranelate Effect on the Repair of Bone Defects and Molecular Components of the Cortical Bone of Rats. *Brazilian Dental Journal*. 2016;27(5):502-507.

18 Buehler J, Chappuis P, Saffar J, Tsouderos Y, Vignery A. Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone*. 2001;29(2):176-179.

19 Marie P, Felsenberg D, Brandi M. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. *Osteoporosis International*. 2010;22(6):1659-1667.

20 Rolim A. Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito ósseo crítico, em calvária de rato [Mestre]. Universidade Federal da Bahia; 2010.

21 Barreto I. Utilização de ranelato de estrôncio associado a biometrias para regeneração óssea [Doutor]. Universidade Federal da Bahia; 2011.

22 Neves N, Linhares D, Costa G, Ribeiro C, Barbosa M. In vivo and clinical application of strontium-enriched biomaterials for bone regeneration. *Bone & Joint Research*. 2017;6(6):366-375.

23 Masalskas B, Martins Júnior W, Leoni G, Faloni A, Marcaccini A, Silva Sousa Y et al. Local delivery of strontium ranelate promotes regeneration of critical size bone defects filled with collagen sponge. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2017;106(2):333-341.

24 Reginster J, Neuprez A, Lecart M, Sarlet N, Distèche S, Bruyère O. Traitement de l'ostéoporose post-ménopausique: Quoi de neuf en 2014?. *Revue Medicale de Liege*. 2014;69(7-8):441-453.

25 Reginster J. Cardiac concerns associated with strontium ranelate. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2014;13(9):1209-1213.

26 Cooper C, Fox K, Borer J. Ischaemic cardiac events and use of strontium ranelate

in postmenopausal osteoporosis: a nested case–control study in the CPRD. *Osteoporosis International*. 2013;25(2):737-745.

27 Yu J, Tang J, Li Z, Sajjan S, O'Regan C, Modi A et al. History of cardiovascular events and cardiovascular risk factors among patients initiating strontium ranelate for treatment of osteoporosis. *International Journal of Women's Health*. 2015;7:913-918.

28 Bolland M, Grey A. Ten years too long: strontium ranelate, cardiac events, and the European Medicines Agency. *BMJ*. 2016;354(i5109):1-8.

29 Zhang W, Wang G, Liu Y, Zhao X, Zou D, Zhu C et al. The synergistic effect of hierarchical micro/nano-topography and bioactive ions for enhanced osseointegration. *Biomaterials*. 2013;34(13):3184-3195.

30 Ma P. Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008;60(2):184-198.

31 Bigi A, Boanini E, Capuccini C, Gazzano M. Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals. *Inorganica Chimica Acta*. 2007;360(3):1009-1016.

32 Lima I, Santos S, Santiago D, Rossi A, Granjeiro J. Cytotoxicity analysis of apatites modified with divalent metals. *Key Engineering Materials*. 2007;361-363:1135-1138.

33 Aina V, Bergandi L, Lusvardi G, Malavasi G, Imrie F, Gibson I et al. Sr-containing hydroxyapatite: morphologies of HA crystals and bioactivity on osteoblast cells. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33(3):1132-1142.

34 Christoffersen J, Christoffersen M, Kolthoff N, Bärenholdt O. Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection. *Bone*. 1997;20(1):47-54.

35 Shepherd J, Shepherd D, Best S. Substituted hydroxyapatites for bone repair. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2012;23(10):2335-2347.

36 Li Z, Lam W, Yang C, Xu B, Ni G, Abbah S et al. Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials*. 2007;28(7):1452-1460.

37 Li J, Yang L, Guo X, Cui W, Yang S, Wang J et al. Osteogenesis effects of strontium-substituted hydroxyapatite coatings on true bone ceramic surfaces in vitro and in vivo. *Biomedical Materials*. 2017;13(1):015-018.

38 Brook I, Freeman C, Grubb S, Cummins N, Curran D, Reidy C et al. Biological evaluation of nano-hydroxyapatite–zirconia (HA–ZrO₂) composites and strontium–hydroxyapatite (Sr–HA) for load-bearing applications. *Journal of Biomaterials Applications*. 2011;27(3):291-298.

39 Xue W, Moore J, Hosick H, Bose S, Bandyopadhyay A, Lu W et al. Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics.

Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2006;79A(4):804-814.

40 Augst A, Kong H, Mooney D. Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromolecular Bioscience*. 2006;6(8):623-633.

41 Lee K, Mooney D. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2012;37(1):106-126.

42 Rees D. Polysaccharide shapes and their interactions - some recent advances. *Pure and Applied Chemistry*. 1981;53(1):1-14.

43 Ammann P, Shen V, Robin B, Mauras Y, Bonjour J, Rizzoli R. Strontium Ranelate Improves Bone Resistance by Increasing Bone Mass and Improving Architecture in Intact Female Rats. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2004;19(12):2012-2020.

44 Porto G, Vasconcelos B, Andrade E, Carneiro S, Frota M. Is a 5 mm rat calvarium defect really critical?. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2012;27(11):757-760.

45 Spicer P, Kretlow J, Young S, Jansen J, Kasper F, Mikos A. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature Protocols*. 2012;7(10):1918-1929.

46 Winkler T, Sass F, Duda G, Schmidt-Bleek K. A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering. *Bone & Joint Research*. 2018;7(3):232-243.

47 Machado C, Sartoretto S, Alves A, Lima I, Rossi A, Granjeiro J et al. Histomorphometric evaluation of strontium-containing nanostructured hydroxyapatite as bone substitute in sheep. *Brazilian Oral Research*. 2016;30(1):e45.

48 Valiense H, Barreto M, Resende R, Alves A, Rossi A, Mavropoulos E et al. In vitro and in vivo evaluation of strontium-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite/sodium alginate for sinus lift in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2015;104(2):274-282.

49 Carmo A, Sartoretto S, Alves A, Granjeiro J, Miguel F, Calasans-Maia J et al. Alveolar bone repair with strontium-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite. *Journal of Applied Oral Science*. 2018;26:e20170084.

50 Resende R, Fernandes G, Santos S, Rossi A, Lima I, Granjeiro J et al. Long-term biocompatibility evaluation of 0.5 % zinc containing hydroxyapatite in rabbits. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013;24(6):1455-1463.

51 Calasans-Maia M, Calasans-Maia J, Santos S, Mavropoulos E, Farina M, Lima I et al. Short-term in vivo evaluation of zinc-containing calcium phosphate using a normalized procedure. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;41:309-319.

52 Zhang W, Shen Y, Pan H, Lin K, Liu X, Darvell B et al. Effects of strontium in modified biomaterials. *Acta Biomaterialia*. 2011;7(2):800-808.

- 53 Park J, Kang D, Hanawa T. New bone formation induced by surface strontium-modified ceramic bone graft substitute. *Oral Diseases*. 2015;22(1):53-61.
- 54 Ehret C, Aid-Launais R, Sagardoy T, Siadous R, Bareille R, Rey S et al. Strontium-doped hydroxyapatite polysaccharide materials effect on ectopic bone formation. *PLOS ONE*. 2017;12(9):e0184663.
- 55 Frasnelli M, Cristofaro F, Sglavo V, Dirè S, Callone E, Ceccato R et al. Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;71:653-662.
- 56 Bootchanont A, Sailuam W, Sutikulsoombat S, Temprom L, Chanlek N, Kidkhunthod P et al. Synchrotron X-ray Absorption Spectroscopy study of local structure in strontium-doped hydroxyapatite. *Ceramics International*. 2017;43(14):11023-11027.
- 57 Miguel F, Cardoso A, Barbosa A, Marcantonio E, Goissis G, Rosa F. Morphological assessment of the behavior of three-dimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2006;78B(2):334-339.
- 58 Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Resolução Normativa nº37, de 15 de fevereiro de 2018. Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. 2018 fev. 22; Seção 1.p 5.
- 59 Verna C, Dalstra M, Wikesjo U, Trombelli L. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2002;29(9):865-870.
- 60 Schmitz J, Hollinger J. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1986;(205):299-308.
- 61 Miguel F, Barbosa Júnior A, de Paula F, Barreto I, Goissis G, Rosa F. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013;24(11):2567-2575.
- 62 Ribeiro I, Almeida R, Rocha D, Prado da Silva M, Miguel F, Rosa F. Biocerâmicas e polímero para a regeneração de defeitos ósseos críticos. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 2014;13(3):298-302.
- 63 Daltro A, Barreto I, Rosa F. Análise do efeito da plataforma vibratória na regeneração de defeito ósseo. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 2017;15(3):323-329.
- 64 Combes C, Cazalbou S, Rey C. Apatite Biominerals. *Minerals*. 2016;6(2):1-25.
- 65 Valenzuela F, Covarrubias C, Martínez C, Smith P, Díaz-Dosque M, Yazdani-Pedram M. Preparation and bioactive properties of novel bone-repair

bionanocomposites based on hydroxyapatite and bioactive glass nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2012;100B(6):1672-1682.

66 Luo Y, Chen S, Shi Y, Ma J. 3D printing of strontium-doped hydroxyapatite based composite scaffolds for repairing critical-sized rabbit calvarial defects. *Biomedical Materials*. 2018;13(6):065004.

67 Li Y, Li Q, Zhu S, Luo E, Li J, Feng G et al. The effect of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant fixation in ovariectomized rats. *Biomaterials*. 2010;31(34):9006-9014.

68 Anderson J, Rodriguez A, Chang D. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*. 2008;20(2):86-100.

69 Cardoso A, Barbosa, Jr. A, Miguel F, Marcantonio, Jr. E, Farina M, Soares G et al. Histomorphometric Analysis of Tissue Responses to Bioactive Glass Implants in Critical Defects in Rat Calvaria. *Cells Tissues Organs*. 2006;184(3-4):128-137.

70 Santos A, Ribeiro I, Rosa F. Avaliação morfológica por imagem microtomográfica e histológica no reparo ósseo após o uso de biomaterial. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 2015;14():310-315..

71 Santos G, Vasconcelos L, Barbosa Junior A, Santos S, Rossi A, Miguel F, Rosa F. Análise da influência de duas faixas granulométricas de microesferas de hidroxiapatita e alginato na fase inicial do reparo ósseo. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 2017;15():363-369.

72 Vegger J, Brüel A, Sørensen T, Thomsen J. Systemic Treatment with Strontium Ranelate Does Not Influence the Healing of Femoral Mid-shaft Defects in Rats. *Calcified Tissue International*. 2015;98(2):206-214.

73 Li H, Jiang F, Ye S, Wu Y, Zhu K, Wang D. Bioactive apatite incorporated alginate microspheres with sustained drug-delivery for bone regeneration application. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;62:779-786.

74 Rossi A, Moldovan S, Querido W, Rossi A, Werckmann J, Ersen O et al. Effect of strontium ranelate on bone mineral: Analysis of nanoscale compositional changes. *Micron*. 2014;56:29-36.

75 Ibrahim M, Singh S, Merican A, Raghavendran H, Murali M, Naveen S et al. The effect of strontium ranelate on the healing of a fractured ulna with bone gap in rabbit. *BMC Veterinary Research*. 2016;12(112):1-9.

76 Mondal S, Dorozhkin S, Pal U. Recent progress on fabrication and drug delivery applications of nanostructured hydroxyapatite. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2017;10(4):e1504.

77 O'Donnell M, Fredholm Y, de Rouffignac A, Hill R. Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites. *Acta Biomaterialia*. 2008;4(5):1455-1464.

- 78 Lourenço A, Neves N, Ribeiro-Machado C, Sousa S, Lamghari M, Barrias C et al. Injectable hybrid system for strontium local delivery promotes bone regeneration in a rat critical-sized defect model. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1-15.
- 79 Offermanns V, Andersen O, Riede G, Sillassen M, Jeppesen C, Almtoft K et al. Effect of strontium surface-functionalized implants on early and late osseointegration: A histological, spectrometric and tomographic evaluation. *Acta Biomaterialia*. 2018;69:385-394.
- 80 Moreira A, Sader M, Soares G, Leão M. Strontium Incorporation on Microspheres of Alginate/ β -tricalcium Phosphate as Delivery Matrices. *Materials Research*. 2014;17(4):967-973.
- 81 D'haese P, Landeghem G, Lamberts L, Bekaert V, Schrooten I and De Broe M. Measurement of strontium in serum, urine, bone, and soft tissues by Zeeman atomic absorption spectrometry. *Clinical Chemistry*. 1997;43(1):121-128.
- 82 Welch W, Hamar W and Fettman J. Method comparison for calcium determination by flame atomic absorption spectrophotometry in the presence of phosphate. *Clinical Chemistry*. 1997;36(2):351 -354.
- 83 Yang S, Wang L, Feng S, Yang Q, Yu B, Tu M. Enhanced bone formation by strontium modified calcium sulfate hemihydrate in ovariectomized rat critical-size calvarial defects. *Biomedical Materials*. 2017;12(3):035004.
- 84 Ozturan K, Demir B, Yucel I, Cakıcı H, Yilmaz F, Haberal A. Effect of strontium ranelate on fracture healing in the osteoporotic rats. *Journal of Orthopaedic Research*. 2011;29(1):138-142.
- 85 Komrakova M, Weidemann A, Dullin C, Ebert J, Tezval M, Stuermer K et al. The Impact of Strontium Ranelate on Metaphyseal Bone Healing in Ovariectomized Rats. *Calcified Tissue International*. 2015;97(4):391-401.
- 86 Lin K, Liu P, Wei L, Zou Z, Zhang W, Qian Y et al. Strontium substituted hydroxyapatite porous microspheres: Surfactant-free hydrothermal synthesis, enhanced biological response and sustained drug release. *Chemical Engineering Journal*. 2013;222:49-59.
- 87 Siccardi A, Padgett-Vasquez S, Garris H, Nagy T, D'Abramo L, Watts S. Dietary strontium increases bone mineral density in intact Zebrafish (*Danio rerio*): A potential model system for bone research. *Zebrafish*. 2010;7(3):267-273.
- 88 Taylor B, Bezuhly M, Brace M, Carter M, Hong P. Effect of strontium citrate on bone consolidation during mandibular distraction osteogenesis. *The Laryngoscope*. 2017;127(7):E212-E218.
- 89 Terra J, Dourado E, Eon J, Ellis D, Gonzalez G, Rossi A. The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study. *Phys Chem Chem Phys*. 2009;11(3):568-577.

90 Verberckmoes S, De Broe M, D'Haese P. Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization. *Kidney International*. 2003;64(2):534-543.

91 Fu W, Xiang Z, Huang F, Gu Z, Yu X, Cen S et al. Coculture of Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells on Strontium-Doped Calcium Polyphosphate Scaffolds to Generate Vascularized Engineered Bone. *Tissue Engineering Part A*. 2015;21(5-6):948-959.

ANEXO A



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



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa de protocolo número **063/2014**, intitulado **“Desenvolvimento de nanobiomateriais compósitos e de um novo fármaco para a terapêutica aplicada ao reparo ósseo”**, sob a responsabilidade do Professora Doutora Fabiana Paim Rosa, lotada no setor de Biointeração do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), está de acordo com as exigências legais atuais para experimentação animal e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **12 de setembro de 2014**.

Salvador, 12 de setembro de 2014.

Profª Dra. Tania Tavares Rodriguez

Coordenadora da CEUA-ICS

Profª. Tânia Tavares Rodrigues
Coordenadora da CEUA-ICS
Instituto de Ciências da Saúde - UFBA

CEUA-ICS

Av. Reitor Miguel Calmon S/N . Instituto de Ciências da Saúde . Vale da Canela CEP 40110-100 – Salvador – Bahia – Brasil .
Telefone: 55-(71) 3283-8958 ou (71) 3245-0917 . E-mail: ceuaiscs@ufba.br.

Telefone: (71) 3283-8958



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>