

Isabela Cerqueira Barreto



## **Utilização de ranelato de estrôncio associado a biometrias para regeneração óssea**

Salvador  
2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS  
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**



**ISABELA CERQUEIRA BARRETO**

**UTILIZAÇÃO DE RANELATO DE ESTRÔNCIO ASSOCIADO A  
BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Salvador  
2011

**ISABELA CERQUEIRA BARRETO**

**UTILIZAÇÃO DE RANELATO DE ESTRÔNCIO ASSOCIADO A  
BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

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 parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Paim Rosa  
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Farina de Souza

Salvador  
2011

SIBI/UFBA/Faculdade de Educação – Biblioteca Anísio Teixeira

**Barreto, Isabela Cerqueira.**

**Utilização de ranelato de estrôncio associado a biomateriais para regeneração óssea / Isabela Cerqueira Barreto. - 2011. 172 f. : il.**

**Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa.**

**Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Farina de Souza.**

**Tese (doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências de Saúde, Salvador, 2011.**

**1. Ossos – Regeneração. 2. Fibrina. 3. Hidroxiapatita. 4. Ranelato de Estrôncio. I. Rosa, Fabiana Paim. II. Souza, Marcos Farina de. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências de Saúde. IV. Título**

**CDD 617.471 – 22. ed.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Aos treze dias do mês de dezembro de dois mil e onze, reuniu-se em sessão pública o Colegiado do Programa de Pós-Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas com a finalidade de apreciar a **Defesa Pública da Tese** da Pós-Graduanda **Isabela Cerqueira Barreto**, através da Comissão Julgadora composta pelos Professores **Fabiana Paim Rosa, Roberto Paulo Correia de Araújo, Moysés Sadigursky, Marcos Farina de Souza e Eliana Cristina da Silva Rigo**. O título da Tese apresentado foi **UTILIZAÇÃO DE RANELATO DE ESTRÔNCIO ASSOCIADO A BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**. Ao final dos trabalhos os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa Aprovada  
Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo Aprovado  
Prof. Dr. Moysés Sadigursky Aprovado  
Prof. Dr. Marcos Farina de Souza APROVADA  
Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo 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, 13 de dezembro de 2011

Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa  
Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo  
Prof. Dr. Moysés Sadigursky  
Prof. Dr. Marcos Farina de Souza  
Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo

## TERMO DE APROVAÇÃO

ISABELA CERQUEIRA BARRETO

### UTILIZAÇÃO DE RANELATO DE ESTRÔNCIO ASSOCIADO A BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Tese aprovada como requisito para obtenção do título de Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia.

Banca Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Cristina da Silva Rigo \_\_\_\_\_  
Doutora em Ciência e Engenharia dos Materiais

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Paim Rosa \_\_\_\_\_  
Doutora em Odontologia  
Orientadora

Prof. Dr. Marcos Farina de Souza \_\_\_\_\_  
Doutor em Ciências Biológicas  
Co-orientador

Prof. Dr. Moisés Sadigurky \_\_\_\_\_  
Doutorado em Patologia Humana pela Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo \_\_\_\_\_  
Livre Docente em Odontologia

Salvador, 13 de dezembro de 2011

Dedico este trabalho aos meus pais, Osvaldo e Ervene, por serem meus melhores amigos e por só quererem o meu bem. Amo vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Anjo da Guarda, que nos momentos de insegurança e obstáculos a serem vencidos, ouviu as minhas preces e as apresentou a Deus;

Ao meu pai Osvaldo, a pessoa que mais me incentivou a seguir a carreira acadêmica;

À minha mãe Ervene, pelo amor imensurável dispensado a mim e pelas doces palavras;

À Grazi e Léo, meus lindos irmãos, por existirem e serem tão presentes em minha vida;

A Joaquim, pelo incentivo constante, pela ajuda na edição das figuras e elaboração das tabelas, por compreender as minhas ausências, e pelos momentos felizes que passamos juntos;

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Paim Rosa pela honestidade e confiança depositada em mim para o desenvolvimento desta tese. Aprendi muito com você;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcos Farina de Souza, pelo entusiasmo pela ciência e brilhantismo. Obrigada pelos ricos ensinamentos e por ter me buscado inúmeras vezes no aeroporto do Rio de Janeiro;

Ao Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo, coordenador do Programa de Pós-graduação e meu chefe do Laboratório de Bioquímica Oral, pela determinação, assiduidade, firmeza e competência na condução do seu trabalho;

Ao Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior, pela gentileza, atenção e perspicácia durante a ajuda e ensinamento nas análises histomorfométricas das lâminas;

Ao Dr. Patrick Ammann, pela simplicidade, solicitude, amabilidade e disponibilidade, desde o início da definição da metodologia a ser utilizada nesta tese, até as análises por microtomografia computadorizada;

Ao Dr. Alexandre Malta Rossi e Sílvia Santos do CBPF, pelo preparo do biomaterial cerâmico utilizado nesta tese e pela facilidade de comunicação;

Às queridas Ana Clara, Luciana e Marion, por terem compartilhado comigo todo o trabalho experimental, pela união e ótima convivência durante as nossas inúmeras idas e vindas à UEFS;

Ao funcionário Júnior do Biotério da UEFS, pelo trabalho exemplar e extremo cuidado com os animais;

Aos alunos de iniciação científica, Poliana, Marcel e Manoel, pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho;

Às técnicas de laboratório, Cristina, Elisângela e Carol, pela dedicação durante o processamento das amostras;

Aos integrantes do Laboratório de Biomineralização da UFRJ, principalmente a Mair e Rosângela pela receptividade e delicadeza, e a Leida, pela ajuda, gentileza e pelo apoio na realização da MEV;

Aos amigos Daniela Higashi, Edmália, Fúlvio, João Frank, Lara, Rhyna, Sheila Passos e Victor Nunes, pela amizade e por sempre torcerem pelas minhas conquistas. Vocês representam o grande presente que a vida acadêmica me proporcionou;

A Ingrid Russoni, minha querida amiga, pelas doces palavras, pelo seu lindo sorriso e por ter me recebido de braços abertos em sua residência no Rio de Janeiro;

A Anderson, pelo auxílio na edição das figuras e preparação das tabelas;

Aos amigos do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais, Ana Emília, Eliane, Marcela e Marivaldo, pelo apoio e gentileza.

A Danilo, Gabriela, Max e Elisângela, meus colegas do Laboratório de Bioquímica Oral, pelo convívio diário, e pela amizade que começa a ser estabelecida;

Ao diretor médico, na época, o Dr. Eduardo de Gomensoro, e ao representante regional do Laboratório Servier, Sr. Carlos Calazans, pela disponibilidade e gentileza na cessão das amostras do Protos<sup>®</sup>;

A Marcelo, secretário do Programa de Pós-graduação, pela dedicação e extrema educação com todas as pessoas que lhe solicitam qualquer ajuda;

Aos Professores desta pós-graduação, aos quais tenho respeito e admiração;

A Sônia Vieira e a Titinha, pelo auxílio na elaboração da ficha catalográfica;

A Diogo, responsável pela valiosa colaboração na realização das fotos de parte do experimento;

A Cláudio Figueira, Adriana e Lúcia, pesquisadores da Plataforma de Microscopia Eletrônica da Fiocruz, pela excelente receptividade, auxílio e profissionalismo durante as etapas de processamento das amostras destinadas à microscopia eletrônica;

Aos colegas da Pós-graduação, principalmente a Mady e Cristina Pinho, por terem compartilhado comigo momentos únicos e inesquecíveis;

À minha grande e calorosa família, principalmente a Tio Danilo, pelo auxílio na impressão;

Por fim, agradeço, de maneira especial, aos animais que colaboraram com suas vidas para o desenvolvimento da ciência.

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos.

Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos.

Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei.

Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar”.

Eduardo Galeano

BARRETO, Isabela Cerqueira. **Utilização de ranelato de estrôncio associado a biomateriais para regeneração óssea**. Salvador, 2011. 182f., il. Tese (Doutorado em Processos interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia.

## RESUMO

A medicina regenerativa busca o reparo de tecidos lesionados, por meio do controle e ampliação da capacidade natural de regeneração dos tecidos. A bioengenharia tecidual óssea insere-se neste contexto e visa à utilização de biomateriais que atuem como arcabouços capazes de regenerar defeitos ósseos de dimensões críticas com a finalidade de restabelecer a função e/ou estética do indivíduo acometido. Com o intuito de se alcançar um incremento do reparo ósseo, produzido localmente pelos biomateriais, quando implantados em defeitos críticos, pode-se instituir uma estratégia de atuação no metabolismo ósseo com o medicamento ranelato de estrôncio, com a associação do efeito local e sistêmico. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de análise histomorfométrica, o potencial osteogênico do ranelato de estrôncio associado a microesferas de hidroxiapatita, juntamente com selante de fibrina, para regeneração em defeito ósseo crítico. Foram utilizados 64 *rattus norvegicus* da linhagem wistar, albinos, machos, adultos, que receberam via oral diariamente 900 mg/ Kg de ranelato de estrôncio, nos quais se realizou defeito ósseo crítico transfixado de 8,5 mm de diâmetro na região da calvária. Estes animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos - grupo controle com administração do ranelato de estrôncio (GCRS) - defeito ósseo sem implantação de biomaterial, apenas com a presença do coágulo sanguíneo; grupo hidroxiapatita com administração de ranelato de estrôncio (GHARS) - defeito ósseo com implantação de microesferas de HA; grupo fibrina com administração de ranelato de estrôncio (GFRS) - defeito ósseo com implantação de fibrina; e grupo hidroxiapatita associado à fibrina (GHAFRS) - defeito ósseo com implantação de microesferas de HA e fibrina; os grupos citados foram comparados com grupos controle-negativo (GC, GHA, GF, GHAF), cujo modelo animal foi similar, porém os animais não receberam o medicamento ranelato de estrôncio. Os animais foram sacrificados aos 15, 45 e 120 dias de pós-operatório e analisados por meio de microscopia óptica e, ainda, os grupos GC e GCRS foram avaliados, no ponto biológico de 120 dias, por microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e por espectrometria de energia dispersiva de raios-X. A administração do ranelato de estrôncio promoveu a regeneração parcial do defeito ósseo, sem o restabelecimento do volume ósseo original, com maior percentual de neoformação óssea quando utilizado sem associação com biomateriais; o elemento estrôncio foi incorporado à estrutura do tecido ósseo quando houve a administração do ranelato de estrôncio; as microesferas de HA foram biocompatíveis, atuaram, fundamentalmente, como biomaterial para preenchimento do defeito ósseo, e o seu potencial osteogênico restringiu-se à osteocondutividade; o selante de fibrina mostrou-se eficaz como agente aglutinante e acelerou a maturação óssea quando associado exclusivamente com o ranelato de estrôncio.

**Paravras-chave:** Fibrina. Hidroxiapatita. Ranelato de Estrôncio. Regeneração Óssea.

BARRETO, Isabela Cerqueira. **Strontium ranelate utilization in association with biomaterials for bone regeneration**. Salvador, 2011. 182f., il. Theses (Doctorate degree in Interactive processes of systems and organs) – Health Science Institute, Federal University of Bahia.

### **ABSTRACT**

Regenerative medicine aims to repair damaged tissues, through control and expansion of natural regeneration of tissues. Bone tissue engineering fits in this context and intends to use biomaterials that act as scaffolds able to regenerate critical size bone defects in order to restore function and/ or aesthetics of the patient. In order to achieve a bone repair increase, locally produced by biomaterials, when placed in bone defects, an action strategy can be established in bone metabolism with strontium ranelate, with associated local and systemic effects. Therefore, the aim of this study was to evaluate, through histomorphometric analysis, the osteogenic potential of strontium ranelate associated with hydroxyapatite microspheres, with fibrin sealant for bone critical size defects regeneration. 64 *Rattus norvegicus* male Wistar albino adults were used; they received orally 900 mg/ Kg of strontium ranelate daily, in which transfixated critical bone defect of 8.5 mm in diameter in calvaria region was done. Those animals were randomly divided into four groups – control group with strontium ranelate administration (GCRS) – critical bone defect without biomaterial implantation, only with the presence of blood clot; hydroxyapatite group with strontium ranelate administration (GHARS) – critical bone defect with HA microspheres; fibrin group with strontium ranelate administration (GFRS) – critical bone defect with implantation of fibrin; and hydroxyapatite group associated with fibrin with strontium ranelate administration (GHAFRS) – bone defect with deployment of HA microspheres and fibrin. The cited groups were compared to negative control groups (GC, GHA, GF, GHAF), whose animal model was similar, but the animals did not receive strontium ranelate. The animals were sacrificed at 15, 45 and 120 days postoperatively and analyzed using optical microscopy and also GC and GCRS groups were evaluated in the biological point of 120 days by scanning electron microscopy, transmission electron microscopy and energy dispersive X-ray spectrometry. Strontium ranelate administration promoted partial regeneration of the bone defect without restoring the original bone volume, with the highest percentage of bone formation when used no combination with biomaterials; the strontium was incorporated into the structure of bone tissue when strontium ranelate administration was performed; HA microspheres were biocompatible and acted primarily as a filling biomaterial and its osteogenic potential was restricted to osteoconductivity; the fibrin sealant was effective as a bounding agent and accelerated bone maturation when exclusively associated with strontium ranelate.

**Keywords:** Bone Regeneration. Fibrin. Hydroxyapatite. Strontium Ranelate.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Esquema que representa os nanocristais de hidroxiapatita do tecido ósseo. Na superfície do cristal existe uma camada de hidratação com íons, que podem ser trocados por íons e proteínas provenientes dos fluidos biológicos (REY et al., 2009)	29
Figura 2:	Estrutura cristalina da HA observada na direção do eixo <i>c</i> (KAY, YOUNG, POSNER, 1964)	31
Figura 3:	Fórmula estrutural plana da molécula de ranelato de estrôncio	41
Figura 4:	Modo de ação do ranelato de estrôncio: <a href="http://www.protelos.com/">http://www.protelos.com/</a> . Acesso em: 29 nov. 2011	43
Figuras 5, 6, 7:	MEV das microesferas de HA, que mostram a morfologia e textura superficial do biomaterial em diferentes aumentos	51
Figura 8:	Imagem por MET que mostra a disposição dos cristais de HA após tratamento térmico (ROSSI et al., 2011)	51
Figura 9:	Componentes do selante de fibrina (Tissucol <sup>®</sup> - Baxter)	52
Figura 10:	Duploject <sup>®</sup> para homogeneização e aplicação dos componentes do Tissucol <sup>®</sup>	53
Figura 11:	Desenho esquemático que mostra a localização do defeito crítico confeccionado entre as suturas anterior e posterior da calvária do animal	56
Figuras 12 e 13:	As figuras mostram a caixa do fármaco utilizado, juntamente com um microtubo milimetrado do tipo <i>ependorf</i> que contém o ranelato de estrôncio no seu interior (Figura 12) e um recipiente com a dieta pastosa, contendo ração triturada, água e o fármaco (Figura 13)	56
Figuras 14 a 25:	Estas figuras ilustram as etapas da técnica cirúrgica. Foi realizada tricotomia (Figura 14), antisepsia (Figura 15), posicionamento do animal em decúbito ventral sobre o campo cirúrgico (Figura 16), incisão cutânea bicoronal (Figura 17), exposição e elevação do periósteo (Figura 18 e 19), confecção do defeito (Figura 20 e 21), defeito ósseo confeccionado (Figura 22), implantação de microesferas de HA (Figura 23), implantação do selante de fibrina (Figura 24) e sutura (Figura 25)	59
Figuras 26 a 28:	Estas figuras ilustram a região da calvária, antes (Figura 26) e após (Figura 27 e 28) a sua redução para inclusão em parafina	60
Figura 29:	Desenho esquemático da área seccional do defeito na disposição em que os cortes histológicos foram realizados	61
Figura 30:	Exemplos das avaliações morfométricas de uma fotomicrografia (a); Mensuração da extensão linear do defeito (b); Mensuração da área total do defeito (c); Mensuração da matriz osteóide neoformada (d)	62
Figura 31:	GCRS 15 dias – (a) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea,	69

	principalmente nas proximidades da região supradural (RSD). (b) região central do defeito com ocupação linear de matriz osteóide neoformada (MON) e ocupação linear de tecido conjuntivo fibroso (TCF) abrangendo um terço do defeito. Vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito. Coloração por tricrômico de Masson Goldner (TMG)	
Figura 32:	GCRS 15 dias – (a) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea, principalmente nas proximidades da região supradural (RSD). A figura 32 (b) mostra região central do defeito com ocupação linear de matriz osteóide neoformada (MON) e ocupação linear de tecido conjuntivo fibroso (TCF) abrangendo um terço do defeito. Vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito. Coloração por picrossírius <i>red</i> (PIFG)	70
Figura 33:	GCRS 15 dias – (a) e (b) – matriz osteóide neoformada (MON), associada a osteoblastos (OB) e osteócitos (OC). No tecido conjuntivo fibroso (TCF) observam-se vasos sanguíneos (VS), células inflamatórias (CI) e fibroblastos (F) - (TMG)	71
Figura 34:	GCRS 45 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea, principalmente nas proximidades da região supradural (RSD) e ocupação linear de tecido conjuntivo fibroso (TCF) com presença de vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito - (TMG)	72
Figura 35:	GCRS 45 dias – (a) e (b) – matriz osteóide neoformada (MON), associada a osteoblastos (OB) e osteócitos (OC) e medula óssea (MO). No tecido conjuntivo fibroso (TCF) observam-se e fibroblastos (F) - (TMG)	73
Figura 36:	GCRS 45 dias – (a) e (b) – região central do defeito apresenta tecido conjuntivo fibroso (TCF) com presença de vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito - (PIFG) e (TMG)	74
Figura 37:	GCRS 120 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e ocupação de tecido conjuntivo fibroso (TCF) - (TMG)	75
Figura 38:	GCRS 120 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e ocupação por tecido conjuntivo fibroso (TCF) no centro do defeito colorações por (TMG) e hematoxilina-eosina (HE)	76
Figura 39:	GCRS 120 dias – (a) e (b) – matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e ocupação de tecido conjuntivo fibroso (TCF). Vaso sanguíneo (VS) na região central do defeito - (HE), (PIFG)	77
Figura 40:	GCRS 120 dias – (a) – representa região de borda óssea (BO) com matriz osteóide neoformada (MON) justaposta (HE) e figura 40b representa a mesma região, obtida por microscopia de polarização, em que se pode observar a estrutura lamelar do osso pertencente à borda óssea	78

Figura 41:	GHARS 15 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO), presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento do defeito ósseo com o BHA - (HE), (PIFG)	81
Figura 42:	GHARS 15 dias – (a) e (b) – presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento do defeito ósseo com o BHA, estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF) e vasos sanguíneos (VS) - (HE)	82
Figura 43:	GHARS 15 dias – (a) e (b) – estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF), septos fibrosos (SF) no interior do biomaterial (seta), vasos sanguíneos (VS), biomaterial de HA (BHA) e presença de célula gigante (CG) em proximidade com o BHA e de outras células inflamatórias (CI) no TCF (seta) - (PIFG), (TMG)	83
Figura 44:	GHARS 45 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO), presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento do defeito ósseo pelo BHA - (HE)	84
Figura 45:	GHARS 45 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO), tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento do defeito ósseo pelo BHA. Estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF), septos fibrosos (SF) no interior das microesferas - (TMG), (PIFG)	85
Figura 46:	GHARS 45 dias – (a) e (b) – presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento dos BHA. Estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF), presença de plasmócitos (PL), septos fibrosos (SF) no interior das microesferas, vasos sanguíneos (VS) - (PIFG), (TMG)	86
Figura 47:	GHARS 120 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO) e justaposta ao biomaterial de HA (BHA). Presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e vasos sanguíneos (VS). Preenchimento do defeito ósseo com os BHA - (HE), (TMG)	87
Figura 48:	GHARS 120 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) justaposta ao biomaterial de HA (BHA), tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e vasos sanguíneos (VS) - (HE), (TMG)	88
Figura 49:	GHARS 120 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO) e justaposta ao biomaterial de HA (BHA). Presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA), com formação de septos fibrosos (SF) e preenchimento do defeito ósseo com os BHA e vasos sanguíneos (VS) - (PIFG)	89

Figura 50:	GFRS 15 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea, principalmente nas proximidades da região supradural (RSD). Presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) - (TMG), (HE)	92
Figura 51:	GFRS 15 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea, principalmente nas proximidades da região supradural (RSD). Presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF). Matriz osteóide neoformada (MON), associada à medula óssea (MO), osteoblastos (OB) e osteócitos (OC) -(PIFG), (TMG)	93
Figura 52:	GFRS 15 dias – (a) e (b) – região central do defeito com ocupação linear de matriz osteóide neoformada (MON) e ocupação linear de tecido conjuntivo fibroso (TCF) abrangendo um terço do defeito. Vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito - (TMG), (PIFG)	94
Figura 53:	GFRS 45 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea, principalmente nas proximidades da região supradural (RSD). Presença de tecido conjuntivo fibroso com vasos sanguíneos (VS) - (TMG)	95
Figura 54:	GFRS 45 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea, principalmente nas proximidades da região supradural (RSD). Presença de tecido conjuntivo fibroso. Osteoblastos (OB) e osteócitos (OC). No tecido conjuntivo fibroso (TCF) observam-se vasos sanguíneos (VS) e fibroblastos (F) - (TMG), (PIFG)	96
Figura 55:	GFRS 45 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea, principalmente nas proximidades da região supradural (RSD). Região central do defeito com ocupação linear de matriz osteóide neoformada (MON) e ocupação linear de tecido conjuntivo fibroso (TCF). Vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito - (PIFG)	97
Figura 56:	GFRS 120 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito. Presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) apenas na região central do defeito. Vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito - (TMG)	98
Figura 57:	GFRS 120 dias – (a) e (b) – matriz osteóide neoformada (MON), osteoblastos (OB) e osteócitos (OC). No tecido conjuntivo fibroso (TCF) observam-se vasos sanguíneos (VS) e fibroblastos (F) - (TMG)	99
Figura 58:	GFRS 120 dias – (a) e (b) – presença de tecido conjuntivo	100

	fibroso (TCF) principalmente na região central do defeito. Vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito. Matriz osteóide neoformada (MON) - (PIFG)	
Figura 59:	GFRS 120 dias – (a) – representa região de borda óssea (BO) com matriz osteóide neoformada (MON) justaposta (HE) e (b) representa a mesma região, obtida por microscopia de polarização em que é observado aspecto lamelar na região de matriz osteóide neoformada	101
Figura 60:	GHAFRS 15 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO), presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento do defeito ósseo com o BHA - (TMG), (PIFG)	104
Figura 61:	GHAFRS 15 dias – (a) e (b) – tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA), com início de formação dos septos fibrosos (SF) e preenchimento dos BHA - (HE), (PIFG)	105
Figura 62:	GHAFRS 15 dias – (a) e (b) – estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF), vasos sanguíneos (VS), biomaterial de HA (BHA) - (PIFG), (TMG)	106
Figura 63:	GHAFRS 45 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO), presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento do defeito ósseo pelo BHA - (HE)	107
Figura 64:	GHAFRS 45 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO), presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio ao biomaterial de HA (BHA), septos fibrosos (SF) no interior do BHA, vasos sanguíneos (VS) – (TMG), (PIFG)	108
Figura 65:	GHAFRS 45 dias – (a) e (b) – estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF), septos fibrosos (SF) no interior do BHA, vasos sanguíneos (VS), biomaterial de HA (BHA) e presença de células gigantes (CG) englobando fragmentos do BHA - (PIFG), (HE)	109
Figura 66:	GHAFRS 120 dias – (a) e (b) – matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO) e justaposta ao biomaterial de HA (BHA). Presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento do defeito ósseo com o BHA, vasos sanguíneos (VS) - (HE), (TMG)	110
Figura 67:	GHAFRS 120 dias – (a) e (b) – matriz osteóide neoformada (MON) justaposta ao biomaterial de HA (BHA). Presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) com septos fibrosos (SF) e preenchimento do defeito ósseo com o BHA. Estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF) e vasos sanguíneos (VS) - (TMG), (PIFG)	111
Figura 68:	GHAFRS 120 dias – (a) e (b) – matriz osteóide neoformada (MON) justaposta ao biomaterial de HA (BHA). Presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA	112

	(BHA) e preenchimento dos BHA. Estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF) e vasos sanguíneos (VS) - (PIFG), (TMG)	
Figura 69:	Região de matriz osteóide neoformada, próxima à borda óssea, mostrando duas regiões selecionadas para EDS	130
Figura 70:	Matriz osteóide neoformada na região central do defeito, mostrando três regiões selecionadas para EDS	131
Figura 71:	Região correspondente à borda óssea, mostrando três regiões selecionadas para EDS	132
Figura 72:	Região correspondente à borda óssea, mostrando três regiões selecionadas para EDS	134
Figura 73:	Região de matriz osteóide neoformada, próxima à borda óssea, mostrando duas regiões selecionadas para EDS	135
Figura 74:	Região correspondente à borda óssea, mostrando três regiões selecionadas para EDS	136
Figura 75:	Região correspondente à borda óssea, mostrando quatro regiões selecionadas para EDS	137
Figura 76:	As figuras 76a e 76c representam a área correspondente à matriz osteóide neoformada. A figura 76a mostra o arranjo dos cristais de HA em um padrão circular (círculos pontilhados) típico de observação na direção do eixo cristalográfico em direção paralela às fibrilas de colágeno. Na figura 76c, observa-se a estrutura cristalina do osso. No detalhe desta figura, mostra-se um cristal de HA. A figura 76b mostra espectro de EDS, no qual o pico do elemento estrôncio encontra-se presente	140
Gráfico 1:	DRX das microesferas de HA. O difratograma mostra os principais picos de uma HA $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ padrão, de acordo com a ficha padrão PCPDFWIN 09.0432. É possível observar pelo eixo y que a amostra tem picos estreitos e de alta intensidade, característico de amostra com alta cristalinidade	50
Gráfico 2:	O gráfico acima indica os grupos funcionais de uma HA $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ padrão, com as bandas de vibração apontadas. A largura das bandas indica que a HA, após a sinterização, não perdeu nenhuma de suas características elementares. Este material é constituído pelas bandas de $OH^-$ em $3574\text{ cm}^{-1}$ e $630\text{ cm}^{-1}$ e as bandas de fosfato nas regiões de $1000\text{ cm}^{-1}$ a $1100\text{ cm}^{-1}$ e $500\text{ cm}^{-1}$ a $600\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente	50
Gráfico 3:	Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para comparação das médias de matriz osteóide neoformada nos níveis de tempo dentro de cada grupo. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%	119
Gráfico 4:	Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para comparação das médias de matriz osteóide neoformada nos níveis de tempo no grupo GHA. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%	120
Gráfico 5:	Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para	121

	comparação das médias de matriz osteóide neoformada nos níveis de tempo no grupo GHAFRS. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%	
Gráfico 6:	Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para comparação das médias de matriz osteóide neoformada nos níveis de tempo no grupo GHARS. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%	121
Gráfico 7:	Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para comparação das médias de matriz osteóide neoformada nos de grupo no tempo de 15 dias. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%	123
Gráfico 8:	Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para comparação das médias de matriz osteóide neoformada nos de grupo no tempo de 45 dias. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%	124
Gráfico 9:	Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para comparação das médias de matriz osteóide neoformada nos de grupo no tempo de 120 dias. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%	125
Gráfico 10:	Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para comparação das médias de extensão linear do defeito nos grupos. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%	128
Gráfico 11:	EDS corresponde à 1ª região selecionada da figura 69	130
Gráfico 12:	EDS corresponde à 2ª região selecionada da figura 69	131
Gráfico 13:	EDS corresponde à 1ª região selecionada da figura 70	131
Gráfico 14:	EDS corresponde à 2ª região selecionada da figura 70	132
Gráfico 15:	EDS corresponde à 3ª região selecionada da figura 70	132
Gráfico 16:	EDS corresponde à 1ª região selecionada da figura 71	133
Gráfico 17:	EDS corresponde à 2ª região selecionada da figura 71	133
Gráfico 18:	EDS corresponde à 3ª região selecionada da figura 71	133
Gráfico 19:	EDS corresponde à 1ª região selecionada da figura 72	134
Gráfico 20:	EDS corresponde à 2ª região selecionada da figura 72	134
Gráfico 21:	EDS corresponde à 3ª região selecionada da figura 72	135
Gráfico 22:	EDS corresponde à 1ª região selecionada da figura 73	135
Gráfico 23:	EDS corresponde à 2ª região selecionada da figura 73	136
Gráfico 24:	EDS corresponde à 1ª região selecionada da figura 74	136
Gráfico 25:	EDS corresponde à 2ª região selecionada da figura 74	137
Gráfico 26:	EDS corresponde à 3ª região selecionada da figura 74	137
Gráfico 27:	EDS corresponde à 1ª região selecionada da figura 75	138
Gráfico 28:	EDS corresponde à 2ª região selecionada da figura 75	138
Gráfico 29:	EDS corresponde à 3ª região selecionada da figura 75	138
Gráfico 30:	EDS corresponde à 4ª região selecionada da figura 75	139

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Componentes do selante de fibrina	51
Tabela 2:	Composição nutricional da ração Labina (Purina) utilizada para alimentar os ratos	54
Tabela 3:	Distribuição dos animais de acordo com o grupo e ponto biológico	55
Tabela 4:	Distribuição dos animais de acordo com o grupo e ponto biológico	57
Tabela 5:	Análise de variância para os dados de percentagem de matriz osteóide neoformada	117
Tabela 6:	Médias (desvios padrão) da percentagem de matriz osteóide neoformada nos níveis dos fatores grupo e tempo e teste de Tukey para comparação de médias com nível de significância de 5%	118
Tabela 7:	Análise de variância para os dados de extensão linear do defeito	127
Tabela 8:	Média, desvio padrão e teste de Tukey ( $p=0,05$ ) para os diferentes grupos	128



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
<i>Ad libidum</i>	Expressão em latim que significa “à vontade”
µg	Micrograma
µm	Micrometro
®	Marca registrada
BHA	Biomaterial de hidroxiapatita
BMPs	<i>Bone morphogenetic proteins</i> – Proteínas ósseas morfogenéticas
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CG	Célula gigante
CI	Células inflamatórias
Coppe	Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DRX	Difração de raios-X
EDS	Espectrometria de Energia Dispersiva de raios-X
EDTA	Ácido etileodiaminotetracético
F	Fibroblasto
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier
GC	Grupo Controle
GCRS	Grupo Controle com administração do Ranelato de Estrôncio
GF	Grupo Fibrina
GFRS	Grupo Fibrina com administração do Ranelato de Estrôncio
GHA	Grupo Hidroxiapatita
GHAF	Grupo Hidroxiapatita Associado à Fibrina
GHAFRS	Grupo Hidroxiapatita Associado à Fibrina com administração do Ranelato de Estrôncio
GHARS	Grupo Hidroxiapatita com administração do Ranelato de Estrôncio
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina e eosina
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IGF	<i>Insulin growth factor</i> – Fator de crescimento derivado da insulina
kV	Kilovolt
LBTB	Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais
M	Molar
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MO	Medula óssea
MON	Matriz osteoíde neoformada
nm	Nanômetro
n°	Número
Ob	Osteoblasto
Oc	Osteoclasto
Pa	Pascal
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> - Fator de crescimento derivado das

	plaquetas
PIFG	Picrossírius <i>red</i>
PL	Plasmócito
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-β</i> - receptor do ativador do fator nuclear kappa-β
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-β ligand</i> - ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa-β -
rpm	Rotações por minuto
RSD	Região supra dural
SF	Septos fibrosos
TCF	Tecido conjuntivo fibroso
TMG	Tricrômico de Masson Goldner
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UI	Unidade internacional
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> - Fator de crescimento do endotélio vascular
VS	Vaso sanguíneo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>26</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
4.1 BIOMATERIAIS .....	48
4.1.1 Microesferas de HA .....	48
4.1.2 Selante de Fibrina.....	52
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	53
4.3 TÉCNICA CIRÚRGICA .....	58
4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS .....	60
4.5 ETAPA LABORATORIAL PARA ANÁLISE POR MICROSCOPIA ÓPTICA ..	60
4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA .....	61
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	62
4.8 ETAPA LABORATORIAL PARA ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA .....	63
4.8.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectrometria de energia dispersiva de raios-x (EDS) .....	63
4.8.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de alta resolução.....	64
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>66</b>
5.1 ANÁLISE DESCRITIVA POR MICROSCOPIA ÓPTICA .....	67
5.1.1 Grupo controle com administração de ranelato de estrôncio (GCRS) ....	67
5.1.2 Grupo hidroxiapatita com administração de ranelato de estrôncio (GHARS) .....	79
5.1.3 Grupo fibrina com administração de ranelato de estrôncio (GFRS).....	90
5.1.4 Grupo hidroxiapatita associado à fibrina com administração de ranelato de estrôncio (GHAFRS).....	102
5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	113
5.2.1 Percentagem de matriz osteóide neoformada .....	113
5.2.2 Extensão linear do defeito .....	125

5.3 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROMETRIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDS) .....	129
<b>5.3.1 Grupo controle com administração de ranelato de estrôncio (GCRS) ..</b>	<b>130</b>
<b>5.3.2 Grupo controle (GC) .....</b>	<b>137</b>
5.4 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE ALTA RESOLUÇÃO E ESPECTROMETRIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDS) .....	139
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>142</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>153</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>155</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>171</b>

***Introdução***

## 1 INTRODUÇÃO

A formação óssea ocorre de forma ininterrupta e se inicia durante o desenvolvimento fetal, persistindo durante a vida do indivíduo, por meio da remodelação deste tecido. O osso participa como reservatório dos íons cálcio e fosfato e é formado pela fase orgânica, constituída, sobretudo, pela proteína de colágeno tipo I; e pela fase inorgânica, composta principalmente por cristais nanométricos de hidroxiapatita (HA) (MEGHI, 1992; LEGEROS, 2002). Essas duas fases interagem para fornecer propriedades mecânicas de elasticidade, resistência e dureza, únicas a esse tecido (HING, 2004). O osso apresenta-se em constante remodelação, regulado por fatores locais e hormonais e o seu mecanismo de reparo ocorre por meio de regeneração, sem que haja formação de cicatriz fibrosa (SODEK; MCKEE, 2000; BEZERRA et al., 2005).

É válido ressaltar que a consolidação do reparo ósseo está condicionada a determinadas condições, tais como amplo suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica, presença de um arcabouço tridimensional e tamanho do sítio lesionado, pois em regiões em que a morfologia e dimensão do defeito são extensas e críticas ao reparo, o mecanismo regenerativo torna-se limitado e, dessa forma, há formação de tecido conjuntivo fibroso (KIM et al., 2006).

Torna-se, portanto, premente o desenvolvimento de biomateriais ou técnicas regenerativas com o objetivo de restabelecer a estrutura e função perdidas, haja vista que os enxertos ósseos autógenos, homogêneos e heterogêneos, empregados clinicamente na atualidade, apresentam algumas limitações (GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005). Portanto, a bioengenharia tecidual óssea encontra-se frente ao desafio fundamental de desenvolver biomateriais e técnicas que levem à otimização da regeneração tecidual óssea. Para tal, este novo campo da área biomédica emprega princípios das engenharias, da física e das ciências biológicas (MIGUEL et al., 2006; BOROJEVIC, 2008). Neste âmbito, pesquisadores tentam mimetizar o processo natural de reparo ósseo, por meio da utilização de arcabouços, disponíveis em diversas formas de apresentação, como pó, pasta, gel, membrana, bloco, disco, grânulo, microesfera, entre outras, que podem estar carregados ou não com células, proteínas ou medicamentos (UEDA et al., 2000; UEMURA et al., 2003).

Dentre os diferentes tipos de biomateriais, os cerâmicos têm sido estudados extensivamente e aplicados clinicamente como biomateriais regenerativos, substitutos do enxerto ósseo (OSATHANON et al., 2008). Dentre os tipos de biomateriais cerâmicos, a HA se destaca em função do seu biomimetismo com a fração inorgânica do tecido ósseo, por ser biocompatível, radiopaco, osteocondutor, capaz de adsorver proteínas de adesão, fatores de crescimento e estabelecer condições locais necessárias à diferenciação de células da linhagem osteogênica em osteoblastos para a formação de tecido ósseo (RIMINUCCI; BIANCO, 2003).

As cerâmicas de HA podem se apresentar no formato de microesferas, o que permite a sua aplicação por meio de sistemas injetáveis, com a utilização de técnicas cirúrgicas pouco invasivas. A partir da utilização deste formato, espera-se que, depois de implantadas, estas se amoldem de tal forma no leito receptor, que possam auxiliar na promoção da angiogênese e da adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, com posterior formação de matriz osteóide em nível local (BARRIAS et al., 2005; 2006; MARCACCI et al., 2007).

A consolidação da regeneração óssea está condicionada à estabilidade mecânica do biomaterial, e, na tentativa de evitar o deslocamento de materiais particulados, onde se incluem as microesferas, pode-se utilizar o selante de fibrina, um agente aglutinante responsável pela formação de uma trama firme e mecanicamente estável, com boas propriedades adesivas. Ademais, o selante de fibrina pode ser utilizado com o objetivo de selar cavidades, possui potencial homeostático, estimula a angiogênese e funciona como um arcabouço celular, auxiliando assim no reparo tecidual (CHAN; BOISJOLY, 2004; SPOTNITZ; PRABHU, 2005; LE NIHOUANEN et al., 2007).

Em adição, devido à dificuldade regenerativa dos defeitos ósseos de dimensões críticas, mesmo em indivíduos metabolicamente saudáveis, pode-se vislumbrar a possibilidade de utilização do medicamento ranelato de estrôncio na tentativa de auxiliar na regeneração óssea. Este fármaco, utilizado clinicamente para tratar indivíduos portadores de osteoporose, possui modo de ação dual, por ser capaz de diminuir a reabsorção do tecido ósseo e de manter ou aumentar a sua formação. Tal efeito já foi comprovado em diversos estudos realizados *in vitro* e *in vivo* (MARIE et al., 2001; BOIVIN; MEUNIER, 2003; AMMANN et al., 2004;

REGINSTER et al., 2004; FARLAY et al., 2005; MARIE et al., 2006; ATKINS et al., 2008; REGINSTER et al., 2008; MAÏMOUN et al., 2010).

Com o intuito de se obter um incremento do reparo ósseo auxiliado localmente pelas microesferas de HA, juntamente com selante de fibrina, quando implantados em defeitos críticos, pode-se, ainda, instituir uma estratégia de atuação no metabolismo ósseo com o medicamento composto por ranelato de estrôncio, com a associação do efeito local e sistêmico.



***Revisão da Literatura***

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O esqueleto dos mamíferos é composto, fundamentalmente, pelo tecido ósseo, que desempenha diversos papéis biológicos, funcionando como um sistema de alavancas, no apoio estrutural e proteção a órgãos vitais e à medula óssea. Além disso, participa da regulação metabólica, por ser um reservatório de íons cálcio, fosfato e magnésio, que auxilia, portanto, na homeostase plasmática destes elementos químicos, por meio da regulação endócrina (MEGHJI, 1992; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; BOSKEY, 2007).

O osso é um tipo de tecido conjuntivo especializado mineralizado que, para ser formado, necessita da presença de três células peculiares a ele: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, responsáveis, respectivamente, pela síntese, manutenção e reabsorção da matriz osteóide. O primeiro tipo celular deriva de células mesenquimais indiferenciadas, advindas dos vasos sanguíneos, e do perióstio e endóstio, que são as membranas que recobrem o osso, respectivamente, nas suas superfícies externa e interna. Os osteoblastos, além de formarem a matriz orgânica do osso, por meio da secreção de proteínas de colágeno do tipo I (principal componente orgânico), de proteínas não colagênicas, de proteoglicanos e de glicoproteínas, são responsáveis pela regulação da deposição dos cristais minerais (MEGHJI, 1992; TRIFFITT, 1996; RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998; LYNCH; GENKO; MARX, 1999; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006).

A formação óssea ocorre de forma ininterrupta e se inicia durante o desenvolvimento fetal, persistindo durante a vida do indivíduo, por meio da remodelação desse tecido. O estímulo à diferenciação das células mesenquimais para a formação de células da linhagem osteogênica é controlado pela sequência de sinais moleculares, mediada pela regulação gênica. As proteínas ósseas morfogenéticas (*bone morphogenetic proteins* – BMPs) representam uma família de citocinas, sendo que as BMPs-2, 4, 7 e 8 são os tipos de BMPs responsáveis pelo processo de indução da osteogênese, na medida em que estimulam a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos (LAURENT et al., 2004). Outro fator importante a ser considerado para a formação da matriz osteóide é a angiogênese, pois, além de garantir o suprimento de oxigênio e nutrientes a esta matriz, por meio

da circulação sanguínea, a presença do fator de crescimento do endotélio vascular (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) estimula a diferenciação de células da linhagem osteogênica em osteoblastos e inibe a sua apoptose. Outros fatores de crescimento relacionados à estimulação da formação do tecido ósseo são o fator de crescimento derivado das plaquetas (*platelet-derived growth factor* – PDGF), o fator de crescimento derivado de insulina (*insulin growth factor* – IGF) e o fator de crescimento do fibroblasto (*fibroblast growth factor* – FGF) (CARANO; FILVAROFF, 2003; PETERSON et al., 2003; LAURENT et al., 2004). A matriz extracelular possui ação importante no mecanismo de adesão celular, pela presença do colágeno e da fibronectina, proteínas que se aderem às integrinas, que são proteínas presentes na membrana das células (AUBIN; LIU, 1996).

Alguns osteoblastos, durante a secreção da matriz osteóide, ficam aprisionados no seu interior, quando passam a ser denominados osteócitos, e ocupam as lacunas do tecido ósseo, possuem prolongamentos citoplasmáticos nos canalículos ósseos, que possibilitam a sinalização e o transporte iônico e de pequenas moléculas de uma célula para outra (PARFITT, 2002).

A fase inorgânica do tecido ósseo é composta, principalmente, por íons cálcio e fosfato, e, através do método de difração de raios-X (DRX), pode-se identificar a presença de cristais de HA, com fórmula química representada por  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Entretanto, a composição química do mineral presente na estrutura óssea não corresponde exatamente à sua fórmula estequiométrica, pois a superfície do cristal é hidratada e apresenta íons como carbonato, magnésio, pirofosfato, flúor, estrôncio e proteínas que alteram a razão Ca/P dos cristais de HA e podem inibir o seu crescimento (Figura 1). Para que haja a formação de cristais de HA de permeio às proteínas de colágeno, é fundamental haver o estímulo à expressão gênica para a secreção de moléculas que estão associadas à maturação da matriz osteóide, como fosfatase alcalina, osteopontina, sialoproteína óssea e osteocalcina. Especula-se que estas participem da regulação do tamanho, orientação e modo de deposição dos cristais minerais (RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998; SODECK; MCKEE, 2000; ZHANG et al., 2003; HEANEY, 2003; HING, 2004; REY et al., 2006; 2009).

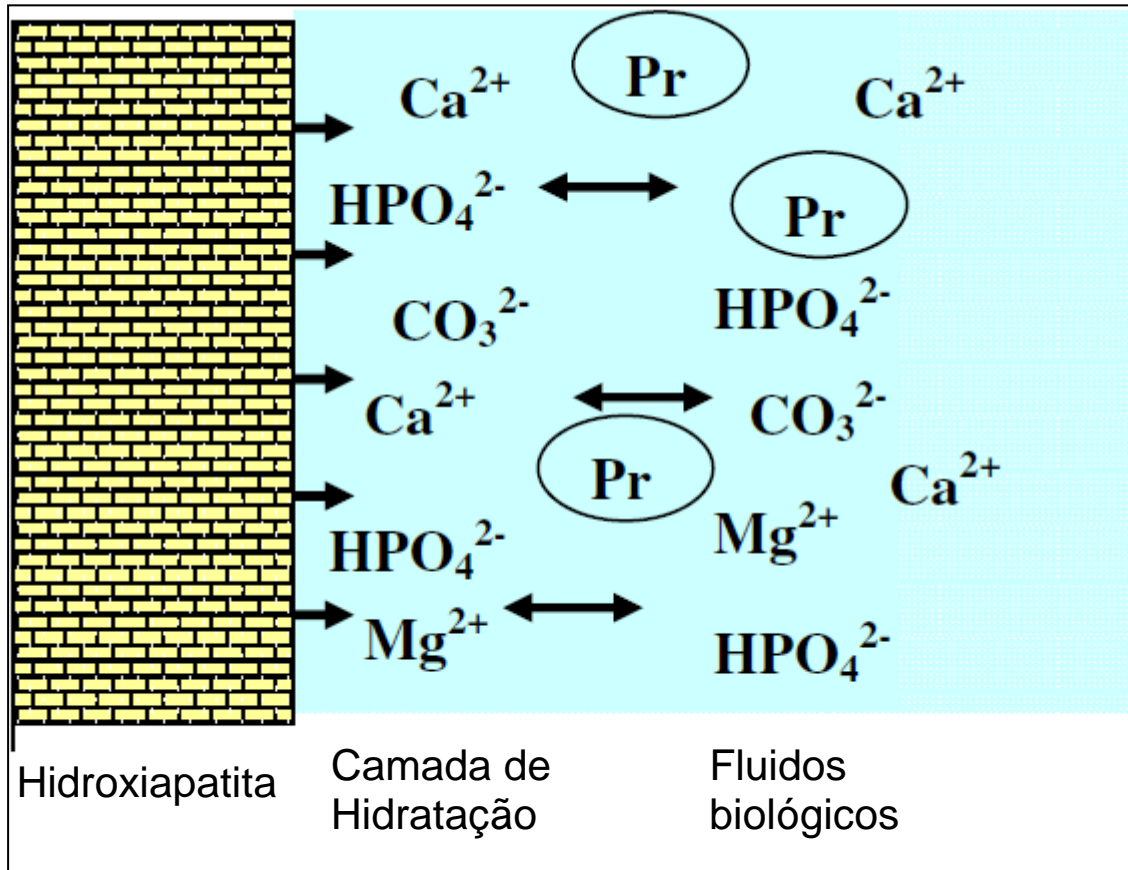


Figura 1: Esquema que representa os nanocristais de hidroxiapatita do tecido ósseo. Na superfície do cristal existe uma camada de hidratação com íons, que podem ser trocados por íons e proteínas provenientes dos fluidos biológicos (REY et al., 2009).

Os osteoclastos são células gigantes e multinucleadas provenientes da linhagem monócito-fagocitária que participam ativamente da renovação do tecido ósseo na medida em que secretam hidrolases, colagenases e ácidos fracos em um microambiente situado na superfície deste tecido, com sua subsequente reabsorção. Este mecanismo é coordenado por citocinas e hormônios, como a calcitonina e o paratormônio (TEITELBAUM, 2000; BEZERRA et al., 2005).

No início da formação do tecido ósseo, a matriz osteóide se encontra com as fibras de colágeno depositadas de forma desorganizada e com menor quantidade de fração inorgânica, sendo que nesse estágio o osso é classificado como imaturo ou primário. Posteriormente, com a evolução do processo osteogênico, ocorre a formação de um tecido ósseo em que se observa a presença de proteínas de colágeno organizadas em estrutura lamelar e com maior deposição mineral. Nesse estágio, o osso passa a ser classificado como maduro ou secundário (RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998).

As moléculas de colágeno podem ser avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), técnica que possibilita a observação de moléculas de tropocolágeno, que possuem, aproximadamente, comprimento de 300 nm e diâmetro de 1,5 nm. Estas fibrilas estão alinhadas paralelamente e formam estruturas como placas, que se sobrepõem e apresentam deslocamento de aproximadamente um quarto do seu comprimento no sentido do maior eixo das moléculas. A cada quatro conjuntos de placas, tal estrutura se repete, o que determina regiões de sobreposição do colágeno denominadas *overlap*, quando a fibrila de colágeno é observada na direção perpendicular ao seu maior eixo. As regiões de superposição não são contínuas e medem aproximadamente 27 nm de comprimento, pois, no plano de cada placa, as moléculas estão deslocadas em cerca de 40 nm em direção ao eixo maior da estrutura e formam regiões “vazias”, conhecidas como *gaps*. Os *gaps* são espaços orientados perpendicularmente em relação ao eixo da fibrila (RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998).

Para que ocorra a mineralização da matriz osteóide, previamente secretada pelos osteoblastos, deve haver a presença de vesículas da matriz, originárias da membrana celular dos osteoblastos e condroblastos (ANDERSON, 2003; SANTIN et al., 2006). Essas vesículas possuem canais de cálcio, que facilitam o influxo do íon do meio extracelular para o interior destas. Elas são ricas em fosfatase alcalina, uma glicoproteica, que estimula a liberação de íons fosfato (TAKANO et al., 2000; SANTIN et al., 2006). Quando ocorre a saturação dos íons cálcio e fosfato, inicia-se a nucleação, seguida pela rápida formação dos cristais de HA (Figura 2) (ANDERSON, 2003; BALCERZAK et al., 2003). Tais agregados cristalinos crescem e rompem as vesículas; em consequência, ocorre a mineralização das regiões entre as fibrilas de colágeno. Posteriormente, ocorre a mineralização nas regiões de *gaps* das fibrilas, a qual não depende da presença das vesículas da matriz (BALCERZAK et al., 2003).

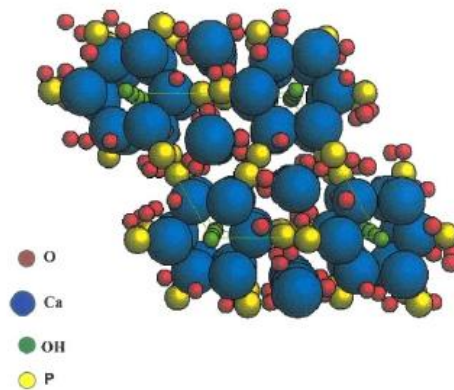


Figura 2: Estrutura cristalina da HA observada na direção do eixo *c* (KAY, YOUNG, POSNER, 1964).

Macroscopicamente, o osso maduro pode ser classificado como esponjoso e cortical. Ambos os tipos possuem lamelas, porém, no osso esponjoso, que se situa na porção interna da estrutura óssea, suas lamelas são paralelas entre si, e possuem estrutura de trabéculas, que albergam a medula óssea. O osso cortical situa-se na periferia da estrutura óssea e forma um arcabouço mais rígido e compacto, devido à disposição concêntrica das suas lamelas. Essa disposição leva à formação do sistema de Havers, estrutura importante, por apresentar no seu interior vasos sanguíneos, que se interconectam através dos canais de Volkmann (HING, 2004).

Quando existe a necessidade de renovação do tecido ósseo, a exemplo da ocorrência de uma micro-trinca ou mesmo pelo processo fisiológico de renovação óssea, os osteócitos locais morrem por apoptose e, com isso, inicia-se a remodelação tecidual óssea, por meio do mecanismo de osteoclastogênese. O início da remodelação óssea, inicialmente, envolve a ativação de pré-osteoblastos, que expressam o RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa- $\beta$  ligand* – ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa- $\beta$ ) em sua superfície. Os pré-osteoclastos expressam o receptor RANK (*receptor activator of nuclear factor kappa- $\beta$*  – receptor do ativador do fator nuclear kappa- $\beta$ ), o que leva à interação RANK-RANKL. Essa interação estimula a proliferação e fusão dos pré-osteoclastos, que se fundem e formam células multinucleares, os osteoclastos. Finalmente, os pré-osteoblastos se diferenciam para formar novo osso. A osteoprotegerina é uma proteína secretada pelos osteoblastos que é capaz de se ligar ao RANKL e impedir a

ativação e diferenciação dos osteoclastos. Tal mecanismo inibe a osteoclastogênese e, dessa forma, ocorre a regulação da renovação óssea (BONNELYE et al., 2008; ATKINS et al., 2009; BRENNAN et al., 2009; HURTEL-LEMAIRE et al., 2009; FROMIGUÉ et al., 2009).

Embora o osso apresente grande potencial regenerativo, devido à habilidade dos fatores de crescimento em auxiliarem no direcionamento à diferenciação de células-tronco para as vias condrogênica e osteogênica, e à função das forças mecânicas em estimular a renovação tecidual óssea, tal potencial não é ilimitado. Em situações em que haja quebra da homeostase, em regiões com extenso comprometimento da malha vascular ou do tecido ósseo, como pode ocorrer em anomalias de desenvolvimento, doenças sistêmicas degenerativas, em distúrbios metabólicos, como na osteoporose, em neoplasias, traumas ou infecções, o reparo da lesão leva à formação de tecido conjuntivo fibroso cicatricial, que culmina com danos funcionais ou estéticos e limita a qualidade de vida do indivíduo acometido (LIM; LEE; YEO, 2000; SICCA et al., 2000; SEAL; OTERO; PANITCH, 2001; LOGEART-AVRAMOLOU et al., 2005; BOROJEVIC, 2008).

Esse tipo de defeito é denominado crítico, e técnicas de enxertia podem ser utilizadas com o objetivo de minimizar ou restituir plenamente os danos causados pela formação do tecido cicatricial. Dentre as opções disponíveis, o enxerto autógeno mostra-se como o mais empregado na atualidade por possuir maior previsibilidade de sucesso. Esse tipo de enxerto é obtido do mesmo indivíduo e ocorre a transferência de uma porção do tecido ósseo do leito doador para o leito receptor (GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005; INTINI et al., 2008). Tal enxerto é tido como o ideal para tratar lesões ósseas, pois fornece o tecido ósseo do próprio indivíduo, o que garante o suprimento vascular e celular para a região lesionada, sem suscitar resposta antigênica ou reação de corpo estranho. Entretanto, existem desvantagens e riscos que limitam a sua utilização, como a morbidade associada ao procedimento cirúrgico, a quantidade restrita de tecido ósseo na região doadora, o potencial risco de infecção e redução do seu volume, em cerca de 30%, principalmente nos primeiros 90 dias de pós-operatório (ARAUJO et al., 2003; ARAUJO; LINDHE, 2005; GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005).

Outro tipo de enxerto passível de utilização é o do tipo homogêneo, que é obtido a partir de indivíduos diferentes e de mesma espécie, adquirido a partir de

bancos de ossos. Possui como vantagem a eliminação da necessidade do sítio doador do próprio indivíduo, o que reduz o tempo cirúrgico, porém traz a possibilidade de transmissão de doenças infectocontagiosas e de desenvolvimento de resposta antigênica. Outro tipo de enxerto ósseo é o heterólogo, que apresenta as mesmas características referentes aos homogêneos, e é obtido de espécies diferentes, sendo o de origem bovina o mais comercializado e utilizado para a regeneração óssea (DELACURE, 1994; LEGEROS, 2002; GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005).

A medicina regenerativa busca o reparo de tecidos lesionados, por meio do controle e ampliação da capacidade natural de regeneração dos tecidos. A bioengenharia tecidual insere-se neste contexto e visa à utilização de biomateriais que atuem como arcabouços capazes de substituírem tecidos ou órgãos que perderam a sua estrutura ou função. Estudiosos da bioengenharia tecidual óssea almejam a regeneração de defeitos ósseos de dimensões críticas, assim denominados por não se regenerarem totalmente ao longo da vida do indivíduo (MULLIKEN et al., 1980; NEVINS; MELLONIG, 1994; JOVANOVIC, 1995; UEMURA et al., 2003; BOROJEVIC, 2008).

Em virtude das restrições, anteriormente descritas, quanto à utilização dos enxertos ósseos, ressalta-se a importância da medicina regenerativa, área que busca criar condições ideais para o reparo e a substituição de tecidos lesionados, fornecendo elementos celulares requeridos, fatores de proliferação e diferenciação celular e estruturas supramoleculares que auxiliem na organização espacial e funcional de novos tecidos, ocasionando a sua integração sistêmica. As terapias celulares e a bioengenharia tecidual estão inseridas nesse contexto e empregam princípios das engenharias, da física e das ciências biológicas com a finalidade de restaurar a função perdida de um tecido ou órgão (DUCHEYNE; QIU, 1999; LANGER; VACANTI, 1999; GREEN et al., 2002; STEVENS; GEORGE, 2005; MIGUEL et al., 2006; BOROJEVIC, 2008).

Um dos focos da bioengenharia tecidual encontra-se na criação de biomateriais capazes de guiar e sustentar os processos regenerativos. Dessa forma, definem-se biomateriais como uma substância ou compostos de origem natural ou sintética, biocompatíveis, com exceção dos fármacos e quimioterápicos, que possam substituir de forma permanente ou transitória os tecidos perdidos, e estimular



reações químicas e biológicas favoráveis à sua função (ROSE et al., 2004; FLECKENSTEIN et al., 2006). Na bioengenharia tecidual óssea, o biomaterial, quando implantado, deve funcionar como um arcabouço que possibilite a migração, adesão e proliferação de células da linhagem osteogênica com subsequente deposição de matriz osteóide. É importante salientar que o potencial osteogênico dos biomateriais está condicionado às suas características físico-químicas, como topografia, rugosidade, energia de superfície, bem como à presença de espaços que possibilitem a proliferação vascular e a passagem de moléculas sinalizadoras, e a manutenção da sua forma adequada com o sítio de implantação, com velocidade de absorção proporcional à de regeneração tecidual óssea (BOYDE et al., 1999; ANSELME, 2000; DIETMAR; GARCIA, 2005; MASTROGIACOMO et al., 2005).

Os biomateriais podem se apresentar de diversas formas, como pó, pasta, gel, membrana, bloco, disco, grânulo, microesfera, dentre outras. Quanto ao modo de atuação, tanto os enxertos ósseos quanto os biomateriais podem atuar via três mecanismos: osteocondução, osteoestimulação e osteoindução. No primeiro mecanismo, o enxerto ósseo ou biomaterial funciona como um arcabouço que possibilita a angiogênese e a diferenciação de células mesenquimais em células da linhagem osteogênica para que ocorra a formação de tecido ósseo no leito receptor. A osteoestimulação promove a formação de tecido ósseo, por meio da implantação de osteoblastos juntamente com o enxerto ósseo ou com o biomaterial. O último mecanismo propicia a formação óssea pela diferenciação local das células mesenquimais, mesmo quando ocorre a implantação do enxerto ou biomaterial em sítios extra ósseos (GOSAIN et al., 2002; CARVALHO; BASSI; VIOLIN, 2004; GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005; GAROFALO, 2007; INTINI et al., 2008).

Antes de serem utilizados clinicamente, os biomateriais devem ser testados em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in vitro* são realizados com o objetivo de avaliar a viabilidade celular, por meio da citocompatibilidade, da adesão e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas e da linhagem osteogênica quando em contato com a superfície dos biomateriais. Os experimentos *in vivo* têm como objetivo analisar a biocompatibilidade do biomaterial, por meio da avaliação da intensidade da resposta inflamatória, da qualidade celular, da formação de novos vasos, bem como do potencial osteogênico dos biomateriais (ANSELME, 2000;

COSTA; MIGUEL; ROSA, 2005; BOROJEVIC, 2008). Portanto, os defeitos extensos a ponto de inviabilizarem a neoformação óssea são eficazes na avaliação do tipo de estratégia utilizada na regeneração tecidual (SAADEH et al., 2001).

*Rattus norvegicus* representa o modelo animal mais utilizado em experimentos *in vivo* para testar o potencial osteogênico de novos biomateriais. As vantagens de utilização desse tipo de animal incluem a facilidade de manipulação, por ser de pequeno porte, ter ciclos vitais curtos e metabolismo acelerado, quando comparado com os seres humanos, anatomia conhecida, necessitar de pouca quantidade de biomaterial para preenchimento do defeito e facilidade de implantação do biomaterial no leito receptor (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

A calvária é um tipo de osso que possui duas placas de osso cortical, separadas por diminuta porção de tecido ósseo do tipo esponjoso, o que a caracteriza como um osso do tipo díploe. Esse sítio anatômico é escolhido para avaliar o potencial osteogênico de biomateriais, por apresentar baixo suprimento sanguíneo, que reduz o aporte de moléculas sinalizadoras, nutrientes e fatores de crescimento, o que dificulta a regeneração tecidual óssea. O aporte sanguíneo de tal sítio anatômico provém, ainda, de ramificações da artéria dural e de estruturas adjacentes, como o músculo temporal (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998). Os defeitos ósseos críticos com 8,0 mm de diâmetro, confeccionados em calvária de rato, são amplamente utilizados para testar o potencial osteogênico de novos biomateriais (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; CARDOSO et al., 2006; MIGUEL et al., 2006; CARVALHO, 2010; ROLIM, 2010; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2011; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2011). Encontram-se trabalhos na literatura em que foram realizados defeitos ósseos, neste mesmo modelo animal e sítio anatômico, com 4 mm (MEINEL et al., 2005), 5 mm (CACCIAFESTA et al., 2001) e 6 mm (BRUNEL et al., 1996). Entretanto, nos defeitos ósseos com diâmetro de até 6 mm, a área residual remanescente é pequena e pode apresentar regeneração óssea completa apenas com o emprego de biomateriais osteocondutores, o que dificulta a avaliação do potencial osteoindutor de novos biomateriais (MIGUEL, 2008).

A biocompatibilidade de um biomaterial é um dos principais parâmetros a ser considerado em ensaios realizados *in vivo* e é definida como uma mínima resposta inflamatória ou imunitária após a interação desse arcabouço com os fluidos

tissulares presentes no microambiente do leito receptor (STANFORD, 1980; WATAHA, 2001). A confecção de defeitos ósseos, em nível experimental, para ensaios de cunho regenerativo, desencadeia uma resposta inflamatória causada pelo rompimento vascular, seguido de extravasamento sanguíneo e, quando se associa a este procedimento cirúrgico a implantação de biomateriais na região lesionada, ocorre interação sangue-superfície do biomaterial, formação de coágulo sanguíneo, inflamação aguda, inflamação crônica, reação granulomatosa com possibilidade de encapsulamento fibroso (ANDERSON; RODRIGUES; CHANG, 2008).

Após a implantação de biomateriais para regeneração de tecido ósseo, o advento de células mesenquimais indiferenciadas, sua migração, adesão às superfícies do biomaterial de preenchimento, proliferação e diferenciação em fibroblastos, com conseqüente formação de tecido conjuntivo fibroso, pode ocasionar o encapsulamento do biomaterial, com formação de tecido conjuntivo denso cicatricial, o que interfere no processo de regeneração óssea (BAXTER et al., 2002).

Os biomateriais utilizados em bioengenharia tecidual devem possuir nanoestrutura biomimética ou indutora da resposta celular desejada, pois as interações entre as células e os biomateriais ocorrem em escala nanométrica. O conhecimento e a capacidade de manipular os biomateriais nesta escala podem permitir a melhoria ou o desenvolvimento de novos arcabouços regenerativos. A velocidade dessa integração pode ser controlada pelas suas propriedades físico-químicas, como porosidade, podendo ser macroporoso, microporoso ou denso; pelo grau de cristalinidade, podendo ser amorfo ou cristalino; pela solubilidade, podendo ser absorvíveis ou não absorvíveis. Ademais, a qualidade nanoestrutural da sua superfície determina a sua interação com as células (GARG, 1999; VENUGOPAL; YANG; DENNISON; ONG, 2005; RAMAKRISHNA, 2005; BOROJEVIC, 2008). Para que o biomaterial possa auxiliar no reparo ósseo, é fundamental a compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de neoformação óssea (ANDRADE et al., 2007).

Nos últimos 20 anos, os biomateriais tiveram um avanço expressivo para aplicação na regeneração óssea (SANDEEP et al., 2006), e aqueles mais empregados para essa finalidade são os metais, os polímeros, as cerâmicas e

compósitos. As cerâmicas são eleitas como biomateriais preferenciais para implantação no sítio ósseo lesionado, pois possuem a capacidade de formar uma interface com o osso, característica chamada de bioatividade. Esta qualidade se deve à natureza química das biocerâmicas, em que alguns tipos são formados pelos íons cálcio e fosfato, que também compõem o tecido ósseo (LEGEROS, 2002; DACULSI, 2004). Além de serem biomateriais de fácil preparo e apresentarem baixo custo de produção, as biocerâmicas possuem composição química similar à fração inorgânica do osso, o que confere a este biomaterial potencial osteogênico, via mecanismo osteocondutor, e são capazes de adsorver proteínas, fatores de crescimento e auxiliar na diferenciação de células da linhagem osteogênica. A maior concentração de cálcio na matriz extracelular estimula a produção de colágeno e BMPs, enquanto que a maior concentração de fosfato neste meio leva ao estímulo à produção da osteopontina (NAKADE et al., 2001; BECK, 2003; OSATHANON et al., 2008). Entretanto, as biocerâmicas possuem a desvantagem de apresentarem baixa resistência mecânica (RIMINUCCI; BIANCO, 2003; KAWACHI et al., 2000).

Existem distintos biomateriais formados por fosfato de cálcio, que são classificados de acordo com a sua razão Ca/P. Diferentes fosfatos de cálcio que possuem tal razão na faixa que varia entre 0,5 e 2,0 podem ser sintetizados via precipitação sob condições de pH ácido ou alcalino. O produto dessa precipitação pode levar à formação de cerâmicas biocompatíveis e osteocondutoras (KAWACHI et al., 2000). Os diferentes tipos de biomateriais à base de fosfato de cálcio possuem diferentes graus de solubilidade, que podem ser descritos de acordo com a velocidade de absorção: fosfato tetracálcio ( $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ ), fosfato de cálcio amorfo,  $\alpha$ -fosfato tricálcico [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ],  $\beta$ -fosfato tricálcico [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4\text{O})_2$ ], HA [ $\text{Ca}_{10}\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ]. A absorção desses biomateriais ocorre devido a sua dissolução, que depende do pH do sítio receptor, pela sua desintegração física em fragmentos menores, pela liberação de mediadores químicos por células inflamatórias, que causam a redução do pH local (BARRALET et al., 2002; HENCH, 1998; ZHANG et al., 2003).

Entre os tipos de biomateriais compostos por fosfato de cálcio, a HA estequiométrica, que possui razão Ca/P igual a 1,67, pertence ao sistema cristalográfico hexagonal e é estruturalmente similar à apatita biológica, principal constituinte da fase mineral de ossos, dentina e esmalte no corpo humano. Ademais, esse tipo de biocerâmica apresenta estabilidade termodinâmica e forma ligações

químicas fortes com o tecido ósseo. Pelo fato de ser biocompatível e bioativa, a HA é amplamente utilizada como biomaterial de preenchimento, na sua forma densa ou porosa, em defeitos ósseos que não possuam demanda mecânica, como também para revestimento de implantes metálicos. Para melhorar as suas características mecânicas e aproximar-se do osso, em termos estruturais, pode-se utilizar a HA juntamente com fibras de colágeno, na forma de um compósito (TANAKA et al., 2003).

As cerâmicas de HA podem se apresentar particuladas ou em bloco e podem ser do tipo macroporosa ou densa. A síntese deste último tipo de cerâmica pode ser feita por meio do processo de sinterização. Tal processo, que consiste no aquecimento do biomaterial a altas temperaturas, que podem variar entre 1000 e 1300° C, em que as partículas sólidas se aglutinam, possibilita a remoção de água e a difusão dos átomos das duas redes cristalinas, o que resulta na formação de um biomaterial com menor percentual amorfo, determina maior cristalinidade e coesão aos cristais de HA, reduz o volume do biomaterial e aumenta a sua resistência mecânica. A cristalinidade de um biomaterial pode ser mensurada por meio de análise por DRX (ROSA, SHAREEF, NOORT, 2000; LEGEROS, 2002; RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2004; TADIC et al., 2004; REY et al., 2006; LACERDA; LAMEIRAS; SILVA, 2006).

As cerâmicas de HA podem ser confeccionadas no formato de microesferas, o que permite a sua aplicação por meio de sistemas injetáveis, empregando-se técnicas cirúrgicas minimamente invasivas. Espera-se, a partir da utilização desse formato, que, depois de implantadas, mesmo em sítios irregulares, estas se adéquem de tal forma que possam auxiliar na promoção da adesão, migração, proliferação e diferenciação celular em nível local. E, ainda, que os interstícios entre as microesferas se apresentem com tamanhos adequados, para promover angiogênese e posterior formação de matriz osteóide (SIVAKUMAR; MANJUBALA; PANDURANGA RAO, 2002; BARRIAS et al., 2005; 2006; MARCACCI et al., 2007).

A consolidação da regeneração óssea está condicionada à estabilidade mecânica do biomaterial, e, na tentativa de evitar o seu deslocamento, podem-se utilizar agentes aglutinantes, como o selante de fibrina, biomaterial responsável pela formação de uma rede firme e mecanicamente estável, com boas propriedades adesivas. Além de servir como um agente aglutinante para a estabilização de

biomateriais particulados, o selante de fibrina pode ser utilizado com o objetivo de selar cavidades, possui potencial homeostático, estimula a angiogênese, a quimiotaxia e funciona como um arcabouço celular, auxiliando assim no reparo tecidual. Ademais, esse biomaterial pode ser utilizado como veículo de liberação lenta para drogas e fatores de crescimento (CHAN; BOISJOLY, 2004; CORREA; BICAS, 2005; SPOTNITZ; PRABHU, 2005; LE NIHOANNEN et al., 2007).

O selante de fibrina apresenta, como principais constituintes, o fibrinogênio e a trombina, proteínas de origem humana, a aprotinina de origem bovina, que é um inibidor fibrinolítico de enzimas do tipo serino-proteases, e um componente inorgânico, o cloreto de cálcio. A combinação do fibrinogênio, juntamente com a trombina, é responsável por mimetizar as etapas finais da cascata de coagulação sanguínea, pois o fibrinogênio é clivado pela trombina em monômeros de fibrina, e o cálcio, presente no componente inorgânico do selante de fibrina, funciona como cofator para diversas reações que resultam na formação da fibrina, uma proteína insolúvel em água, que é um dos principais componentes do coágulo sanguíneo. O coágulo formado é fisiologicamente degradado por enzimas do tipo serinoproteases, porém, a presença da aprotinina no selante de fibrina inibe a ação destas enzimas, prevenindo a fibrinólise (KRISHNAN et al., 2003). Além da lise da fibrina pelas enzimas proteolíticas, a sua degradação também ocorre por meio do mecanismo de fagocitose (KANIA et al., 1998).

Alguns estudos sugerem que a fibrina seja capaz de proporcionar um incremento na regeneração óssea em decorrência da sua propriedade adesiva e homeostática, porém o seu potencial osteogênico ainda é questionável (LE GUÉHENNEC; LAYROLLE; DACULSI, 2004; MIRANDA et al., 2008). Um estudo experimental demonstrou que o uso do selante de fibrina em lesões ósseas em alvéolos de ratos pós-extrações dentárias proporcionou a proteção da ferida cirúrgica, não suscitou resposta inflamatória exacerbada e promoveu um incremento na regeneração tecidual óssea (YUCEL et al., 2003). Portanto, é válido salientar a importância do selante da fibrina na manutenção do coágulo sanguíneo para favorecer o processo regenerativo ósseo (OKAMOTO et al., 1994; 1995).

A associação do selante de fibrina, juntamente com biomateriais constituídos por fosfato de cálcio, tem sido empregada em estudos experimentais (NAKAMURA et al., 2007; LE NIHOANNEN et al., 2007; 2008; YOH et al., 2008; NAIR; VARMA;

JOHN, 2009). A aplicação do selante de fibrina, desse modo, resultou na melhoria da resistência mecânica, quando se comparou com os biomateriais à base de fosfato de cálcio utilizados isoladamente (LE NIHOANNEN et al., 2007). Quando há a associação do selante de fibrina com biomateriais na forma de partículas, ocorre maior facilidade de manipulação e adequação ao sítio receptor, principalmente pelo fato de haver maior estabilidade inicial dos biomateriais em relação às paredes do defeito ósseo. Quando esse selante é associado ao fosfato de cálcio do tipo bifásico, pode haver formação tecidual óssea em sítios ectópicos, a exemplo do músculo de ovelhas, o que demonstra a propriedade osteoindutora do compósito utilizado neste estudo, sendo que a neoformação de matriz osteoide ocorreu em íntimo contato com o biomaterial de fosfato de cálcio. Tal associação de biomateriais pode mimetizar o processo fisiológico de neoformação óssea (LE NIHOANNEN et al., 2007; 2008).

Em virtude da dificuldade regenerativa de defeitos ósseos críticos, mesmo em indivíduos metabolicamente saudáveis, pode-se vislumbrar a possibilidade de utilização do medicamento ranelato de estrôncio na tentativa de auxiliar na regeneração óssea. Esse fármaco, utilizado clinicamente para indivíduos portadores de osteoporose, possui modo de ação dual, pois é capaz de manter ou aumentar a formação do tecido ósseo e de diminuir a sua reabsorção. A sua ação pode ser comprovada em diversos estudos *in vitro* e *in vivo* (MARIE et al., 2001; BOIVIN; MEUNIER, 2003; AMMANN et al., 2004; REGINSTER et al., 2004; FARLAY et al., 2005; MARIE et al., 2006; ATKINS et al., 2008; REGINSTER et al., 2008; MAÏMOUN et al., 2010).

Agentes antiosteoporóticos, a maioria inibidores da reabsorção óssea, estão disponíveis para uso clínico, entretanto, ainda há uma insuficiência de drogas capazes de influenciar positivamente na correlação entre aposição e reabsorção para o aumento da massa óssea. O ranelato de estrôncio contém estrôncio estável e é a primeira droga de uma nova classe utilizada para o tratamento clínico desta patologia, pois previne a reabsorção do tecido ósseo, por aumentar a massa óssea, por meio da adsorção do estrôncio nos cristais de HA deste tecido (MARIE et al., 2001). Outros tipos de drogas, utilizadas para o tratamento da osteoporose, funcionam inibindo a ação de osteoclastos ou estimulando a proliferação dos

osteoblastos. O ranelato de estrôncio é composto por uma porção orgânica, formada pelo ácido ranélico e por dois átomos de estrôncio estável (Figura 3).

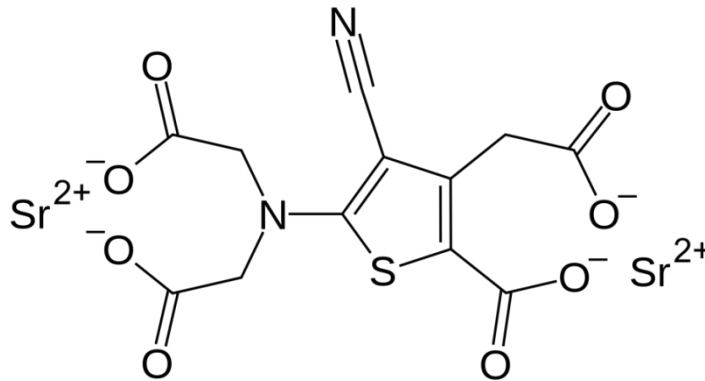


Figura 3: Fórmula estrutural plana da molécula de ranelato de estrôncio. Fórmula molecular:  $C_{12}H_6N_2O_8SSr_2$ . Peso molecular: 513,49.

O mecanismo de ação do ranelato de estrôncio não se encontra, ainda, totalmente elucidado. Especula-se que o medicamento possa agir como um agonista do receptor extracelular sensível ao cálcio, que é expresso em todas as células da linhagem osteogênica e exerce diversas ações sobre células em ensaios *in vitro* e que poderiam compor o alicerce que desencadeia os efeitos anabólicos conhecidos do cálcio em relação ao tecido ósseo. Esse medicamento, provavelmente, age de forma direta sobre os osteoclastos, por meio da inibição dos pré-osteoclastos e estímulo à apoptose dos osteoclastos, por um processo intermediado pelo receptor extracelular sensível ao cálcio e pelo aumento na ligação entre a osteoprotegerina e o RANKL (DAHL et al., 2001; BOIVIN; MEUNIER, 2003; FONSECA, 2008).

A captação do estrôncio no osso ocorre por meio de trocas iônicas com o cristal de HA, seja pela adsorção deste elemento na superfície cristalina ou pela substituição de íons cálcio por íons estrôncio. O raio iônico do estrôncio (1,13 Å) é maior do que o do cálcio (0,99 Å), conseqüentemente, os íons cálcio serão preferidos em relação aos íons estrôncio e a quantidade de substituições nos cristais de HA do tecido ósseo é relativamente baixa. Durante o tratamento com ranelato de estrôncio, a incorporação do estrôncio no cristal de HA do tecido ósseo é feita pela



troca de, aproximadamente, um íon estrôncio a cada 10 íons cálcio, o que não afeta o padrão de deposição da matriz colagênica nem o grau de mineralização do tecido ósseo, mas promove o aumento da resistência óssea (BOIVIN et al., 1996; BOIVIN; MEUNIER, 2003; AMMANN et al., 2004; REGINSTER et al., 2005; ROSCHGER et al., 2010).

Ensaio *in vitro* mostram que o ranelato de estrôncio é capaz de manter ou aumentar a formação de osso e diminuir a reabsorção desse tecido. Isso ocorre porque o medicamento é capaz de estimular a diferenciação de pré-osteoblastos e inibir a diferenciação de pré-osteoclastos e a ação de osteoclastos (FIGURA 4). O efeito resulta na maior liberação, pelos osteoblastos, de proteínas colagênicas e não-colagênicas (TURNER et al., 2002; AMMANN et al., 2004; REGINSTER et al., 2004; BRUYÈRE et al., 2007; HOLZER et al., 2009).

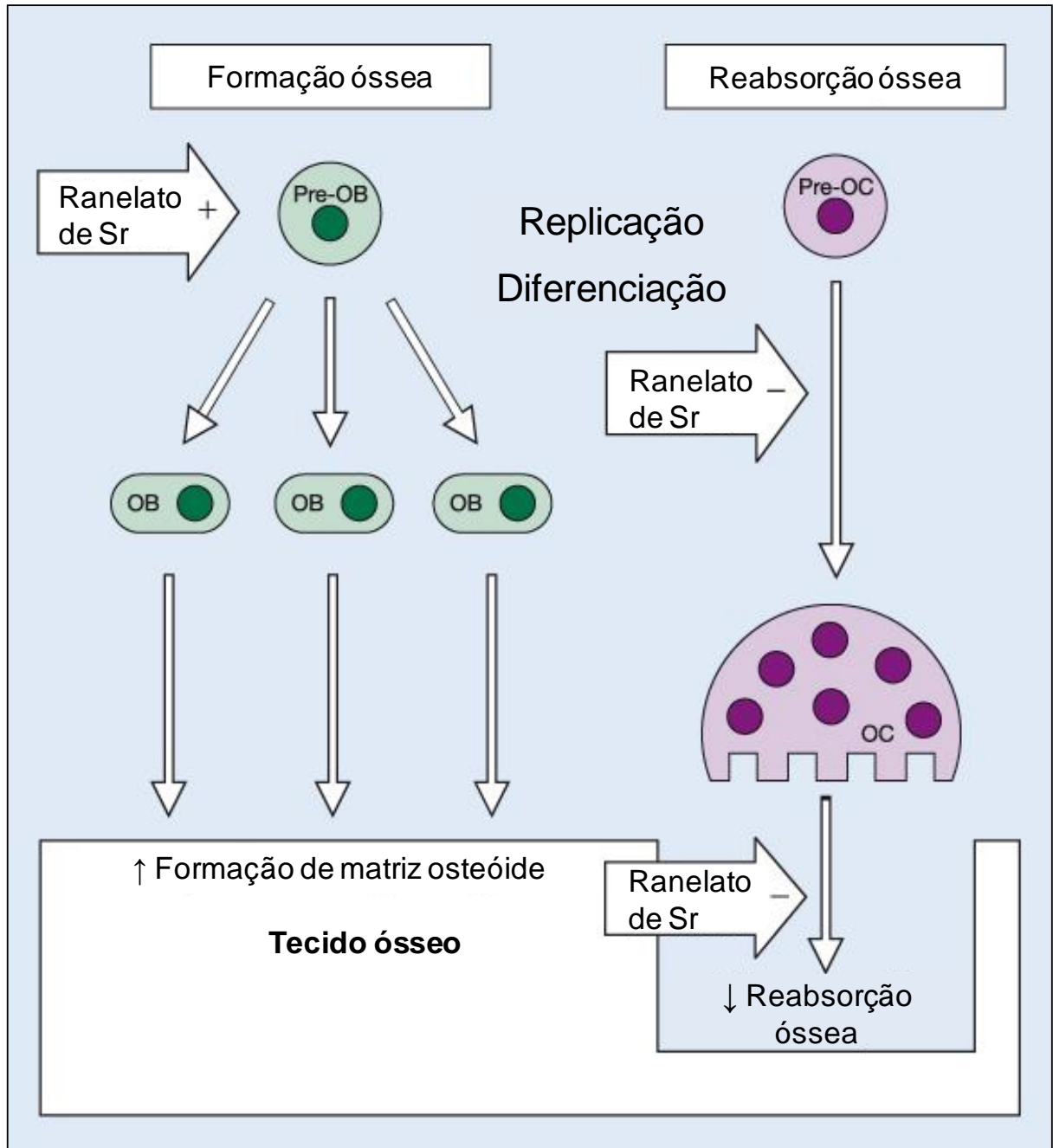


Figura 4: Modo de ação do ranelato de estrôncio: <http://www.protelos.com/>. Acesso em: 29 nov. 2011.

Os determinantes da resistência óssea são: a qualidade óssea, a microarquitetura óssea, massa óssea, remodelação óssea. (TURNER et al., 2002; AMMANN et al., 2004; BRUYÈRE et al., 2007; HOLZER et al., 2009). Ammann e colaboradores (2004) realizaram estudo em ratos intactos, que não foram

submetidos à indução de osteopenia e que receberam diferentes concentrações do medicamento ranelato de estrôncio (0, 225, 450, 625, 900 mg/ Kg/ dia) durante 2 anos. Foi observado, a partir de avaliações em vértebra, tíbia e fêmur, um incremento no volume ósseo e nas propriedades mecânicas desse tecido, e o aumento ósseo nos parâmetros avaliados esteve relacionado com a dose utilizada do medicamento. A concentração de 900 mg/kg/dia do ranelato de estrôncio aumentou de forma significativa a resistência óssea, avaliada por meio de teste de compressão de vértebra e fêmur. A resistência óssea aumentou em 20% na vértebra e em 15% no fêmur. Tal incremento nas propriedades mecânicas do osso se deve ao aumento dos parâmetros de formação óssea e diminuição dos parâmetros de reabsorção óssea, e à melhoria da microarquitetura óssea, verificado pelo aumento do volume e espessura do tecido ósseo do tipo cortical e trabecular. Houve, ainda, o aumento da atividade de fosfatase alcalina total e do IGF, marcadores bioquímicos relacionados à formação óssea.

Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de estrôncio, em culturas de osteoblastos e osteoclastos humanos, realizadas sobre biomaterial de titânio sobreposto por membranas de HA. Observou-se que o ranelato de estrôncio estimulou a proliferação e a atuação dos osteoblastos e inibiu ação dos osteoclastos (CAPUCCINI et al., 2008). A atuação do ranelato de estrôncio em relação à osteointegração de implante de titânio foi avaliada pela primeira vez por Maïmoun e colaboradores (2010) em experimento realizado em tíbia de rato. Esses autores demonstraram que o ranelato de estrôncio na concentração de 625 mg/ Kg/ dia foi capaz de aumentar o volume do osso trabecular, bem como a sua espessura e densidade ao redor do implante, o que destaca o importante papel desempenhado pela microarquitetura óssea no processo de osteointegração.

Em ensaios clínicos realizados com grupos de mulheres portadoras de osteoporose, após um ano de tratamento com a droga ranelato de estrôncio, foi observada redução do número de fraturas de vértebras em 59% e de colo de fêmur em 41% dos casos; e, após três anos de tratamento, a redução foi de 32% para fraturas de vértebras e 31% para fraturas de colo do fêmur (MEUNIER et al., 2004).

Portanto, torna-se promissor investigar o potencial osteogênico da associação da atuação local de biomateriais com o efeito metabólico do ranelato de estrôncio na regeneração de defeitos ósseos críticos.

***Objetivos***

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial osteogênico do ranelato de estrôncio, associado a biomateriais, para regeneração em defeito ósseo crítico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Analisar histomorfometricamente por microscopia óptica:

- A eficácia do ranelato de estrôncio para a regeneração óssea;
- O potencial osteogênico de microesferas de hidroxiapatita, utilizadas como arcabouço em defeito crítico em calvária de rato;
- A eficácia de selante de fibrina como agente aglutinante de microesferas de hidroxiapatita, por microscopia óptica;

B) Analisar a estrutura do osso formado após tratamento com ranelato de estrôncio por microscopia eletrônica de transmissão;

C) Identificar o elemento estrôncio na estrutura do osso após tratamento com ranelato de estrôncio, por meio de espectrometria de energia dispersiva de raios-X realizada a partir de imagens por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão.

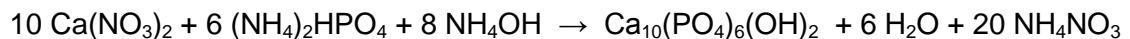
## ***Materiais e Métodos***

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 BIOMATERIAIS

#### 4.1.1 Microesferas de HA

As microesferas de HA utilizadas neste estudo foram desenvolvidas, produzidas, caracterizadas e cedidas pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). A HA estequiométrica foi sintetizada pelo método de precipitação por via úmida com razão teórica dos íons  $[Ca]^{+2}/ [PO_4]^{-3} = 1,67$ , em condições reacionais apropriadas à formação de um material com uma única fase cristalina. A reação é ilustrada abaixo:



De acordo com a reação acima, a síntese da HA foi realizada a partir da adição de uma solução contendo íons fosfato (Solução B) a uma solução contendo íons cálcio (Solução A) em condições reacionais propícias à formação do precipitado.

A solução de nitrato de cálcio a 0,2M (solução A) foi colocada dentro de um balão volumétrico, onde foi realizada a reação de precipitação, sob agitação à temperatura de 90° C, sendo então adicionada com uma vazão de 30 mL/ min. à solução de fosfato dibásico de amônio (solução B) com auxílio de uma bomba peristáltica, durante duas horas. A mistura permaneceu sob agitação, à mesma temperatura, por mais duas horas para a maturação do precipitado cristalino formado, sendo, em seguida, filtrada em funil de *Büchner* e, posteriormente, lavada por ressuspensão com água Milli-Q a 90° C até a obtenção do pH 7,0 na água de lavagem. A mistura obtida foi seca em estufa a 80° C por 24 h para a obtenção do pó de HA nanoestruturado.

As microesferas foram preparadas a partir de pó de HA que continha, após separação granulométrica, partículas com diâmetro menor ou igual a 210  $\mu\text{m}$ . Este pó foi misturado a uma solução de alginato de sódio a 1%, na proporção de 15:1, sob leve agitação, para a formação de uma pasta cerâmica. Para que houvesse a formação das microesferas de HA, a pasta cerâmica foi extrudada com o auxílio de uma seringa em uma solução de cloreto de cálcio 0,15 M. Após 24 h nesta solução, as microesferas de HA foram lavadas com água Milli-Q, secas em estufa a 70° C, colocadas em forno mufla durante 27 h em rampa crescente de aquecimento (17 h até atingir 550° C, 550° C por 2 h, 6 h até atingir 1100° C e 1100° C por 2 h). A temperatura de 1100° C corresponde ao processo de sinterização. Em seguida, microesferas de HA já na temperatura ambiente, passaram por uma seleção de 250 a 425  $\mu\text{m}$  utilizando-se uma peneira apropriada.

Os gráficos 1 e 2 ilustram, respectivamente, as caracterizações realizadas nas microesferas de HA, por meio de difração de raios-X (DRX) e espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A DRX analisa a quantidade de fases presentes (simples ou múltiplas), a pureza, o grau de cristalinidade e o tamanho do cristal que compõe o biomaterial, enquanto que o FTIR possibilita a caracterização do biomaterial, por meio da identificação de grupos funcionais, pela comparação do modo vibracional com um modelo de material padrão. As figuras 5, 6 e 7 são fotomicrografias a partir de imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das microesferas de HA e a figura 8 representa fotomicrografia realizada a partir de análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das microesferas de HA.



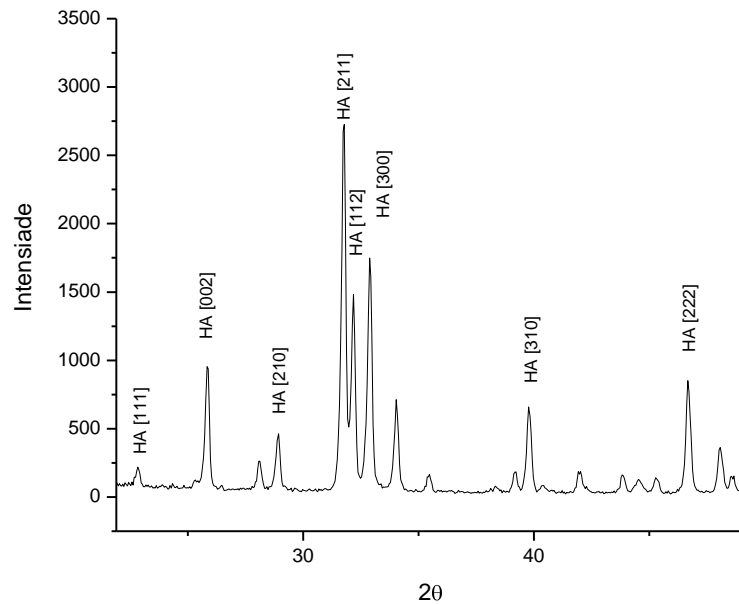


Gráfico 1: DRX das microsferas de HA. O difratograma mostra os principais picos de uma HA  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  padrão, de acordo com a ficha padrão PCPDFWIN 09.0432. É possível observar pelo eixo y que a amostra tem picos estreitos e de alta intensidade, característico de amostra com alta cristalinidade.

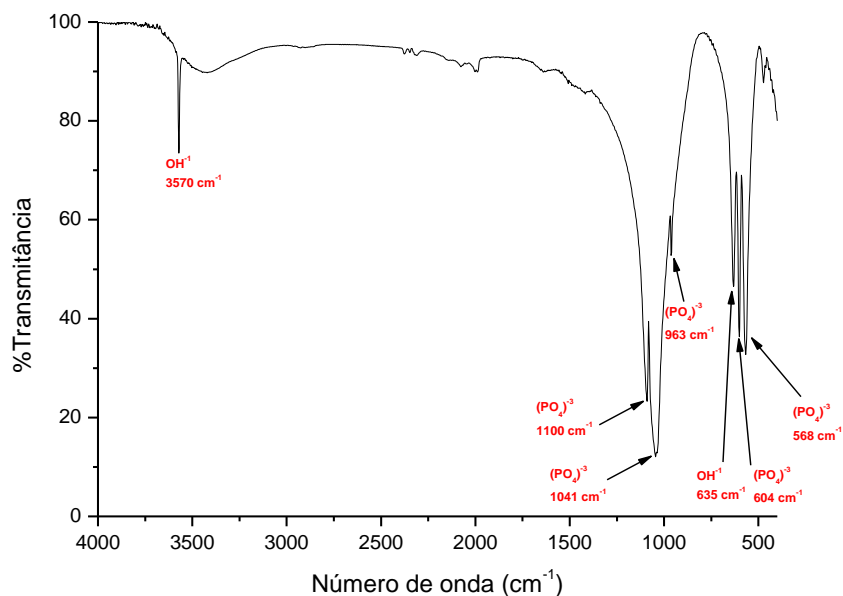
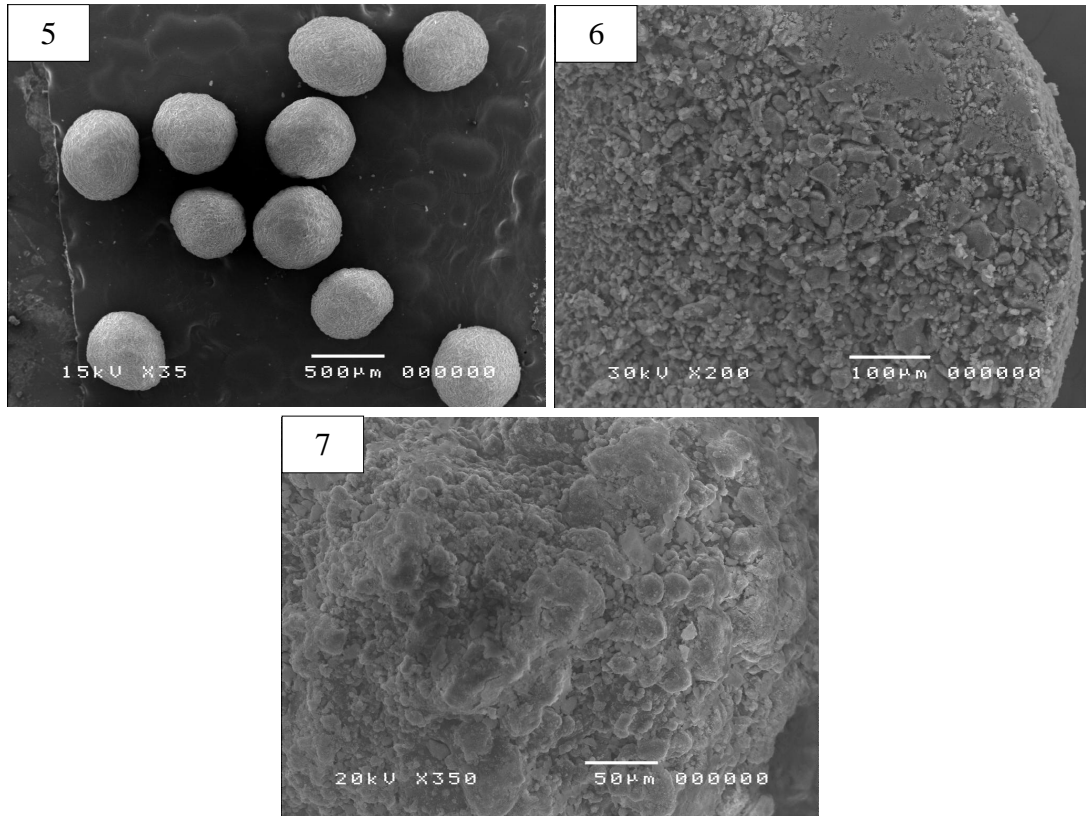


Gráfico 2: O gráfico acima indica os grupos funcionais de uma HA  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  padrão, com as bandas de vibração apontadas. A largura das bandas indica que a HA, após a sinterização, não perdeu nenhuma de suas características elementares. Este material é constituído pelas bandas de  $\text{OH}^-$  em 3574  $\text{cm}^{-1}$  e 630  $\text{cm}^{-1}$  e as bandas de fosfato nas regiões de 1000  $\text{cm}^{-1}$  a 1100  $\text{cm}^{-1}$  e 500  $\text{cm}^{-1}$  a 600  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.



Figuras 5, 6, 7: MEV das microesferas de HA, que mostram a morfologia e textura superficial do biomaterial em diferentes aumentos.

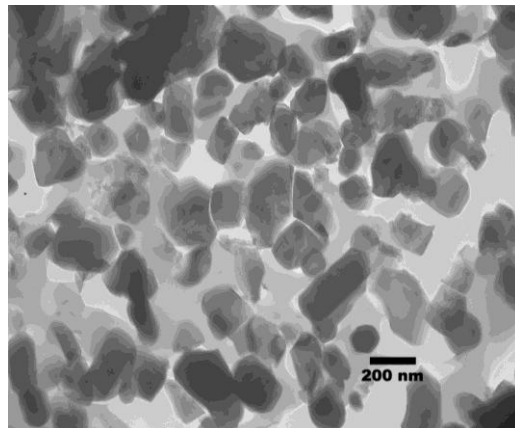


Figura 8: Imagem por MET que mostra a disposição dos cristais de HA após tratamento térmico (ROSSI et al., 2011).

As microesferas de HA foram acondicionadas em microtubos milimetrados autoclaváveis do tipo *ependorf* com aproximadamente 0,5 g em cada e esterilizadas em autoclave a 120° C por 30 minutos.

#### 4.1.2 Selante de Fibrina

Foi utilizado selante de fibrina (Tissucol<sup>®</sup>-Baxter), adquirido comercialmente. Este selante é composto por um kit, com cinco frascos, de acordo com a figura 9, contendo:

1. Solução de cloreto de cálcio para diluição da trombina;
2. Trombina liofilizada de origem humana para obtenção de solução a 4,0 UI/mL;
3. Trombina liofilizada de origem humana para obtenção de solução a 500 UI/mL;
4. Fibrinogênio plasmático liofilizado de origem humana;
5. Solução de aprotinina de origem bovina para diluição do fibrinogênio.



Figura 9: Componentes do selante de fibrina (Tissucol<sup>®</sup>- Baxter).

As embalagens contêm, além dos cinco frascos descritos, seringas e agulhas para reconstituição do produto e um dispositivo para aplicação, o Duploject<sup>®</sup>. O fibrinogênio plasmático liofilizado é reconstituído com a solução de aprotinina, formando a solução I. A trombina liofilizada é reconstituída com a solução de cloreto de cálcio, formando a solução II (TABELA 1). A trombina de 500 UI/mL é utilizada quando se deseja uma solidificação rápida (menor que 20 segundos), enquanto que a trombina de 4,0 UI/ mL é utilizada quando se deseja uma solidificação mais lenta

(entre 40 e 60 segundos). Neste experimento, optou-se pela utilização da trombina de 4,0 UI/ mL. As soluções I e II devem ser aplicadas simultaneamente, sempre em quantidades iguais, utilizando-se o Duploject<sup>®</sup> (Figura 10). O Duploject<sup>®</sup> é um dispositivo que permite a adaptação de duas seringas com uma única agulha de saída, para garantir a aplicação homogênea das soluções I e II. Após a inserção dos componentes nas seringas do Duploject<sup>®</sup>, este foi mantido a 37 °C, em banho-maria, com o objetivo de evitar a solidificação precoce do selante de fibrina.

Tabela 1: Componentes do selante de fibrina.

Componentes	Solução
Fibrinogênio Plasmático	Solução I
Aprotinina	
Trombina 4,0 UI/mL ou Trombina 500 UI/mL	Solução II
Cloreto de Cálcio	



Figura 10: Duploject<sup>®</sup> para homogeneização e aplicação dos componentes do Tissucol<sup>®</sup>.

#### 4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Este experimento em animais seguiu as normas de conduta de experimentação animal da Universidade Estadual de Feira de Santana (Uefs), após

aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta instituição (protocolo n°. 003/2009, ofício em anexo).

Foram utilizados 64 *Rattus norvegicus* da linhagem wistar, albinos, machos, adultos, com peso aproximado entre 350 e 400 g, com idade correspondente entre três e quatro meses. Estes animais foram fornecidos, criados e mantidos pelo biotério da Uefs e, durante todo o experimento, receberam água *ad libitum*, ração sólida Labina (Purina) (Tabela 2) e foram mantidos em espaço climatizado com fotoperíodo de 12-12 h, luz-escuro.

Tabela 2: Composição nutricional da ração Labina® (Purina) utilizada para alimentar os ratos

<b>Ração</b>	
<b>Composição Nutricional</b>	<b>Quantidade por Kg de Ração</b>
Umidade (máx.)	13%
Proteína Bruta (mín.)	23%
Extrato Etéreo (mín.)	4,0%
Matéria Fibrosa (máx.)	5,0%
Matéria Mineral (máx.)	10%
Cálcio (máx.)	1,3%
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 B6	11 mg
Sódio	2,8 g
Niacina	220 mg
Tiamina	11 mg
Ácido Pantotênico	90 mg
Colina	2800 mg
Biotina	0,16 mg
Ácido Fólico	13 mg
Magnésio	1,7 mg
Manganês	110 mg
Iodo	1,0 mg
Selênio	0,2 mg
Cobalto	2,0 mg
Ferro	180 mg
Zinco	110 mg
Cobre	30 mg

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para compor quatro grupos experimentais, avaliados nos pontos biológicos de 15, 45 e 120 dias:

- Grupo Controle com administração do Ranelato de Estrôncio (GCRS): defeito ósseo crítico realizado em calvária de rato sem implantação de biomaterial, apenas com a presença do coágulo sanguíneo;
- Grupo Hidroxiapatita com administração do Ranelato de Estrôncio (GHARS): defeito ósseo crítico realizado em calvária de rato com implantação de microesferas de HA;
- Grupo Fibrina com administração do Ranelato de Estrôncio (GFRS): defeito ósseo crítico realizado em calvária de rato com implantação de fibrina;
- Grupo Hidroxiapatita Associado à Fibrina com administração do Ranelato de Estrôncio (GHAFRS): defeito ósseo crítico realizado em calvária de rato com implantação de HA e fibrina;

Dentre os 64 animais empregados no experimento, cinco deles foram utilizados em cada grupo nos pontos biológicos de 15 e 45 dias. O ponto biológico de 120 dias possuiu 6 animais por grupo (Tabela 3). Cada animal excedente deste ponto biológico foi destinado para processamento por microscopia eletrônica. A figura 11 mostra desenho esquemático do defeito ósseo crítico confeccionado.

Tabela 3: Distribuição de animais de acordo com o grupo e ponto biológico

Período (dias) \ Grupo	15	45	120
GCRS	05	05	06
GHARS	05	05	06
GFRS	05	05	06
GHAFRS	05	05	06

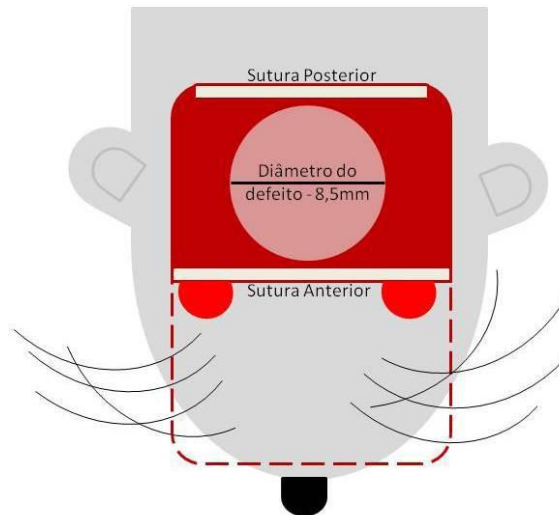


Figura 11: Desenho esquemático que mostra a localização do defeito crítico confeccionado entre as suturas anterior e posterior da calvária do animal.

Na manhã seguinte ao dia da cirurgia até o dia da eutanásia, todos os animais receberam dieta pastosa contendo 900 mg/kg por dia de ranelato de estrôncio (Protos<sup>®</sup>), correspondente a 337,5 mg deste medicamento (Figura 12) e a 3,51 mmol Sr/kg por dia, de acordo com o protocolo adaptado de Ammann e colaboradores (2004). A ração sólida foi triturada e adicionada, aproximadamente, 8,0 g em recipientes apropriados, juntamente com o ranelato de estrôncio e 5,0 mL de água. Antes de receber a dieta pastosa, os animais dispunham apenas de água *ad libidum* para consumo. Após a ingestão de toda a dieta pastosa (Figura 13), com duração aproximada de 1 hora, os animais tinham acesso à ração sólida *ad libidum*.



Figuras 12 e 13: As figuras mostram a caixa do fármaco utilizado, juntamente com um microtubo milimetrado do tipo *ependorf* que contém o ranelato de estrôncio no

seu interior (Figura 12) e um recipiente com a dieta pastosa, contendo ração triturada, água e o fármaco (Figura 13).

É válido ressaltar que o nosso grupo de estudo realizou, concomitantemente a este experimento, cirurgias em outros 64 animais que possuíam características similares àqueles citados anteriormente (Tabela 4), porém não receberam o medicamento ranelato de estrôncio, o que gerou uma dissertação de mestrado (CARVALHO, 2010), e esta amostra serviu como grupo controle negativo da presente tese de doutoramento e será citada novamente na discussão. Portanto, estes grupos estão descritos abaixo:

- Grupo Controle (GC): defeito ósseo crítico realizado em calvária de rato sem implantação de biomaterial, apenas com a presença do coágulo sanguíneo;
- Grupo Hidroxiapatita (GHA): defeito ósseo crítico realizado em calvária de rato com implantação de microesferas de HA;
- Grupo Fibrina (GF): defeito ósseo crítico realizado em calvária de rato com implantação de fibrina;
- Grupo Hidroxiapatita Associado à Fibrina (GHAF): defeito ósseo crítico realizado em calvária de rato com implantação de HA e fibrina;

Tabela 4: Distribuição de animais de acordo com o grupo e ponto biológico

Período (dias) \ Grupo	15	45	120
GC	05	05	06
GHA	05	05	06
GF	05	05	06
GHAF	05	05	06

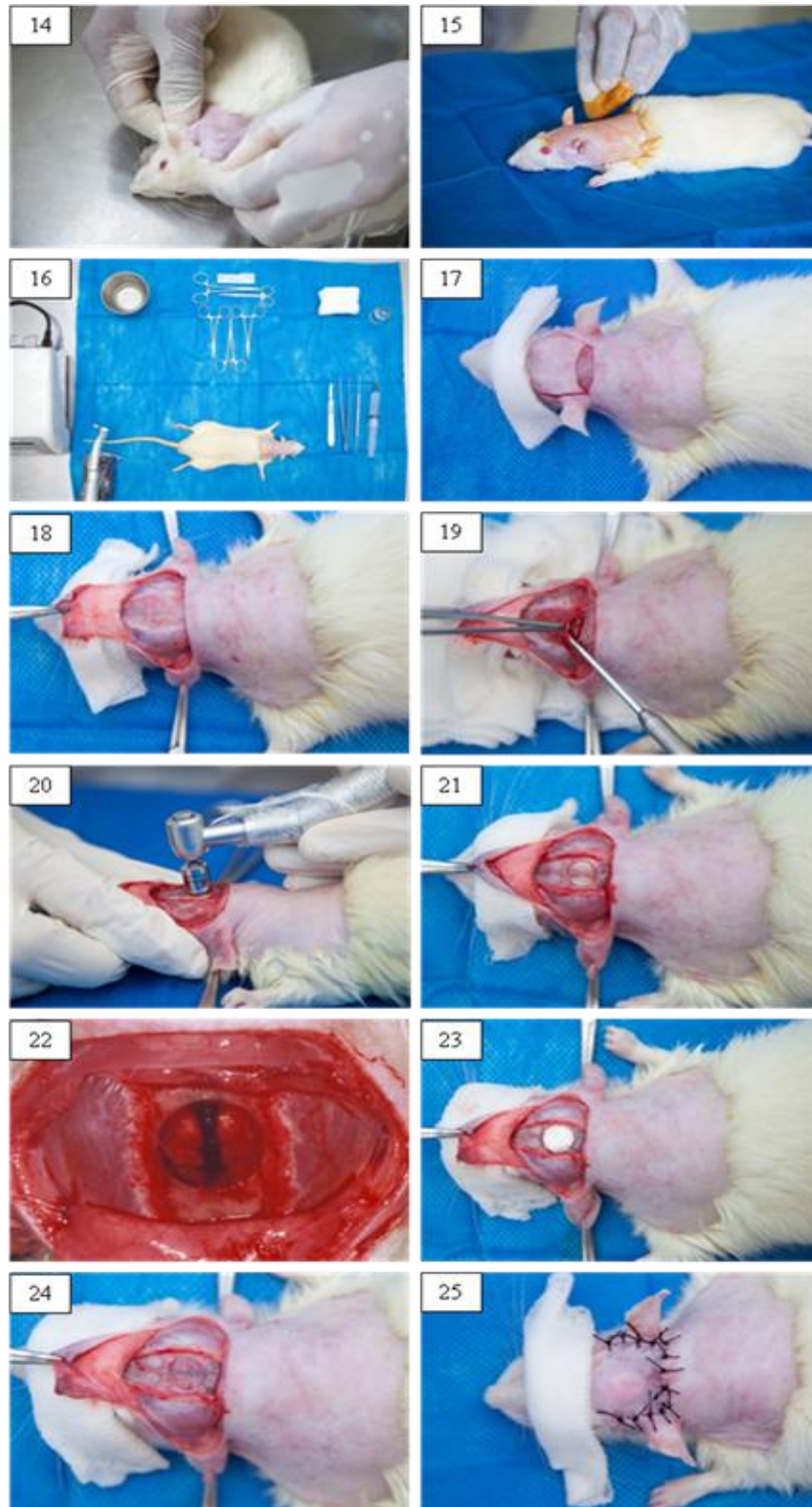
Fonte: CARVALHO, 2010.



### 4.3 TÉCNICA CIRÚRGICA

A técnica cirúrgica empregada foi a mesma utilizada por diversos autores (TAKAGI; URIST, 1982; CARDOSO et al., 2006; MIGUEL et al., 2006; CONZ et al., 2010; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2011). Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de quetamina a 10% (Cetamin<sup>®</sup> – Laboratório Syntec – Brasil) na proporção de 0,12 mL/100 g de massa corpórea e analgesia e sedação com injeção intramuscular de cloridrato de xilazina (Dopaser<sup>®</sup> – Laboratório Hertape Calier – Espanha) na proporção de 0,06 mL/ 100 g de massa corpórea. Posteriormente, os animais foram submetidos à tricotomia na região da calvária (Figura 14), seguida de antissepsia com álcool iodado (Figura 15) e foram posicionados em decúbito ventral para acesso à calvária (Figura 16).

O procedimento cirúrgico iniciou-se com uma incisão cutânea bicoronal, com lâmina de bisturi n<sup>o</sup> 15 (Bencton Dickinson<sup>®</sup>), com aproximadamente 3,0 cm de extensão (Figura 17), seguida de incisão do perióstio e com um periótomo de Molt (SS White<sup>®</sup>); removeu-se o perióstio para exposição da cortical óssea (FIGURAS 18 e 19). O defeito ósseo crítico foi realizado por meio da utilização de uma fresa trefina de 8,5 mm de diâmetro externo (Dentoflex<sup>®</sup> – Brasil) acoplada a um contra-ângulo (Dabi Atlante<sup>®</sup> – Brasil) com redução 16:1, acoplado a um motor cirúrgico (Driller<sup>®</sup> BLM 600 Plus – Brasil) de 1500 rotações por minuto (rpm), sob irrigação abundante e constante com soro fisiológico. A confecção do defeito ósseo circular transfixado de aproximadamente 8,5 mm de diâmetro, foi realizada na porção mediana da calvária, entre os vértices das suturas anterior e posterior, com remoção da díploe (Figura 20, 21, 22). A depender do grupo experimental, houve o preenchimento do defeito apenas pelo coágulo sanguíneo ou implantação da HA e/ou do selante de fibrina (Figura 23 e 24). Por fim, foram realizadas suturas com pontos separados (simples), utilizando-se fio de seda 4,0 (Ethicon – Johnson & Johnson<sup>®</sup> – Brasil) (FIGURA 25).



Figuras 14 a 25: Estas figuras ilustram as etapas da técnica cirúrgica. Foi realizada tricotomia (Figura 14), antissepsia (Figura 15), posicionamento do animal em decúbito ventral sobre o campo cirúrgico (Figura 16), incisão cutânea bicoronal (Figura 17), exposição e elevação do periósteo (Figura 18 e 19), confecção do defeito (Figura 20 e 21), defeito ósseo confeccionado (Figura 22), implantação de microesferas de HA (Figura 23), implantação do selante de fibrina (Figura 24) e sutura (Figura 25).

#### 4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Decorridos 15, 45 e 120 dias de pós-operatório, não houve intercorrências que levaram à perda inesperada dos animais, e estes foram eutanasiados no período estipulado, com injeção letal de cloridrato de quetamina via peritoneal. Em seguida, removeu-se a porção superior da calvária, descartando-se todo o tecido mole, com exceção da dura-máter e periósteeo.

#### 4.5 ETAPA LABORATORIAL PARA ANÁLISE POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Os espécimes foram fixados em formol a 4% por 48 horas e reduzidos com disco de carborundum n° 409, acoplado a um mandril e a uma micro retífica (Dremel®). Os espécimes foram divididos em duas partes. Uma das partes continha aproximadamente dois terços do defeito ósseo crítico, que incluiu a região anterior da calvária (Figura 26, 27 e 28).



Figuras 26 a 28: Estas figuras ilustram a região da calvária, antes (Figura 26) e após (Figura 27 e 28) a sua redução para inclusão em parafina.

Esta parte da amostra foi descalcificada com solução de EDTA a 7%, pH 7,0, durante 05 dias. No Instituto de Patologia Geral e Cutânea (Ipac), Salvador, Bahia, procedeu-se o processamento destes espécimes em um processador automático de tecido (LEICA® – Alemanha), utilizando-se a sequência de álcool absoluto (concentrações crescentes), xilol e parafina. Subsequentemente, foi realizada a inclusão das amostras em blocos de parafina.

Os cortes histológicos (Figura 29) foram realizados com 5,0  $\mu\text{m}$  de espessura e dispensados sobre lâminas previamente lavadas, de forma sequencial, com detergente neutro, água destilada, ácido clorídrico diluído, ácido acético e álcool etílico, para remoção de impurezas e favorecimento da aderência dos cortes, que foram corados com hematoxilina e eosina (HE), picrossírius *red* (PIFG) e tricrômico de Massom-Goldner (TMG). A análise das lâminas foi realizada no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) com o microscópio Leica DM 1000 e câmera fotográfica Leica DFC 310 FX.

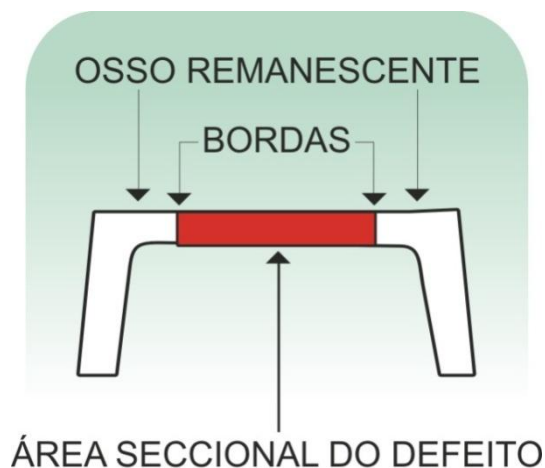


Figura 29: Desenho esquemático da área seccional do defeito na disposição em que os cortes histológicos foram realizados.

#### 4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para a avaliação morfométrica, foi utilizado o programa Leica QWin<sup>®</sup>. Os seguintes parâmetros foram mensurados nos defeitos ósseos críticos:

- A) Extensão linear do defeito em  $\mu\text{m}$  (Figura 30B)
- B) Área total do defeito em  $\mu\text{m}^2$  (Figura 30C)
- C) Área de matriz osteóide neoformada em  $\mu\text{m}^2$  (Figura 30D)

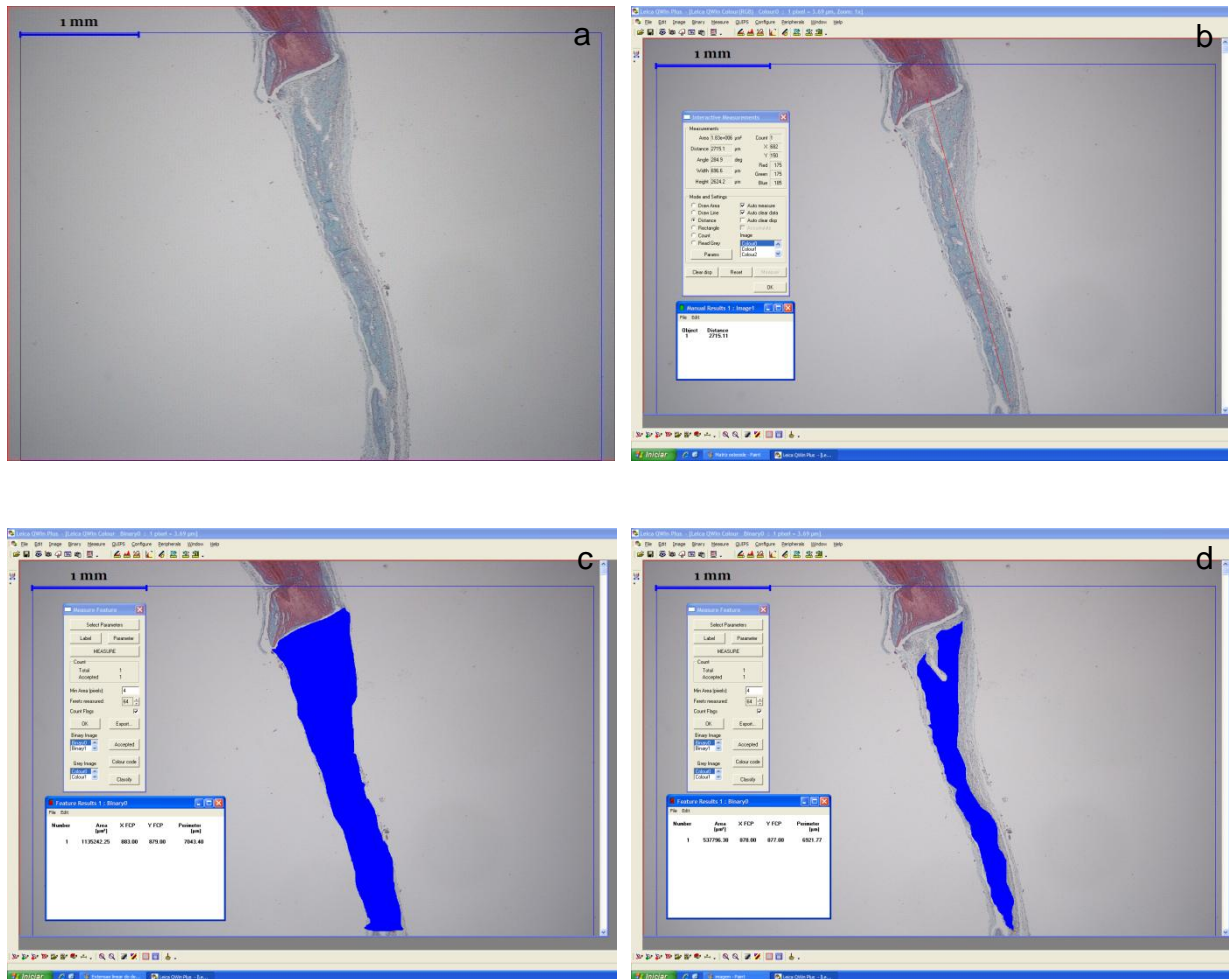


Figura 30: Exemplos das avaliações morfométricas de uma fotomicrografia (a); Mensuração da extensão linear do defeito (b); Mensuração da área total do defeito (c); Mensuração da matriz osteóide neoformada (d).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após um estudo de suposições e da adoção de medidas saneadoras necessárias, os dados referentes às amostras destinadas à microscopia óptica foram submetidos à análise de variância com modelo apropriado para experimentos inteiramente casualizados com dois fatores e interação (fatorial 8 x 3) e ao teste de Tukey no caso dos efeitos significativos. Foi adotado o nível de significância de 5% em todos os testes estatísticos e os cálculos foram efetuados por meio do sistema

SAS (SAS Institute Inc. The SAS System, release 9.2. SAS Institute Inc., Cary: NC, 2008).

#### 4.8 ETAPA LABORATORIAL PARA ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Um animal de cada grupo experimental, correspondente ao ponto biológico de 120 dias, foi destinado à análise por microscopia eletrônica. Foi escolhido o ponto biológico mais tardio para a realização desta análise qualitativa, pois, neste ponto, o osso encontra-se maduro. Estas amostras foram processadas histologicamente na Plataforma de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM-Fiocruz-BA).

A região da calvária foi fixada em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2-7.4) por 48h. Depois de fixadas, as amostras foram divididas em quatro partes de tamanhos equivalentes, lavadas em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, e duas partes de cada amostra foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, juntamente com tampão cacodilato de sódio 0,2 M por 45 minutos, no escuro, e à temperatura ambiente. Após esta fase, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, desidratadas em concentrações crescentes de acetona: 50%, 70%, 90%, 100% (duas vezes) e absoluta. Posteriormente, as amostras foram infiltradas em concentrações crescentes de resina epóxi Polybed (Polyciences) e, posteriormente, infiltradas apenas na resina. Por fim, as amostras foram emblocadas nesta mesma resina e permaneceram em estufa a 37° C durante 72 h para sua polimerização.

##### **4.8.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS)**

A presença de estrôncio na calvária, tanto na região correspondente ao defeito ósseo quanto na região de borda óssea, foi avaliada, por meio de análise por EDS, de cortes de aproximadamente 1,0 mm de espessura que não foram pós-

fixados com ósmio, no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6460-LV, equipado com detector de EDS Thermo/Noran System Six-200 do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Ciências dos Materiais e Metalurgia do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (Coppe) da UFRJ. O microscópio eletrônico de varredura foi operado em modo de baixo vácuo, a 20 pa, e com voltagem de aceleração de 30 kV. Essa voltagem foi utilizada com a finalidade de facilitar a identificação do Sr, cuja energia de  $K_{\alpha}$  é da ordem de 14 keV, e também para aumentar a aquisição, uma vez que alguns picos da camada K de elementos leves podem coincidir ou estarem próximos de outros picos das camadas L ou M de elementos mais pesados, como é o caso P e do Sr, cuja energia de  $K_{\alpha}(P)$  e  $L_{\alpha}(Sr)$  são 2,014 keV e 1,807 keV respectivamente.

As imagens do microscópio eletrônico de varredura para EDS foram geradas por detecção de elétrons retroespalhados. Os espectros de EDS da região da calvária dos grupos GC e GCRS foram realizados com o objetivo de identificar os elementos químicos presentes nas amostras. Os parâmetros de aquisição foram 480 segundos ou 15000 contagens.

#### **4.8.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de Alta Resolução**

Cortes ultrafinos do material, de cerca de 60 nm, foram obtidos em ultramicrotomo e coletados com grades de cobre. A contrastação final do material foi realizada utilizando-se acetato de uranila a 5% por 20 minutos, e citrato de chumbo por 5 minutos.

As observações e micrografias foram realizadas no Instituto Nacional de Metrologia e Normalização, em Duque de Caxias (Rio de Janeiro), com o uso do microscópio eletrônico de transmissão FEI FEG-Titan TM 80-300 S-TWIN. A operação do microscópio na modalidade de transmissão em alta resolução em 300 kV permitiu obter resolução ponto a ponto de 2 Å. Portanto, obtiveram-se imagens de alta resolução de cristais do mineral do tecido ósseo, mostrando vários planos de arranjo atômico, cuja distância entre eles se encontra na faixa de 2 Å ou um pouco menor. Todas as micrografias foram realizadas com uso de uma câmera CCD (Gatan UltraScan<sup>®</sup> 1000 P para 300 kV, 4 megapixel – 2k x 2k) conectada ao

microscópio. Através do detector para microanálise de raios-X (EDAX METEK modelo TOPS 30 OST<sup>®</sup>) acoplado ao microscópio, efetuou-se a análise do elemento estrôncio do referido material, o que resultou em espectros de EDS.



***Resultados***

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE DESCRITIVA POR MICROSCOPIA ÓPTICA

#### 5.1.1 Grupo Controle com Administração de Ranelato de Estrôncio (GCRS)

Nos pontos biológicos de 15, 45 e 120 dias, na região das bordas ósseas do defeito, foi observada neoformação reparativa de matriz osteóide (Figuras 31a, 32a, 34a, 37a). Nas outras regiões do defeito, houve também neoformação de matriz osteóide, adjacente à dura-máter, em direção centrípeta, em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea remanescente. A ocupação linear centrípeta de matriz osteóide neoformada, advinda das bordas, aos 15 dias, abrangeu, aproximadamente, dois terços do defeito (Figura 31a). Já aos 120 dias, esta matriz encontrava-se mais estável, em fase avançada de maturação (Figura 38b, 39a, 39b). Neste ponto biológico, a matriz osteóide ocupou quase toda a extensão do defeito, exceto na região central, onde se observou uma delgada camada de tecido conjuntivo fibroso ocupando aproximadamente um quinto do defeito, provavelmente correspondente à região da sutura interparietal (Figura 37a, 38b). Associados a esta matriz osteóide, em todos os pontos biológicos, foram observados diversos osteócitos e osteoblastos muito exuberantes e ativos, aos 15 dias (Figura 33a e 33b), com redução progressiva da sua atividade aos 45 e 120 dias (Figura 35a e 35b).

Aos 15 dias, o tecido conjuntivo fibroso apresentou-se, em sua maioria, bem orientado, com formação mais organizada de fibras colágenas a partir da região adjacente à dura-máter, permeado por fibroblastos desorganizados e com aspecto reativo. Pequenos septos fibrosos se formaram ao longo do defeito (Figura 33a). Foi observado edema em regiões mais próximas ao tegumento, o que conferiu, nesses sítios, aspecto de tecido conjuntivo fibroso mais frouxo, com ocupação das fibras colágenas de maneira mais espaçada e menos organizada (Figura 32b e 33a). Já aos 45 e 120 dias, observou-se tecido conjuntivo denso mais organizado, com suas fibras colágenas orientadas paralelamente em relação ao longo eixo do defeito

ósseo (Figura 35a e 36b). Essa característica foi mais evidente no ponto biológico mais tardio. Nos pontos biológicos de 45 e 120 dias, os fibroblastos apresentaram orientação paralela e padrão fusiforme (Figura 35a).

Aos 15 dias, houve neoformação vascular discreta, evidenciada pelo fato de terem sido observadas células endoteliais com núcleos globosos projetados para a luz vascular (Figura 33b) e, nos pontos biológicos de 45 e 120 dias, este tipo celular encontrava-se com aspecto nuclear fusiforme, o que indica quiescência. Observou-se discreto infiltrado inflamatório mononuclear difuso, com redução progressiva ao longo do tempo (Figuras 32b e 36b).

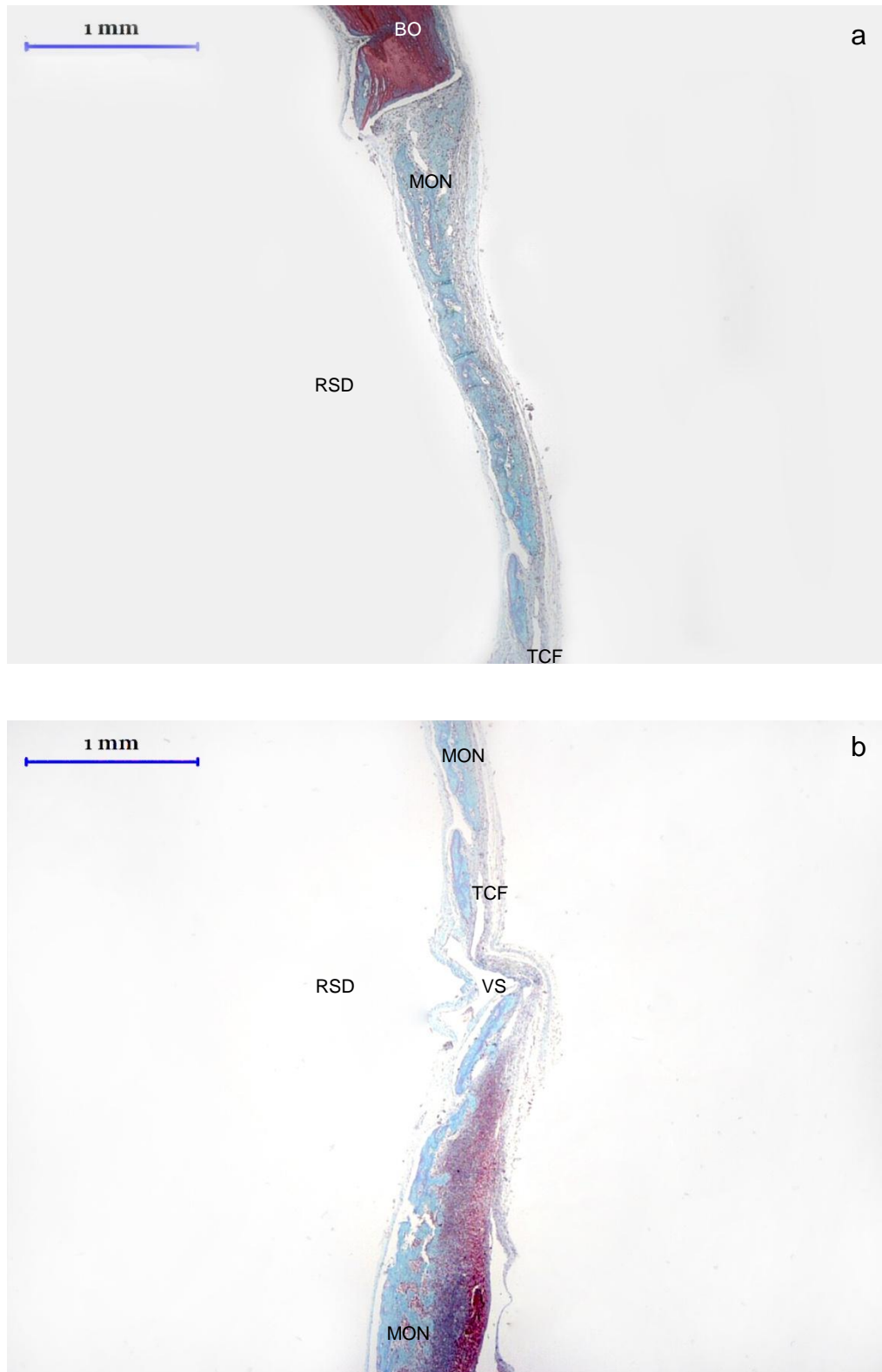


Figura 31: GCRS 15 dias – (a) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próxima à borda óssea, principalmente nas proximidades da região supradural (RSD). (b) região central do defeito com ocupação linear de matriz osteóide neoformada (MON) e ocupação linear de tecido conjuntivo fibroso (TCF) abrangendo um terço do defeito. Vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito. Coloração por tricrômico de Masson Goldner (TMG).

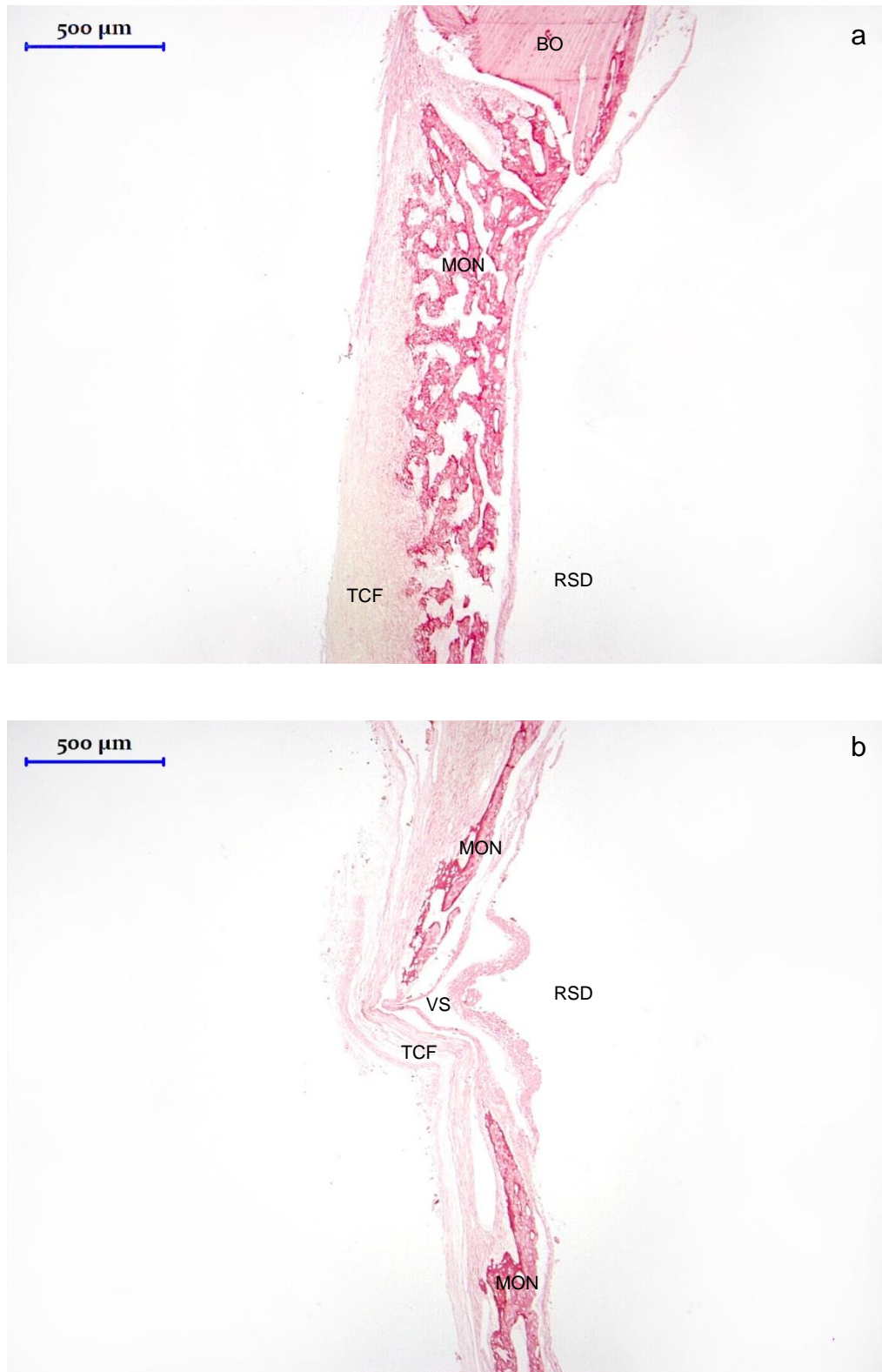


Figura 32: GCRS 15 dias – (a) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próxima à borda óssea, principalmente nas proximidades da região supradural (RSD). A figura 32 (b) mostra região central do defeito com ocupação linear de matriz osteóide neoformada (MON) e ocupação linear de tecido conjuntivo fibroso (TCF) abrangendo um terço do defeito. Vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito. Coloração por picrossírius *red* (PIFG).



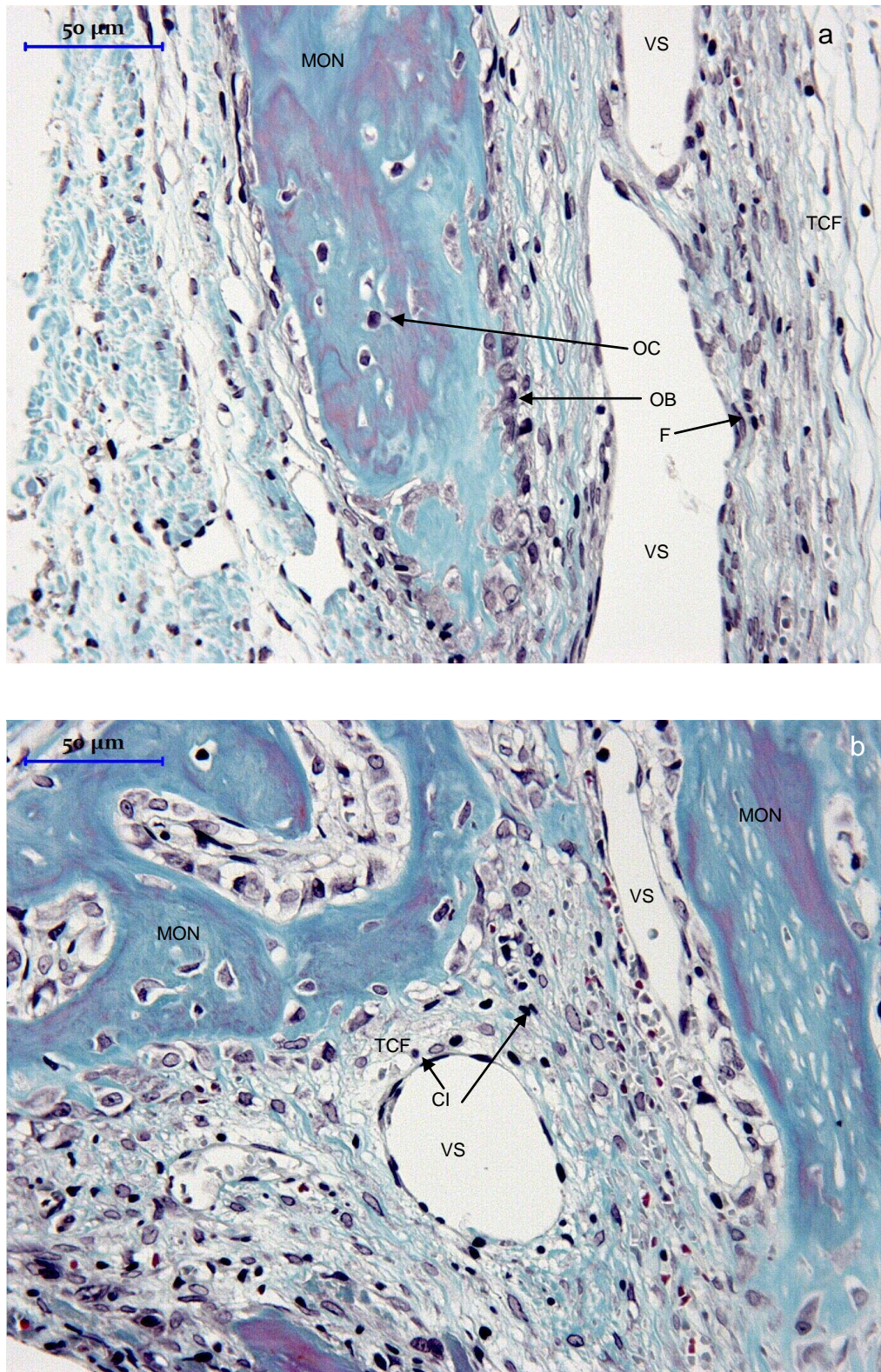


Figura 33: GCRS 15 dias – (a) e (b) – matriz osteóide neoformada (MON), associada a osteoblastos (OB) e osteócitos (OC). No tecido conjuntivo fibroso (TCF) observam-se vasos sanguíneos (VS), células inflamatórias (CI) e fibroblastos (F) - (TMG).



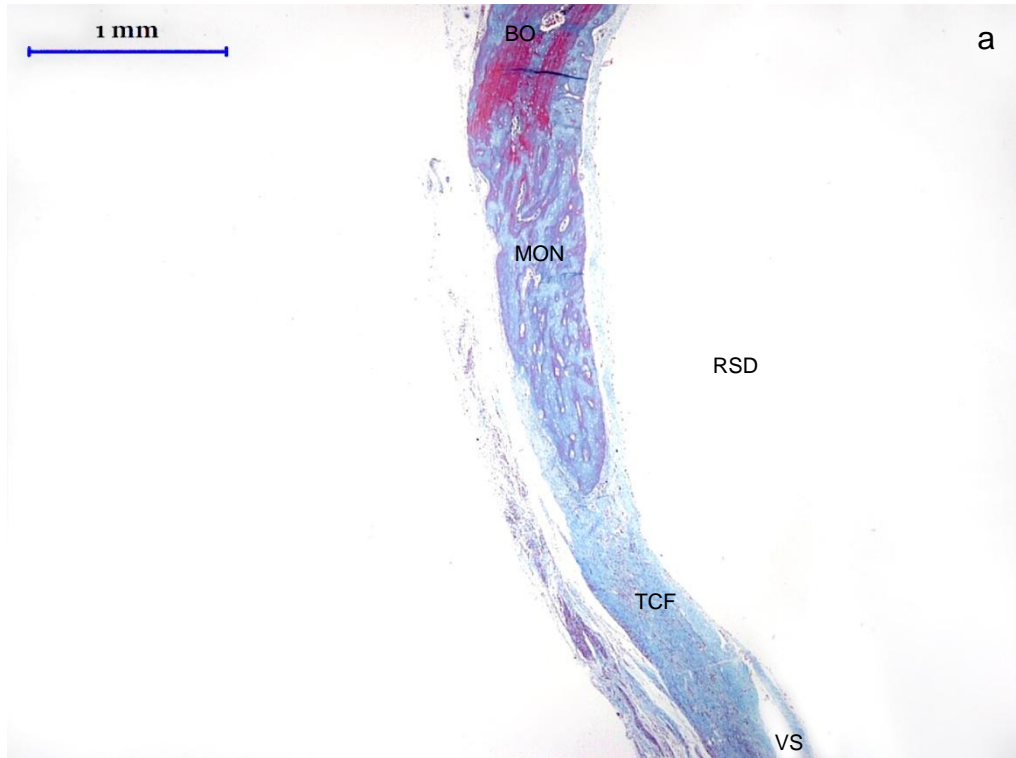


Figura 34: GCRS 45 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea, principalmente nas proximidades da região supradural (RSD) e ocupação linear de tecido conjuntivo fibroso (TCF) com presença de vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito - (TMG).



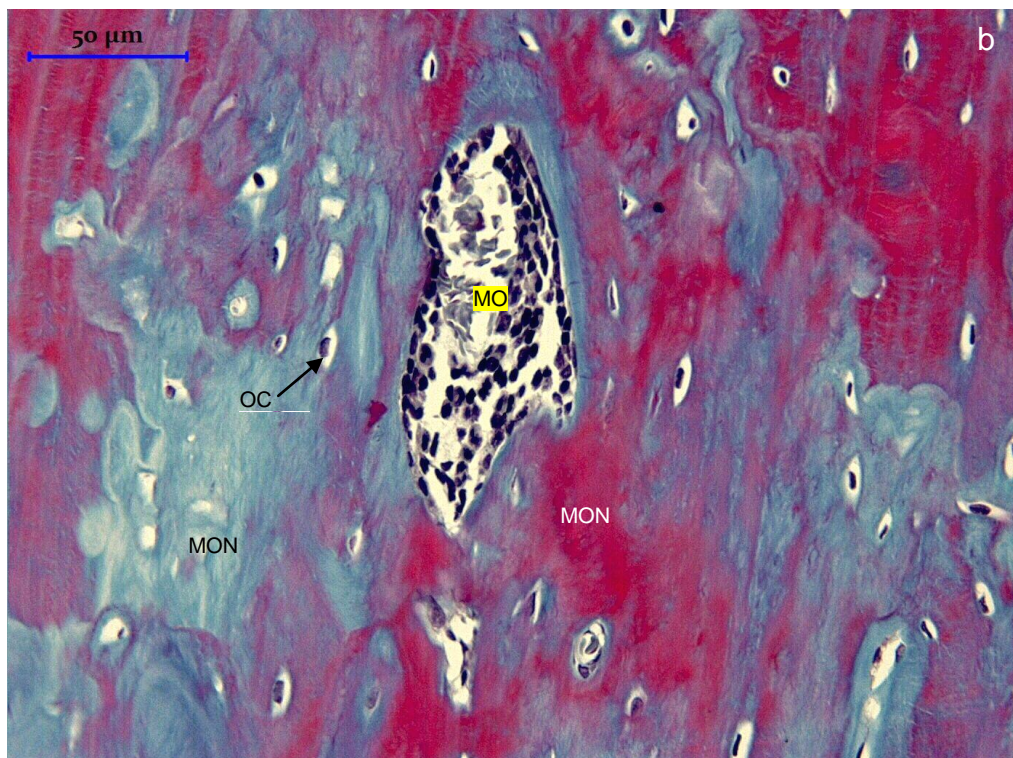
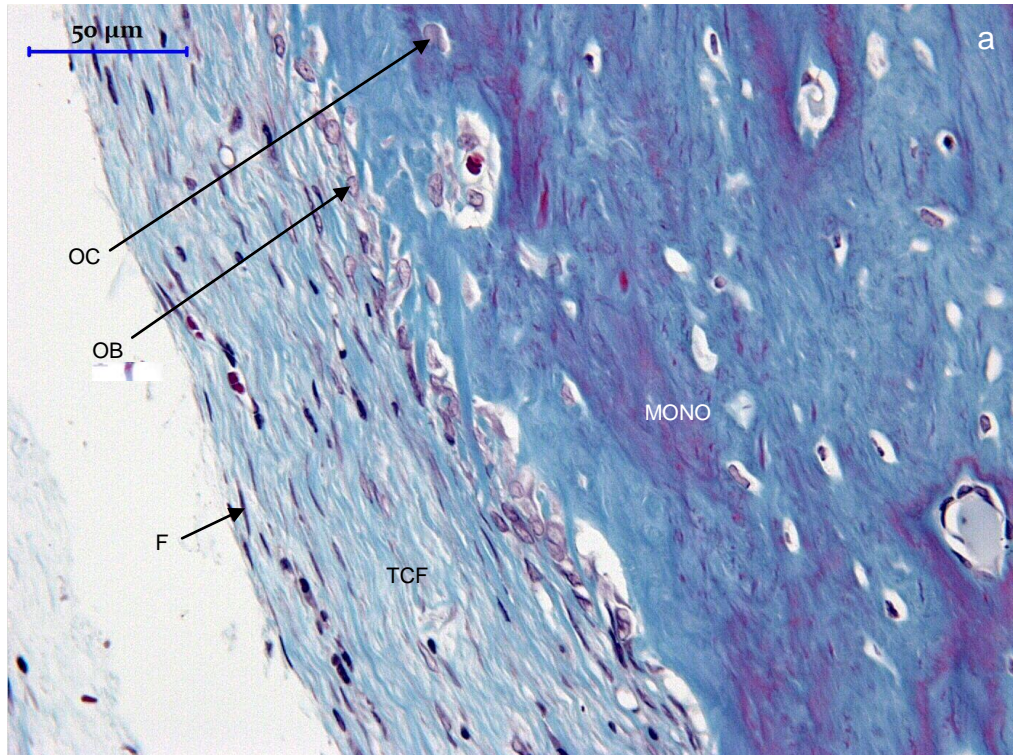


Figura 35: GCRS 45 dias – (a) e (b) – matriz osteóide neoformada (MON), associada a osteoblastos (OB) e osteócitos (OC) e medula óssea (MO). No tecido conjuntivo fibroso (TCF) observam-se e fibroblastos (F) - (TMG).



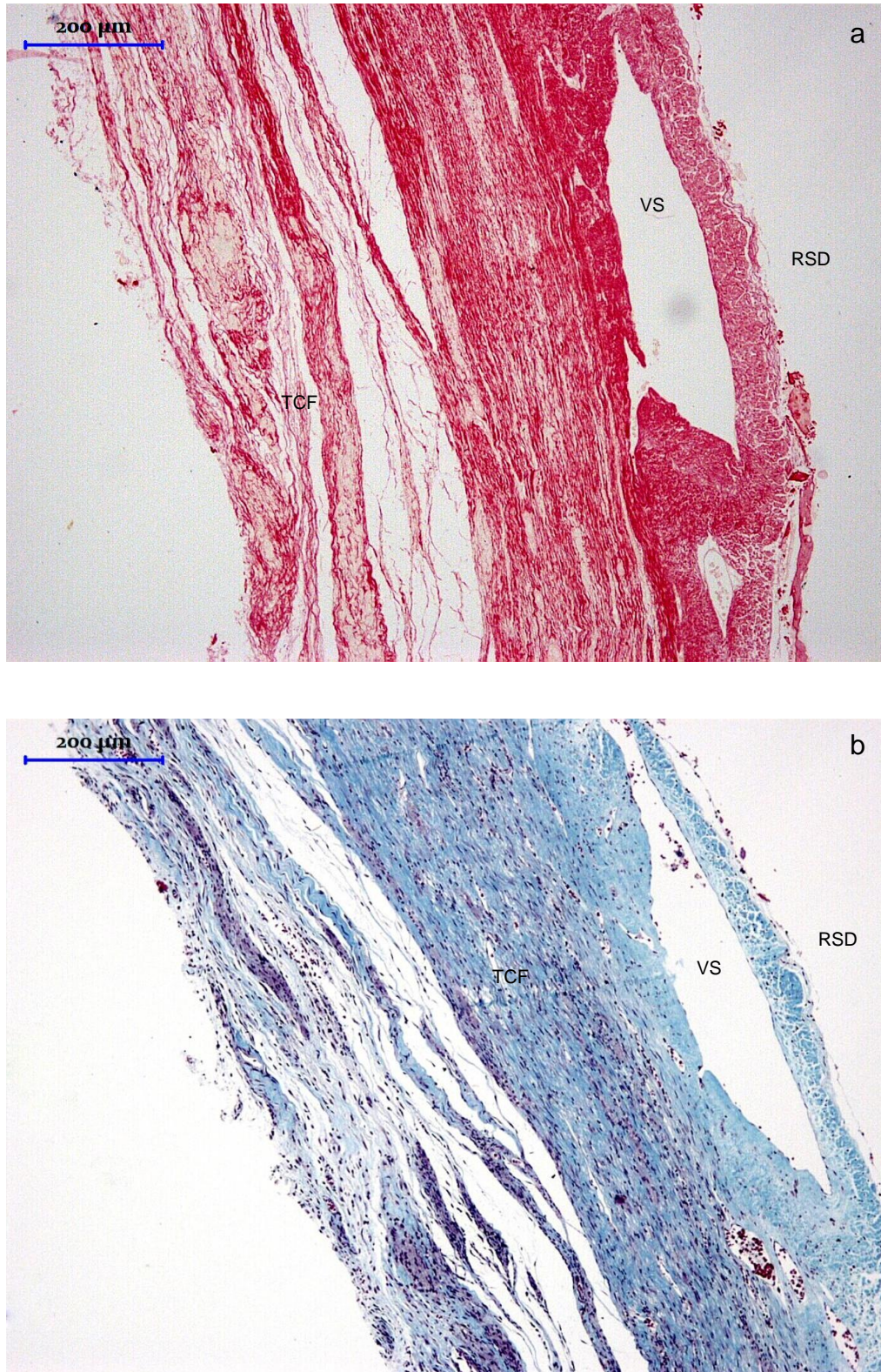


Figura 36: GCRS 45 dias – (a) e (b) – região central do defeito apresenta tecido conjuntivo fibroso (TCF) com presença de vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito - (PIFG) e (TMG).

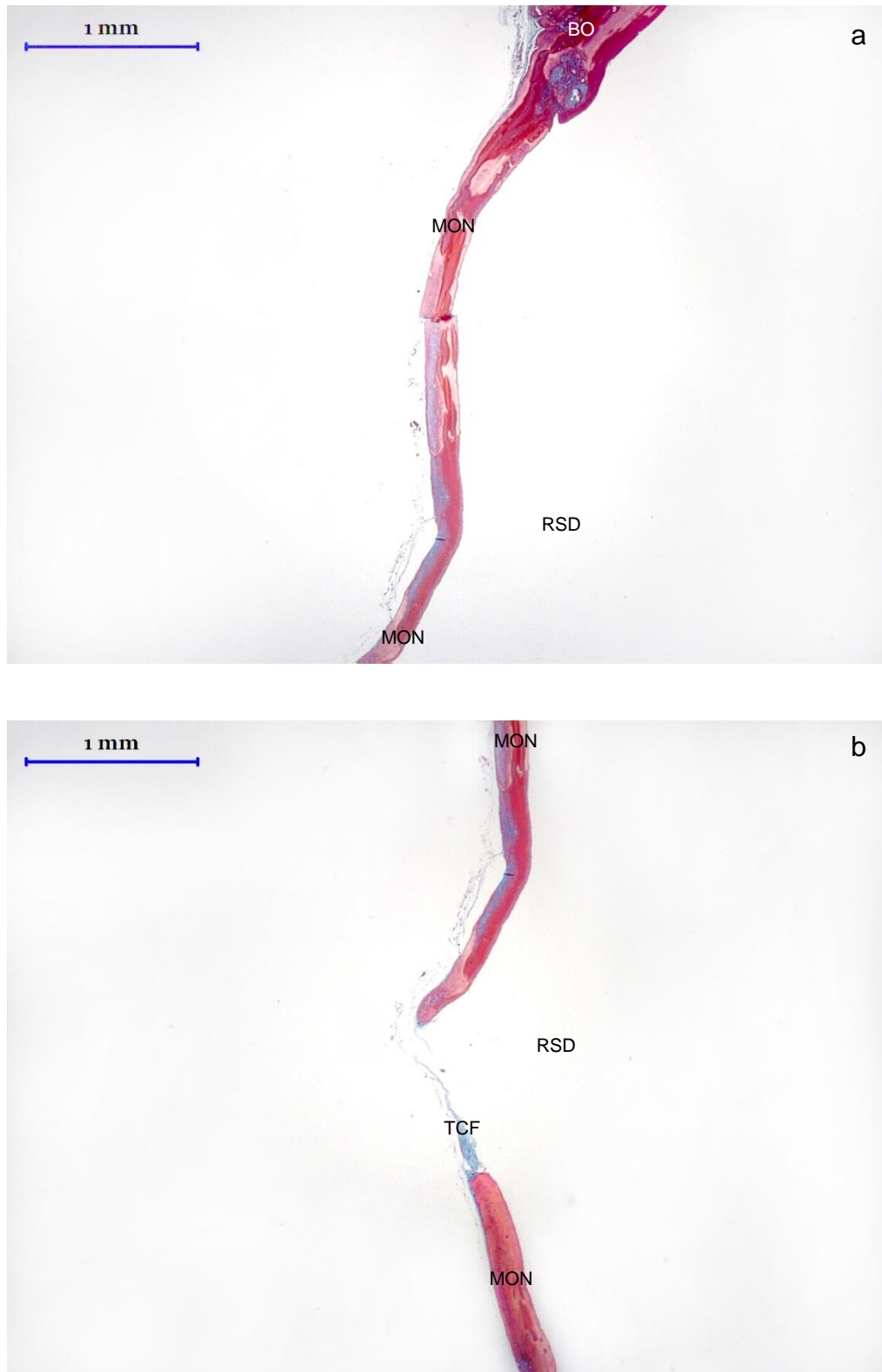


Figura 37: GCRS 120 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e ocupação de tecido conjuntivo fibroso (TCF) - (TMG).



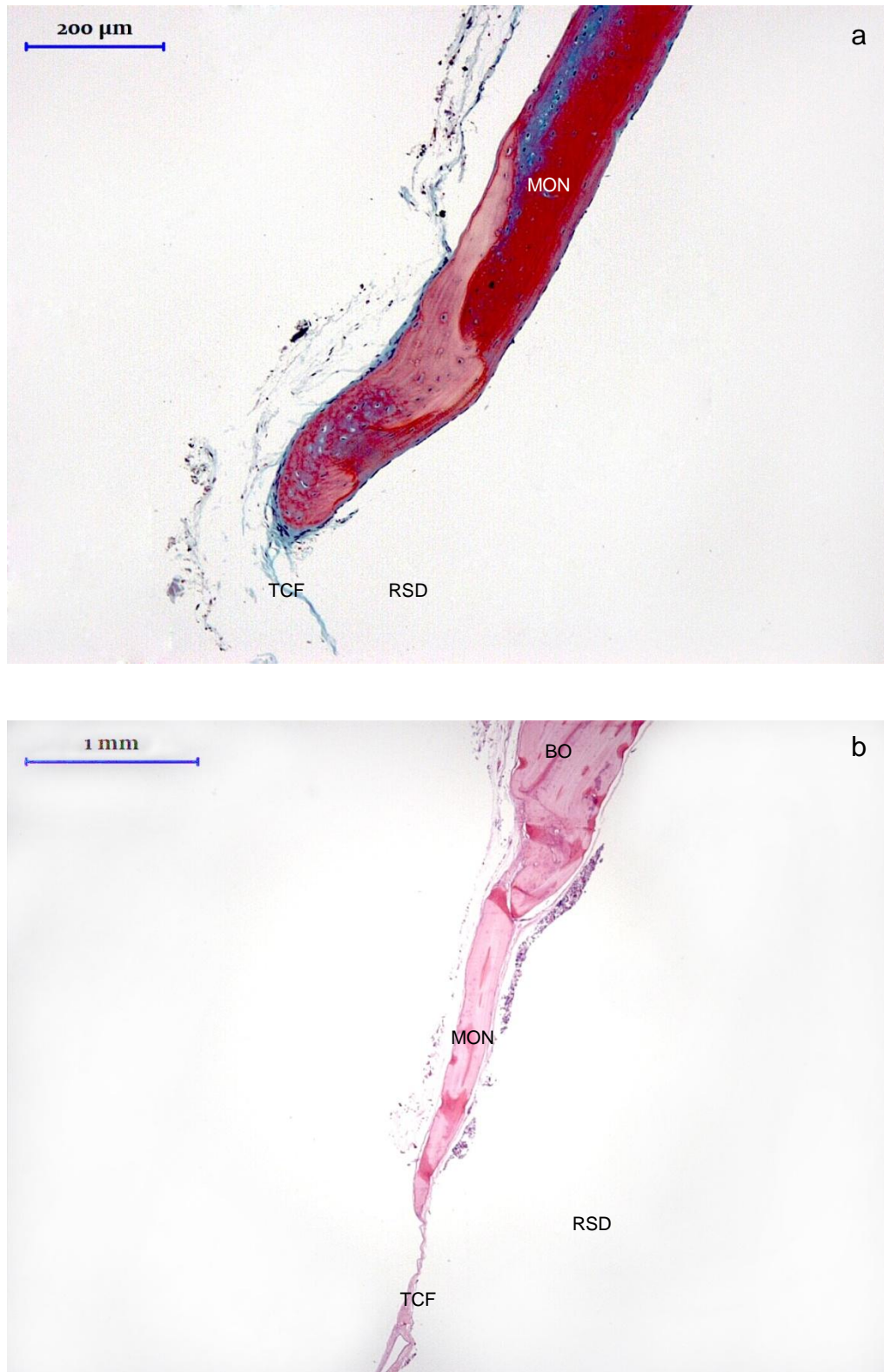


Figura 38: GCRS 120 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e ocupação por tecido conjuntivo fibroso (TCF) no centro do defeito colorações por (TMG) e hematoxilina-eosina (HE).

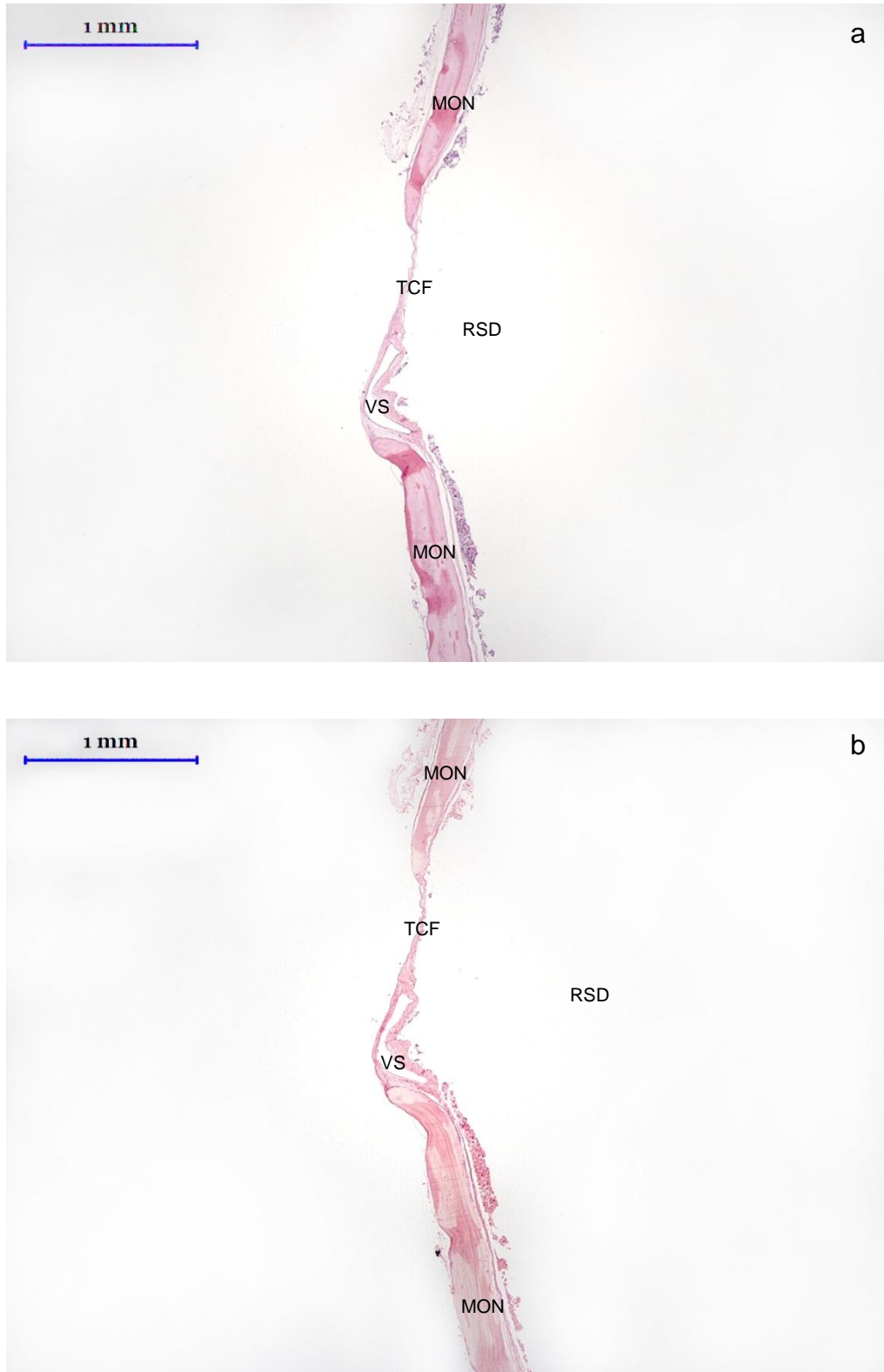


Figura 39: GCRS 120 dias – (a) e (b) – matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e ocupação de tecido conjuntivo fibroso (TCF). Vaso sanguíneo (VS) na região central do defeito - (HE), (PIFG).

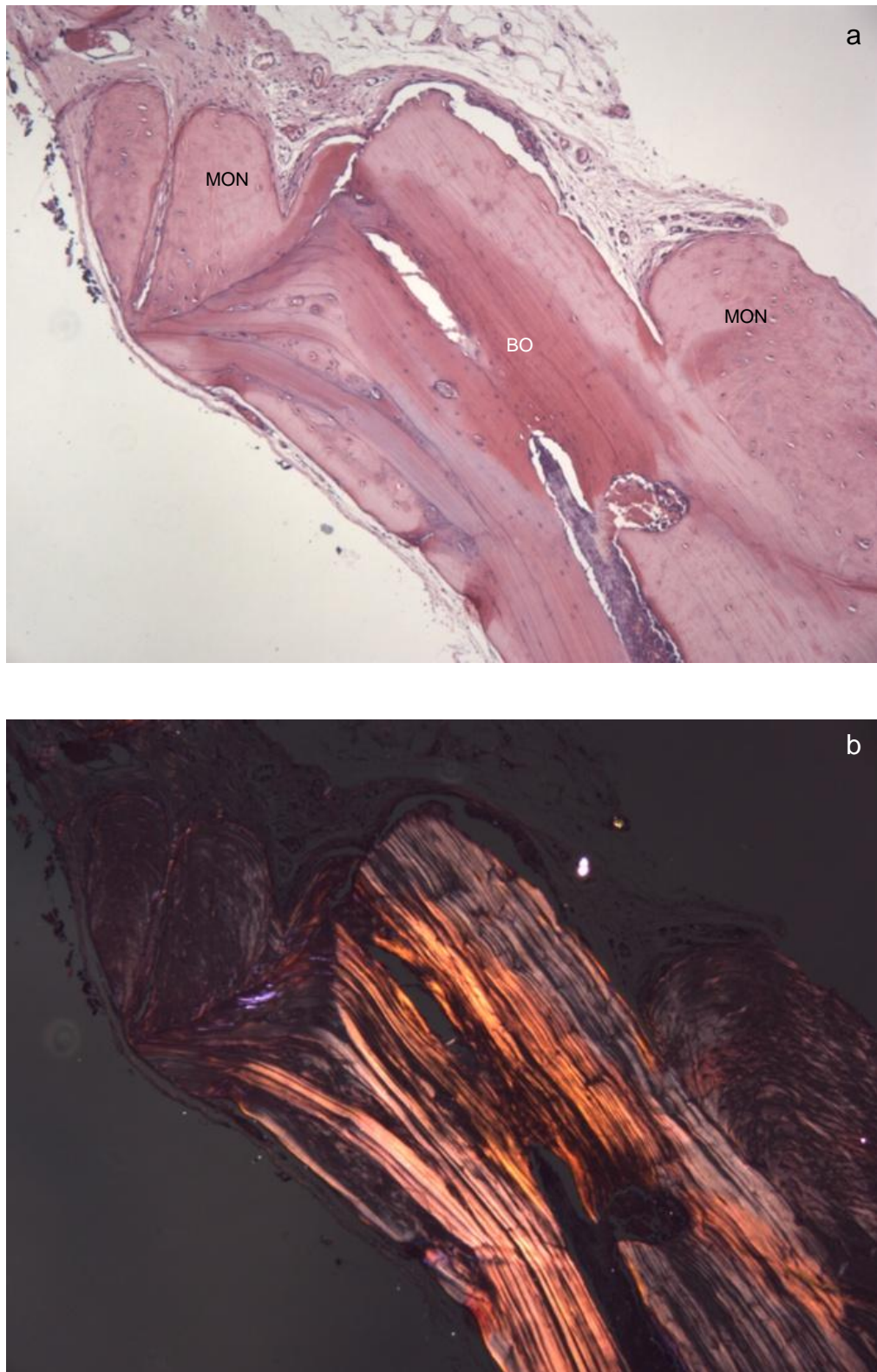


Figura 40: GCRS 120 dias – (a) – representa região de borda óssea (BO) com matriz osteóide neoformada (MON) justaposta (HE) e figura 40b representa a mesma região, obtida por microscopia de polarização, em que se pode observar a estrutura lamelar do osso pertencente à borda óssea.

### **5.1.2 Grupo Hidroxiapatita com Administração de Ranelato de Estrôncio (GHARS)**

Nas adjacências das bordas ósseas do defeito, em todos os pontos biológicos, houve neoformação óssea reativa reparativa (Figuras 41b, 42a, 49a). Aos 120 dias, a matriz osteóide neoformada encontrava-se maturada, com formação de lamelas e presença de osteócitos no seu interior, consistente com neoformação óssea (Figura 47b). Essa matriz interagiu, em alguns sítios, diretamente com o biomaterial, e sua maior formação ocorreu em áreas periféricas do biomaterial, porém se observou matriz osteóide adentrando o biomaterial (Figura 48b). Foi vista, ainda, interligação de matriz osteóide na periferia do biomaterial, o que conferiu, a esta região, aspecto reticular. Osteoblastos permearam o biomaterial nas proximidades da sua periferia.

As microesferas de HA preencheram toda a extensão do defeito ósseo, em todos os pontos biológicos, com formação de múltiplas camadas (em média, quatro) (Figuras 41a, 42a, 44b, 46a, 48a).

Aos 15 dias, o estroma encontrava-se edemaciado, bem vascularizado, com abundante quantidade de vasos sanguíneos neoformados (Figura 42b). Não foi observada neoformação vascular nos demais pontos biológicos. Aos 15 dias, o tecido conjuntivo apresentou-se do tipo frouxo, com depósito de fibras colágenas pouco organizadas, com densidade um pouco maior nas proximidades das microesferas e com presença de fibras de colágeno no interior das microesferas (Figura 43a). Composto este tecido, em todos os pontos biológicos, observou-se a presença de muitas células fusiformes, possivelmente fibroblastos (Figuras 42b, 43a e 43b). Aos 45 dias, o estroma ainda se encontrava frouxo, porém com menor edema, e o tecido conjuntivo começou a se organizar nas proximidades do biomaterial. A maioria das microesferas encontrava-se circundada por cápsula delgada, e, no seu interior, havia células fusiformes e maior quantidade de finos septos presentes no interior do biomaterial em comparação com o ponto biológico anterior (Figuras 45b, 46a, 46b). Essa deposição fibrosa se fez, portanto, de forma centrípeta. Aos 120 dias, o interstício apresentou característica de estabilidade, com

morfologia dos septos fibrosos e vasos sanguíneos semelhante ao ponto biológico anterior (Figura 49b).

Observou-se que, aos 15 dias, a maioria das microesferas se encontrava íntegra e estava circundada por discreta inflamação crônica granulomatosa, enquanto que as microesferas que se apresentaram mais fragmentadas foram permeadas por reação granulomatosa um pouco mais acentuada (Figura 43b). Identificou-se, ainda, infiltrado mononuclear linfocitário discreto e, aos 45 dias, em algumas regiões, havia um infiltrado mononuclear moderado com predomínio linfoplasmocitário e histiocítico, com macrófagos presentes no interior do biomaterial, mais concentrado em regiões perivasculares (Figura 46b). O padrão inflamatório observado neste grupo tornou-se ainda mais discreto e difuso no ponto biológico de 120 dias (Figura 48b).



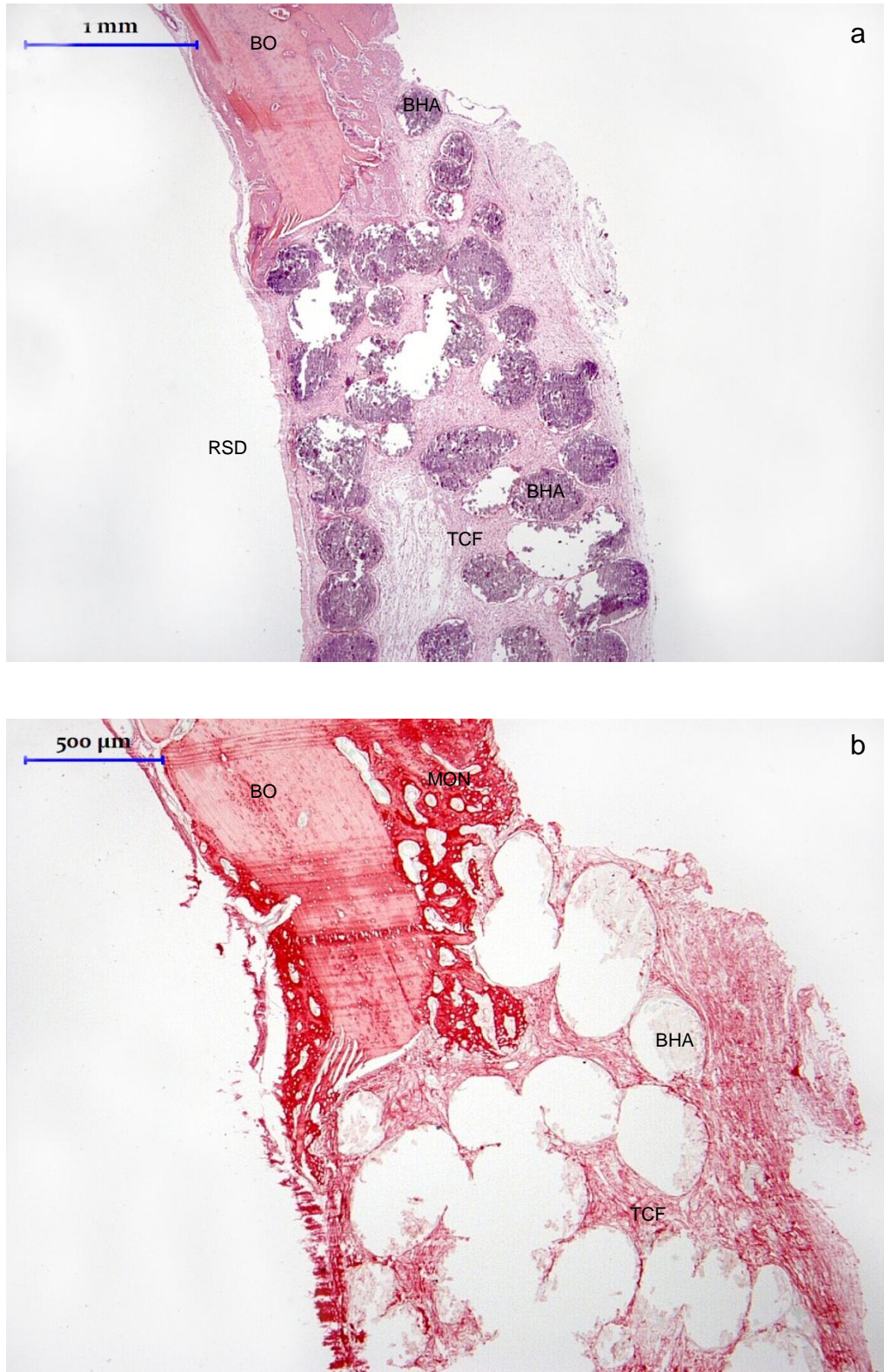


Figura 41: GHARS 15 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO), presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento do defeito ósseo com o BHA - (HE), (PIFG).



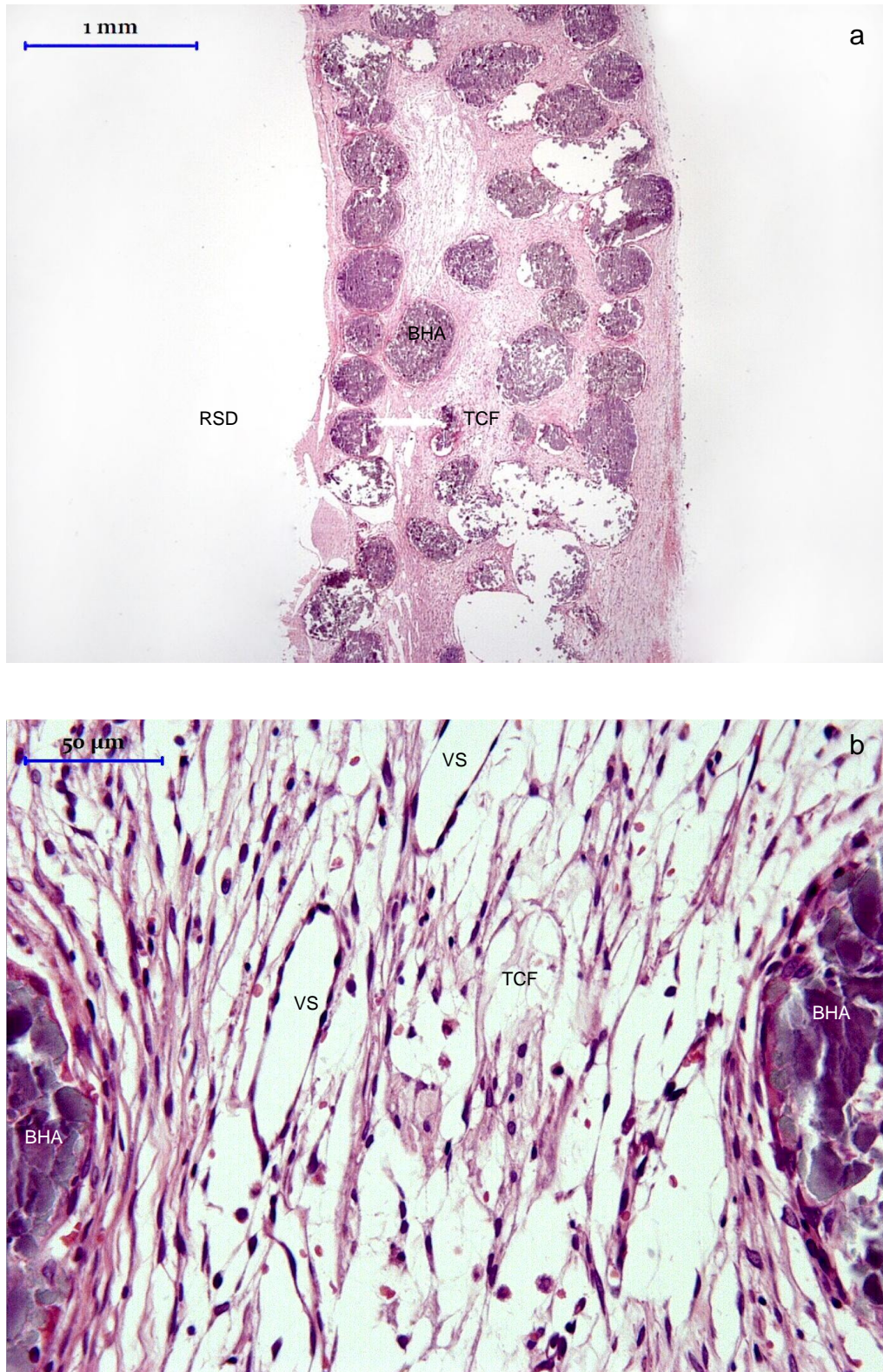


Figura 42: GHARS 15 dias – (a) e (b) – presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento do defeito ósseo com o BHA, estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF) e vasos sanguíneos (VS) - (HE).



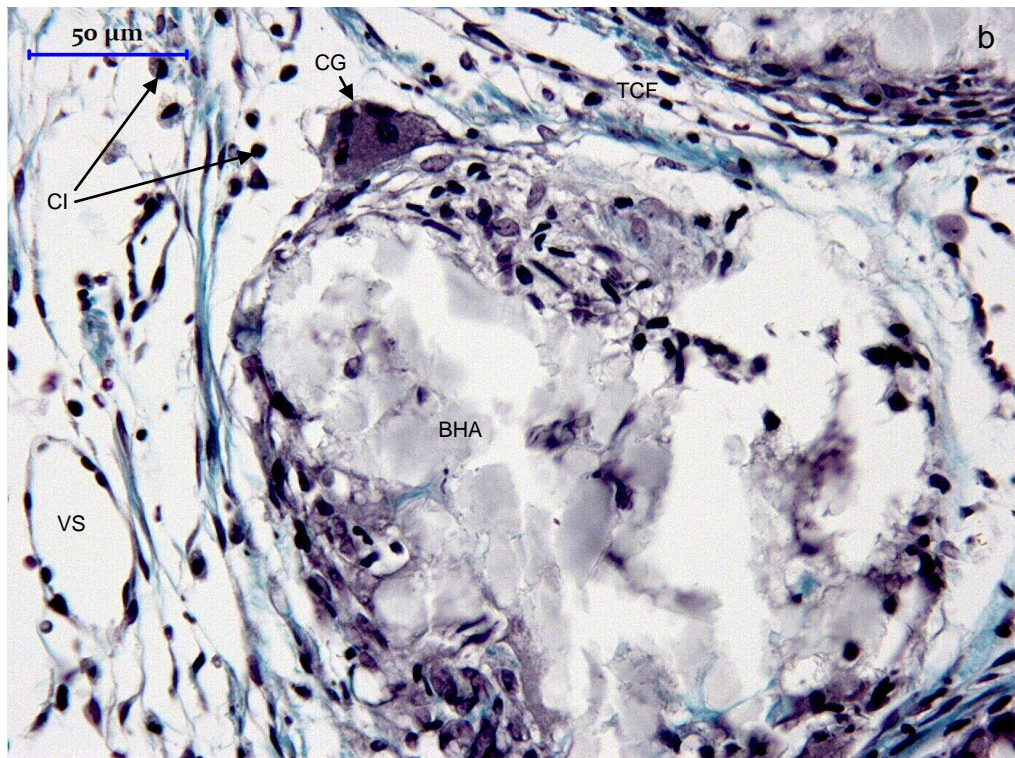
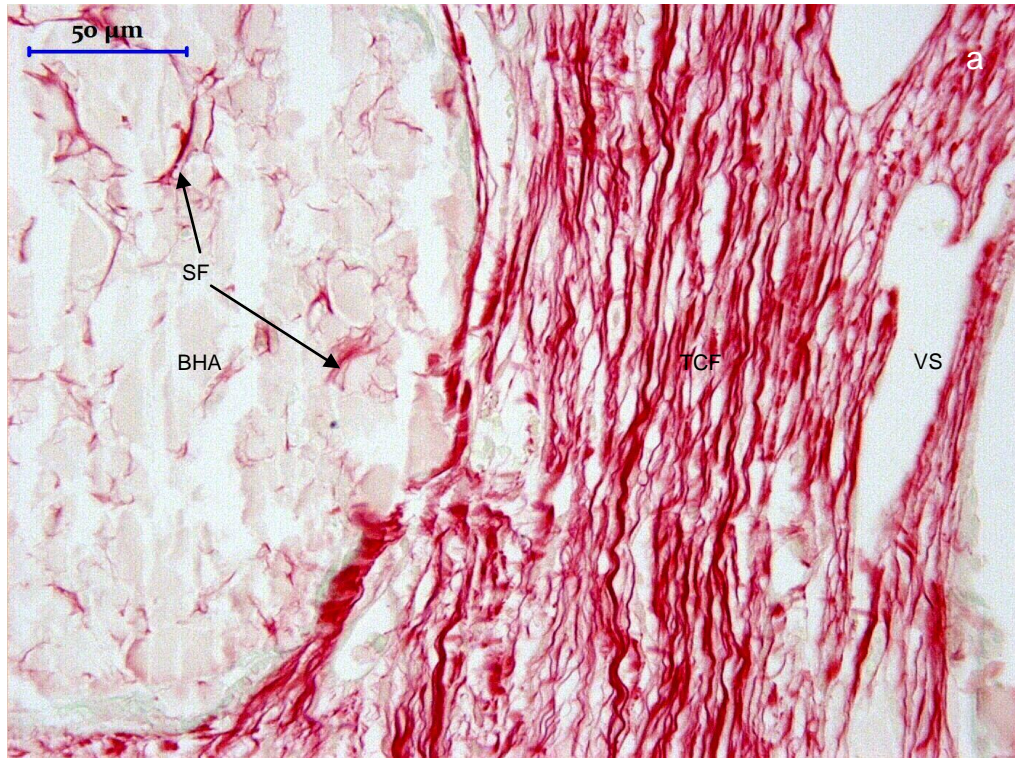


Figura 43: GHARS 15 dias – (a) e (b) – estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF), septos fibrosos (SF) no interior do biomaterial (seta), vasos sanguíneos (VS), biomaterial de HA (BHA) e presença de célula gigante (CG) em proximidade com o BHA e de outras células inflamatórias (CI) no TCF (seta) - (PIFG), (TMG).



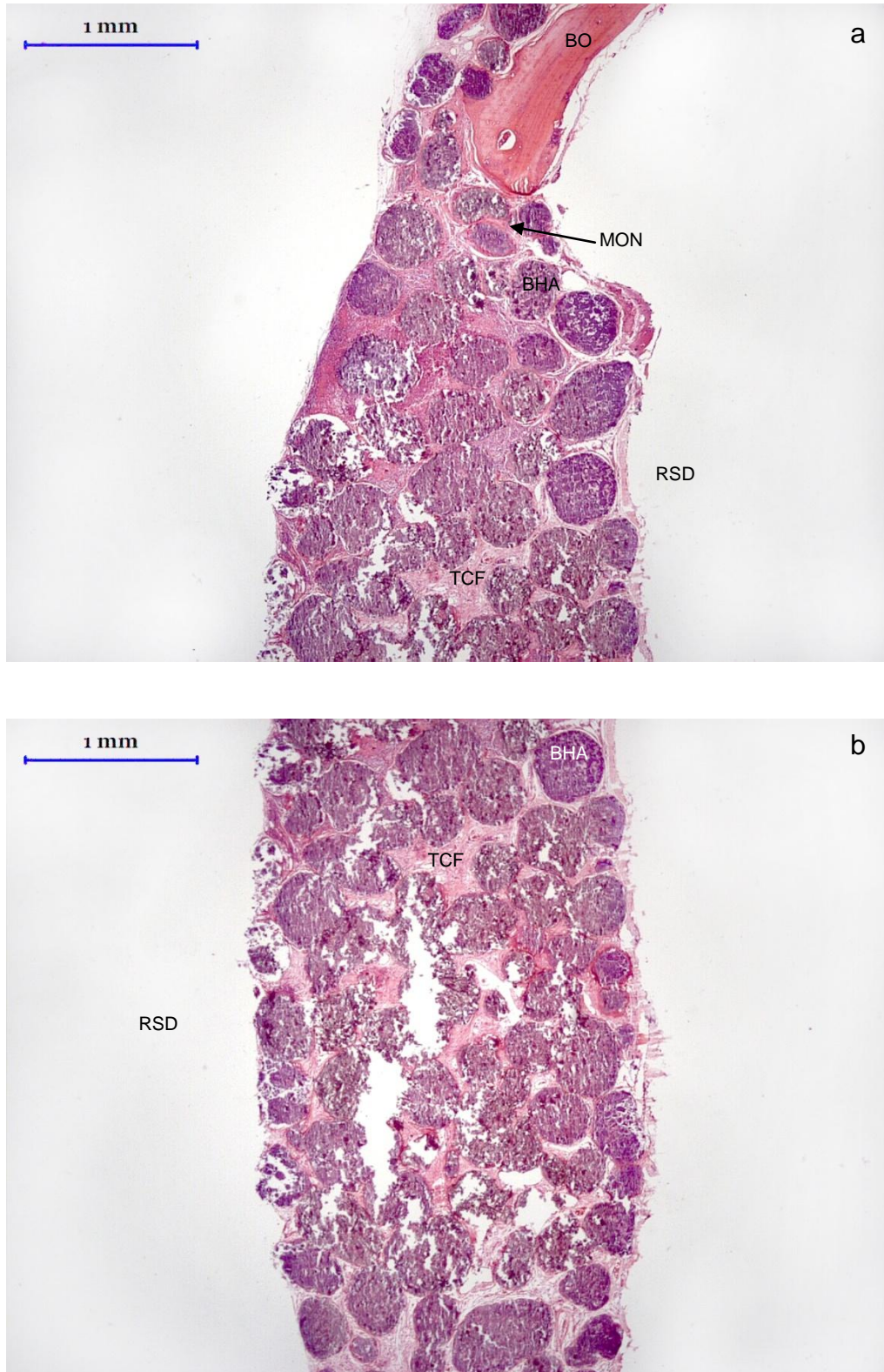


Figura 44: GHARS 45 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO), presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento do defeito ósseo pelo BHA - (HE).



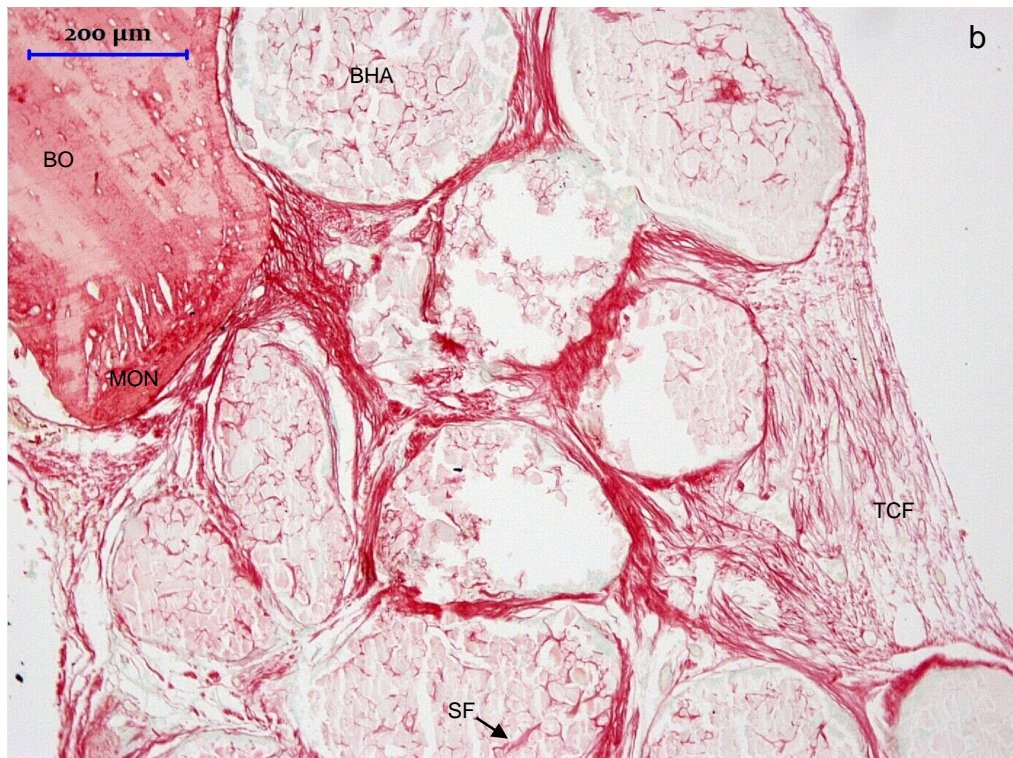
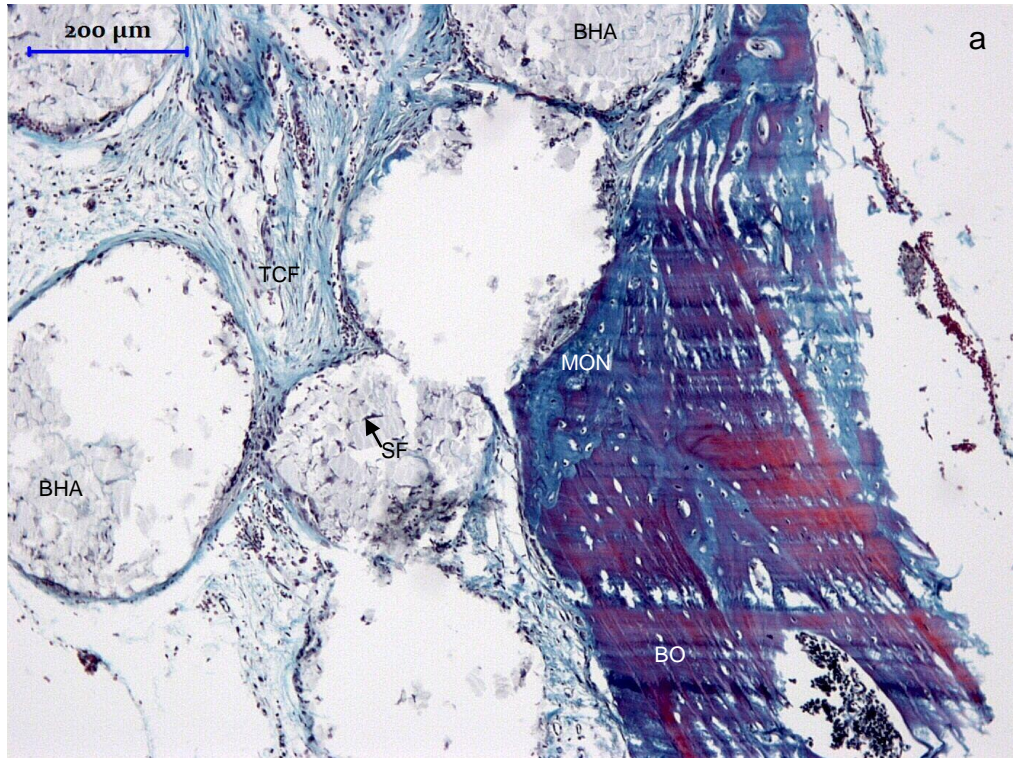


Figura 45: GHARS 45 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO), tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento do defeito ósseo pelo BHA. Estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF), septos fibrosos (SF) no interior das microesferas - (TMG), (PIFG).



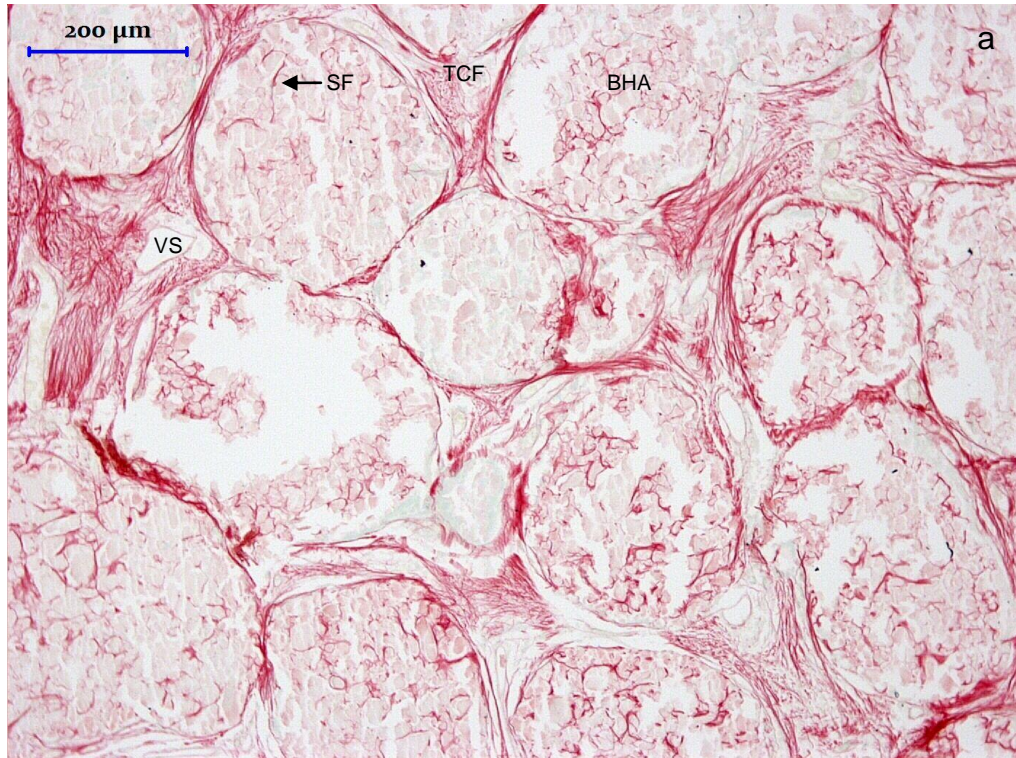


Figura 46: GHARS 45 dias – (a) e (b) – presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento dos BHA. Estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF), presença de plasmócitos (PL), septos fibrosos (SF) no interior das microesferas, vasos sanguíneos (VS) - (PIFG), (TMG).



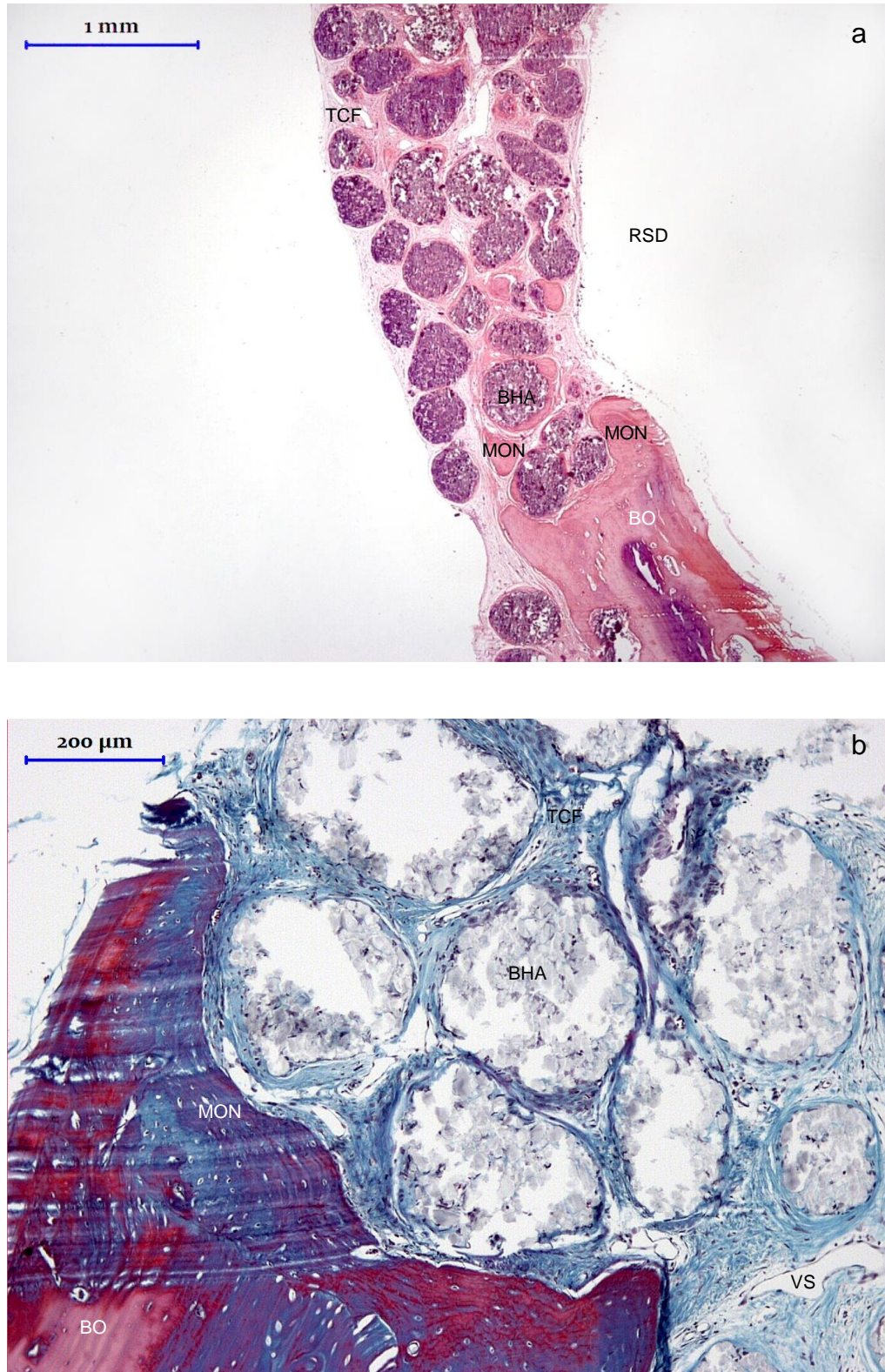


Figura 47: GHARS 120 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO) e justaposta ao biomaterial de HA (BHA). Presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e vasos sanguíneos (VS). Preenchimento do defeito ósseo com os BHA - (HE), (TMG).



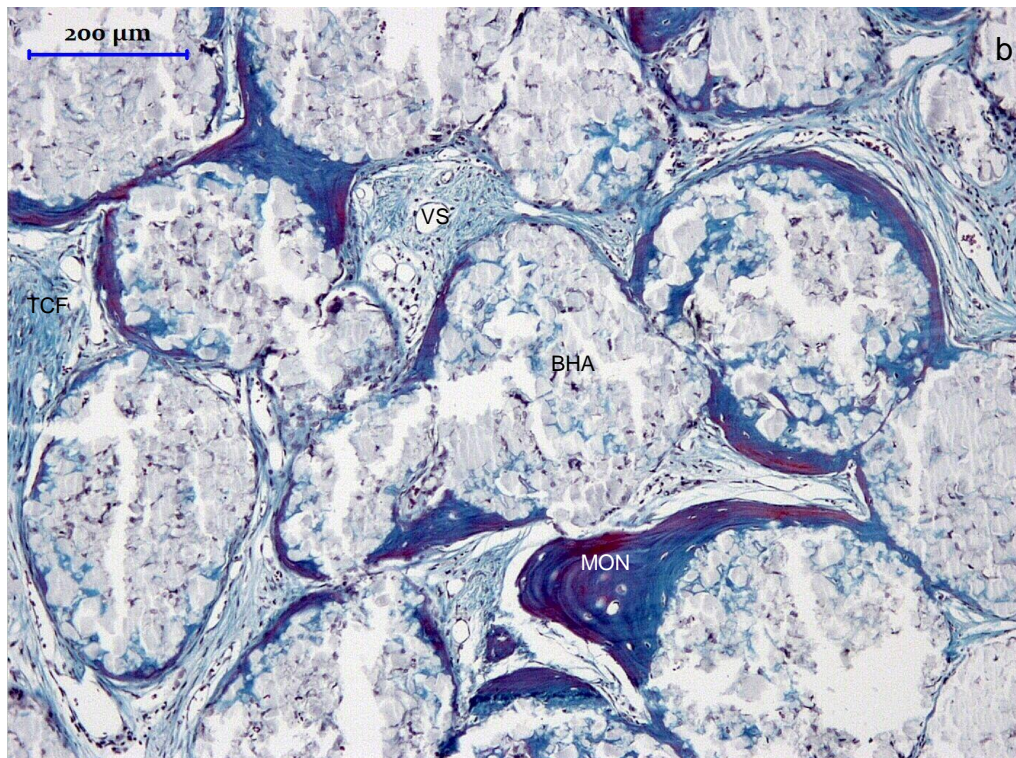


Figura 48: GHARS 120 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) justaposta ao biomaterial de HA (BHA), tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e vasos sanguíneos (VS) - (HE), (TMG).



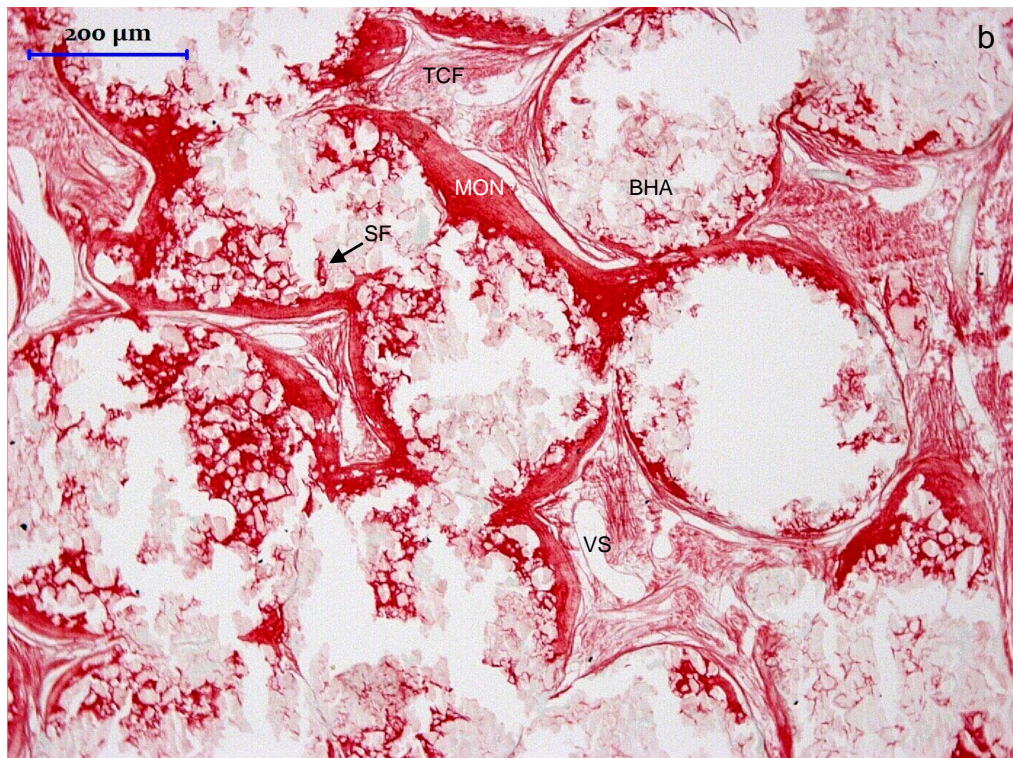


Figura 49: GHARS 120 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO) e justaposta ao biomaterial de HA (BHA). Presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA), com formação de septos fibrosos (SF) e preenchimento do defeito ósseo com os BHA e vasos sanguíneos (VS) - (PIFG).



### 5.1.3 Grupo Fibrina com Administração de Ranelato de Estrôncio (GFRS)

Neoformação de matriz osteóide reacional associada às bordas do defeito foi observada aos 15 dias, inicialmente na região adjacente à dura-máter, em direção centrípeta, com maior espessura próxima à região de osso remanescente. Em algumas áreas, na periferia do defeito e também em áreas mais centrais, houve neoformação de matriz osteóide (Figuras 50a, 50b, 51a). Dentro dessa matriz, existiam áreas mais organizadas, o que foi evidenciado por aspecto lamelar e maior basofilia na coloração por hematoxilina e eosina (HE) (Figura 50b). Em tal ponto biológico, não se observou conexão entre os focos de neoformação de matriz osteóide. Foram observadas, também, fileiras de osteoblastos globosos e outros se transformando em osteócitos e a presença de medula óssea (Figura 51b). Começa a haver formação de lamelas, porém não foi observada conexão entre alguns focos de neoformação de matriz osteóide. Aos 45 dias, alguns defeitos se encontravam, em extensão, completamente preenchidos por matriz osteóide neoformada, enquanto outros apresentavam quatro quintos de preenchimento (Figura 45a). Nessa matriz, existiam regiões mais maduras, com maior grau de mineralização, aspecto lamelar pouco ordenado e regiões mais basofílicas. Havia regiões que apresentavam início de coalescência entre os focos de mineralização citados, e foi observada, próxima ao osso antigo, uma região com formação de osso medular com presença de células hematopoiéticas, que se estendeu em direção à matriz osteóide neoformada. Observaram-se fileiras de osteoblastos em menor atividade e, no interior das lamelas, alguns osteócitos com núcleo mais fusiforme (Figura 45a). Aos 120 dias, a matriz osteóide neoformada na periferia do defeito ósseo mostrou-se equivalente à espessura da borda óssea com discreto adelgaçamento em direção ao centro. O defeito encontrava-se vastamente preenchido com matriz osteóide neoformada ocupando toda a extensão, exceto na região equivalente à sutura interparietal. Tal matriz apresentou aspecto lamelar, ressaltado com vermelho mais intenso na coloração de Tricrômico de Masson Goldner (TMG) (Figuras 56a, 57a). A maioria dos osteócitos encontrava-se menos ativa, com aspecto mais fusiforme e mais alongado, enquanto outros apresentavam aspecto globoso (Figura 57b).

Aos 15 dias, o estroma encontrava-se vascularizado com vasos sanguíneos neoformados (Figura 52a). Não foi observada neoformação vascular nos demais

pontos biológicos. Aos 15 dias, o defeito ósseo, em sua maior parte, estava preenchido por tecido conjuntivo fibroso delgado, evidenciado por proteínas fibrilares (Figura 52b). Nos demais pontos biológicos, notou-se redução na quantidade de tecido conjuntivo fibroso, devido à predominância de matriz osteóide neoformada (Figura 55b e 58a). Em todos os pontos biológicos analisados, a reação inflamatória mostrou-se inconspícua (Figura 52a, 54a, 57b).

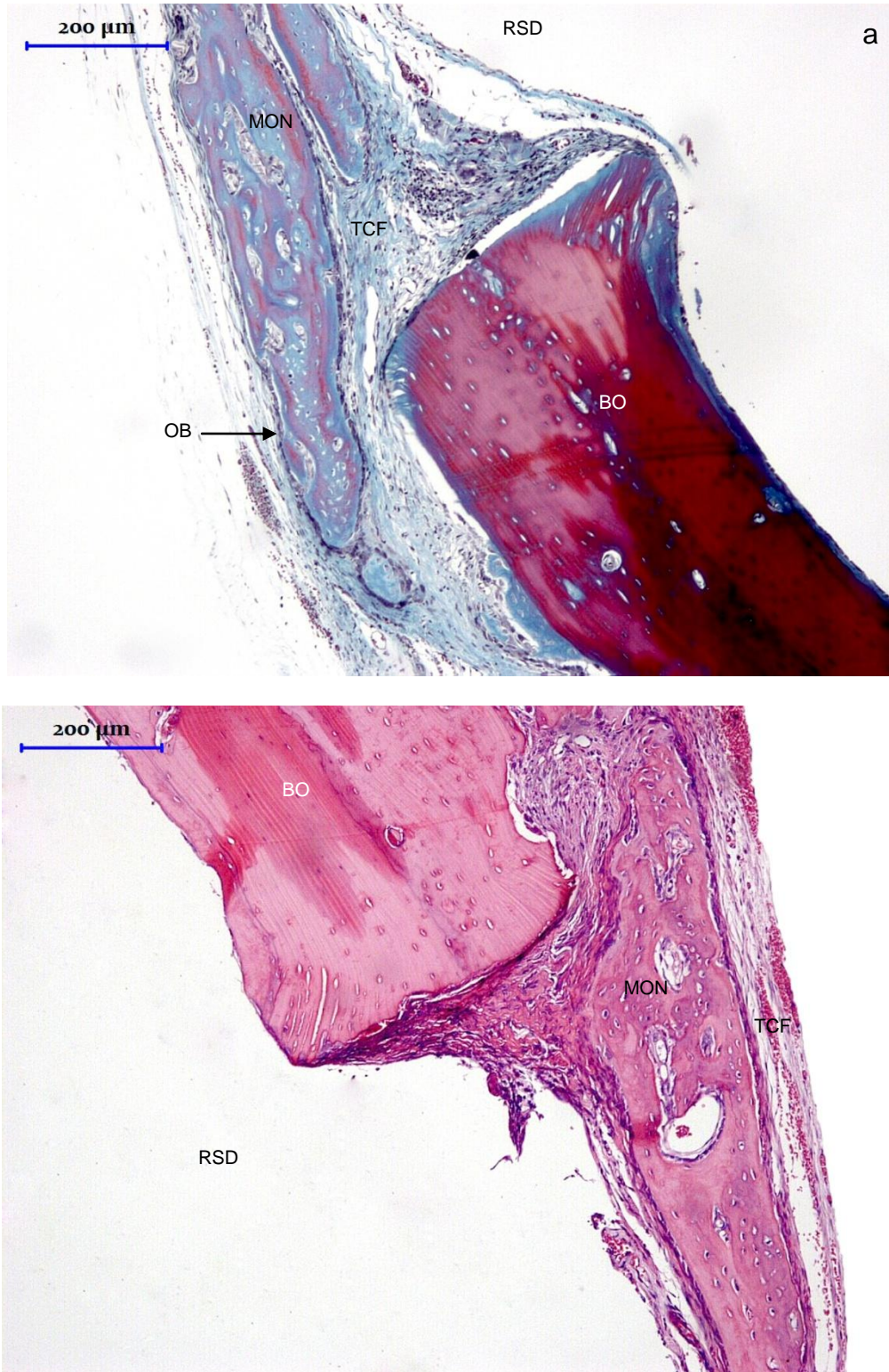


Figura 50: GFRS 15 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea, principalmente nas proximidades da região supradural (RSD). Presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) - (TMG), (HE).



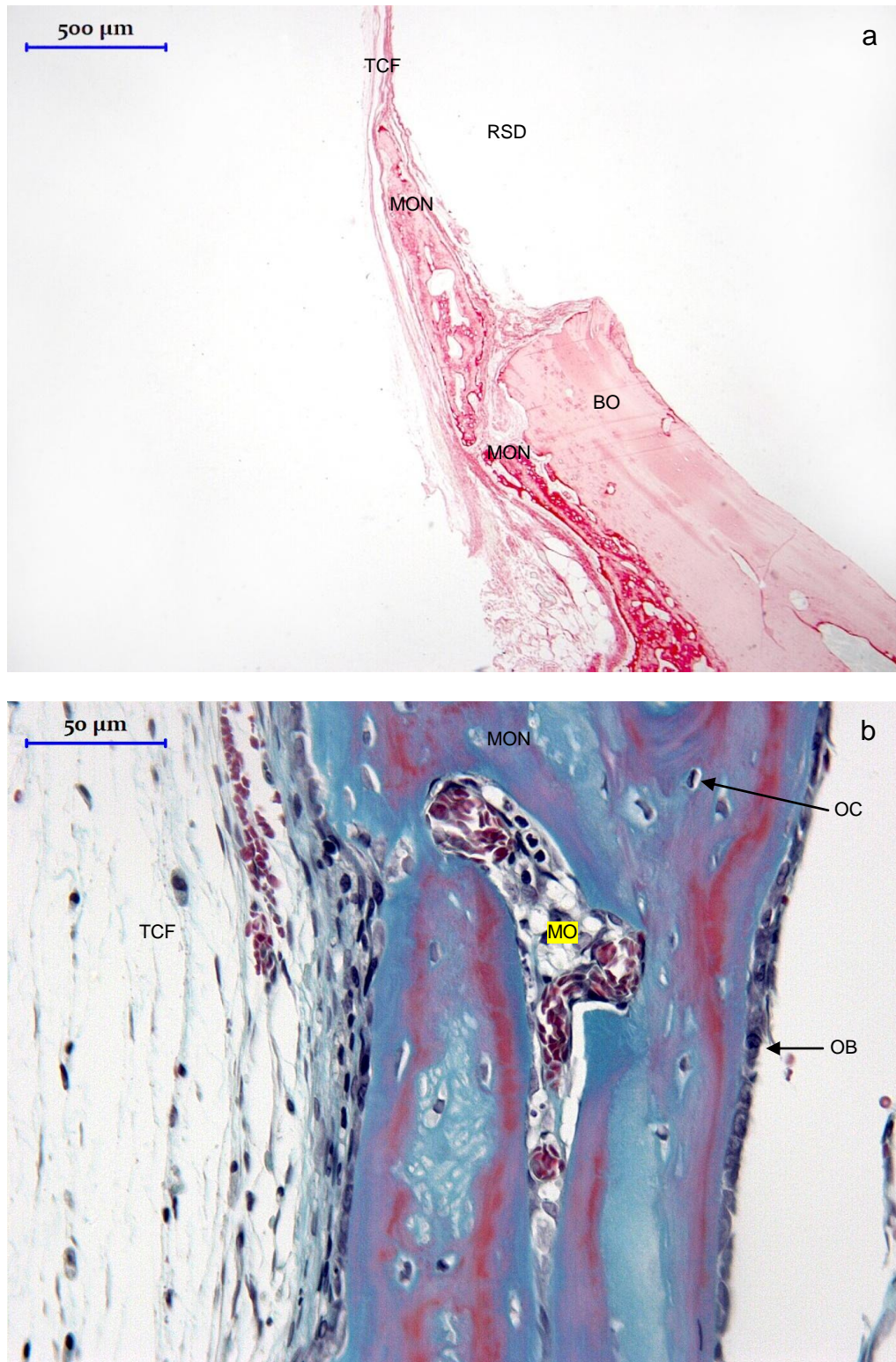


Figura 51: GFRS 15 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea, principalmente nas proximidades da região supradural (RSD). Presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF). Matriz osteóide neoformada (MON), associada à medula óssea (MO), osteoblastos (OB) e osteócitos (OC) - (PIFG), (TMG).



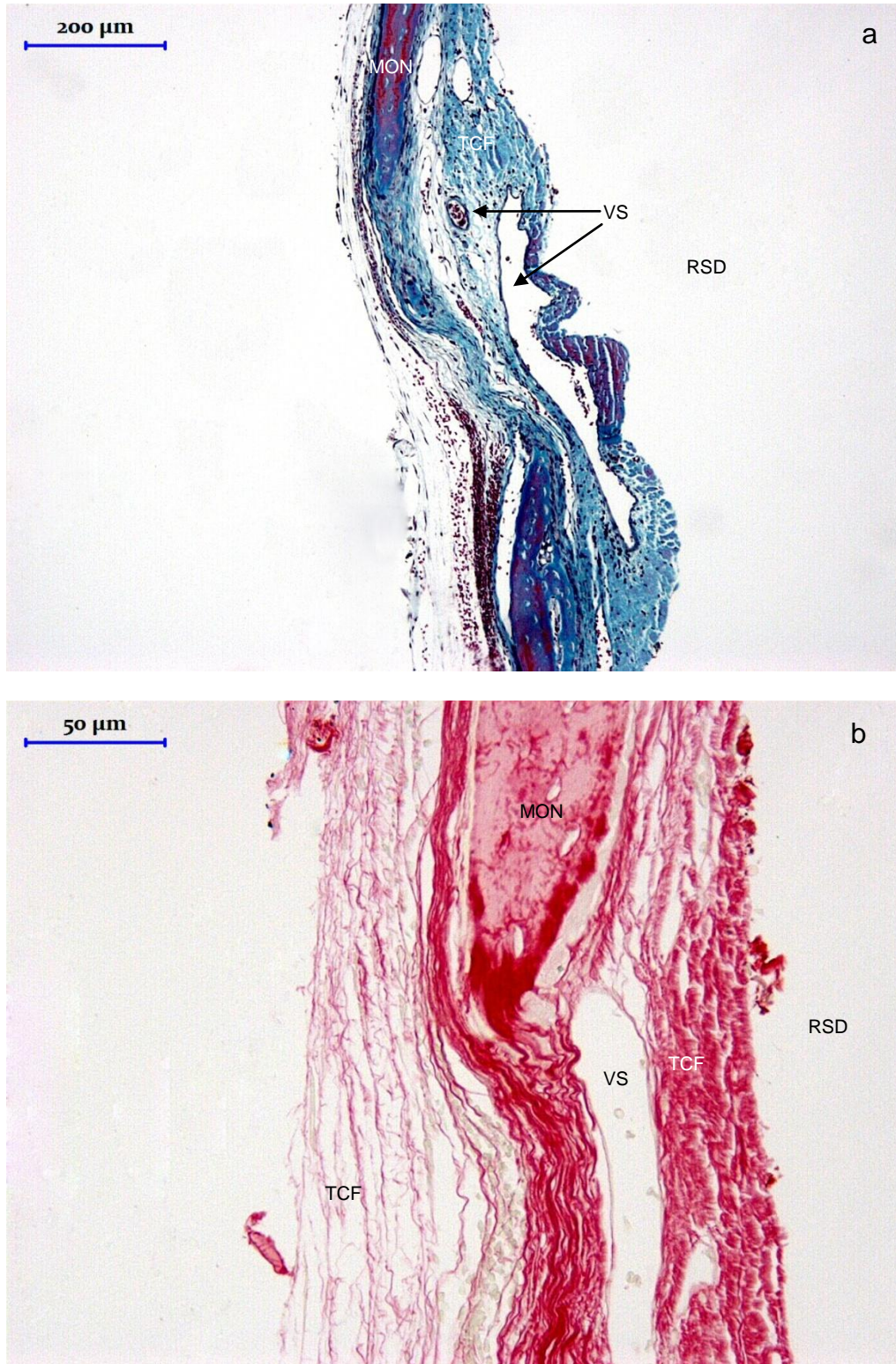


Figura 52: GFRS 15 dias – (a) e (b) – região central do defeito com ocupação linear de matriz osteóide neoformada (MON) e ocupação linear de tecido conjuntivo fibroso (TCF) abrangendo um terço do defeito. Vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito - (TMG), (PIFG).

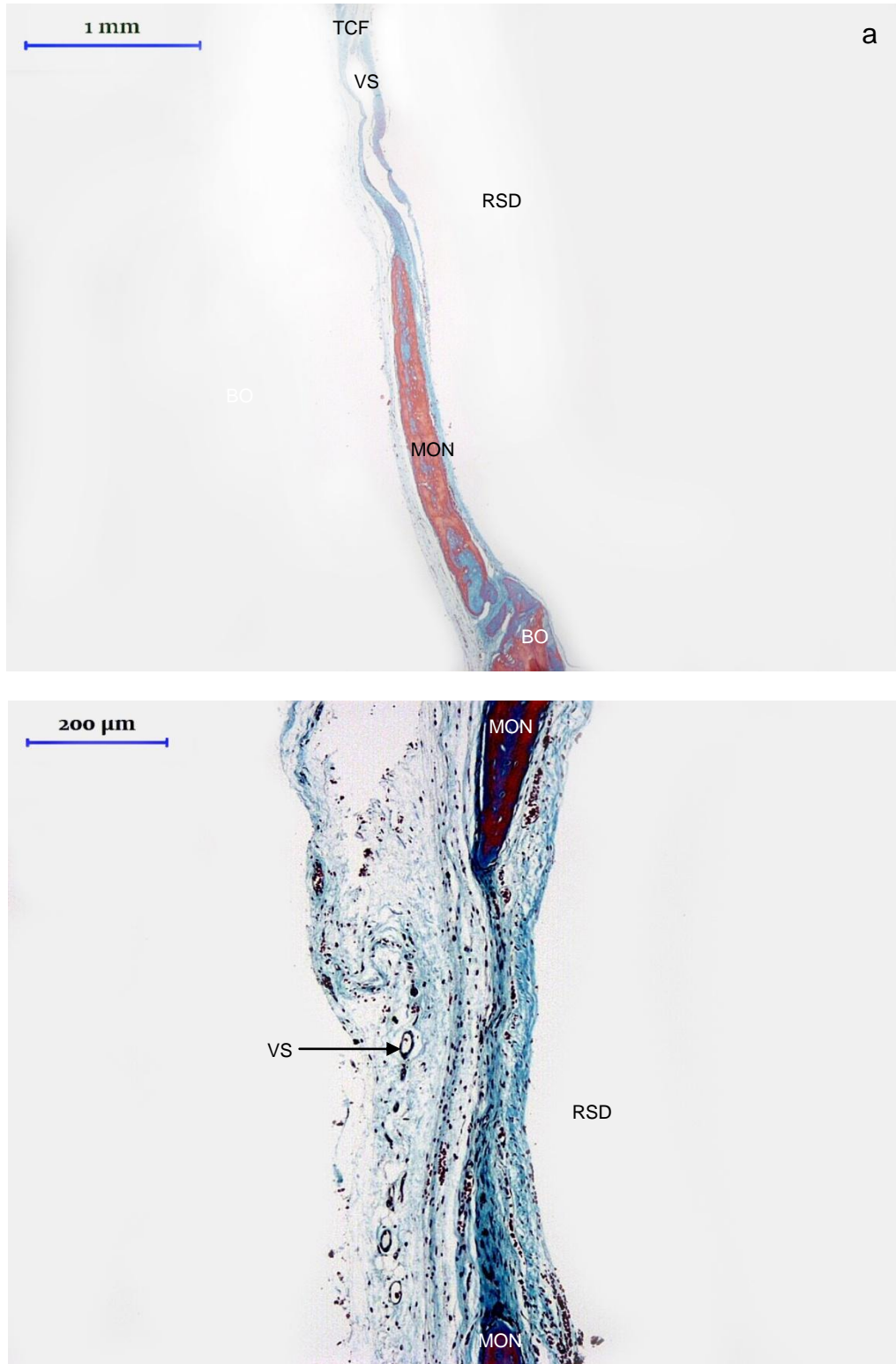


Figura 53: GFRS 45 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea, principalmente nas proximidades da região supradural (RSD). Presença de tecido conjuntivo fibroso com vasos sanguíneos (VS) - (TMG).



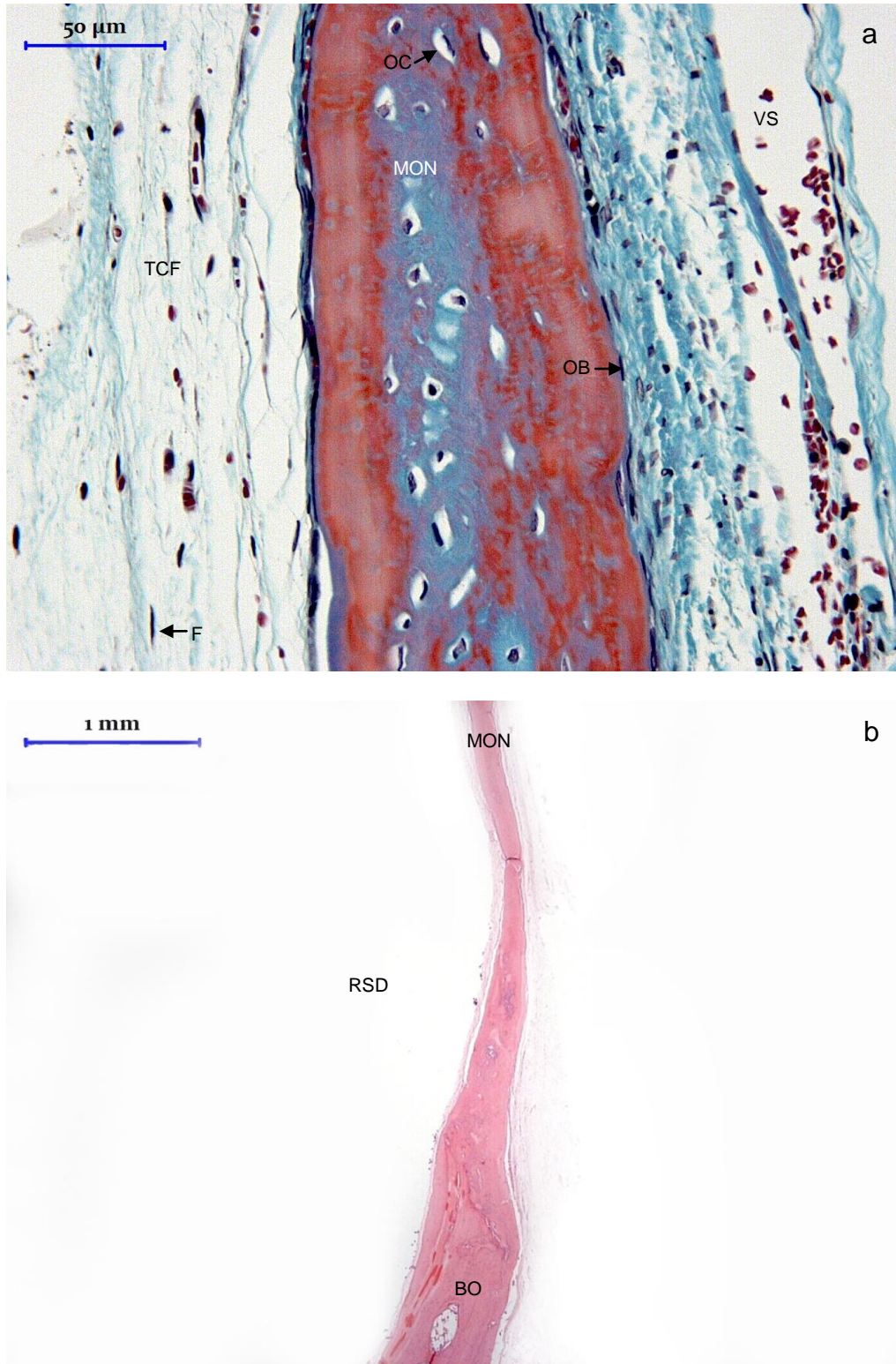


Figura 54: GFRS 45 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea, principalmente nas proximidades da região supradural (RSD). Presença de tecido conjuntivo fibroso. Osteoblastos (OB) e osteócitos (OC). No tecido conjuntivo fibroso (TCF) observam-se vasos sanguíneos (VS) e fibroblastos (F) - (TMG), (PIFG).

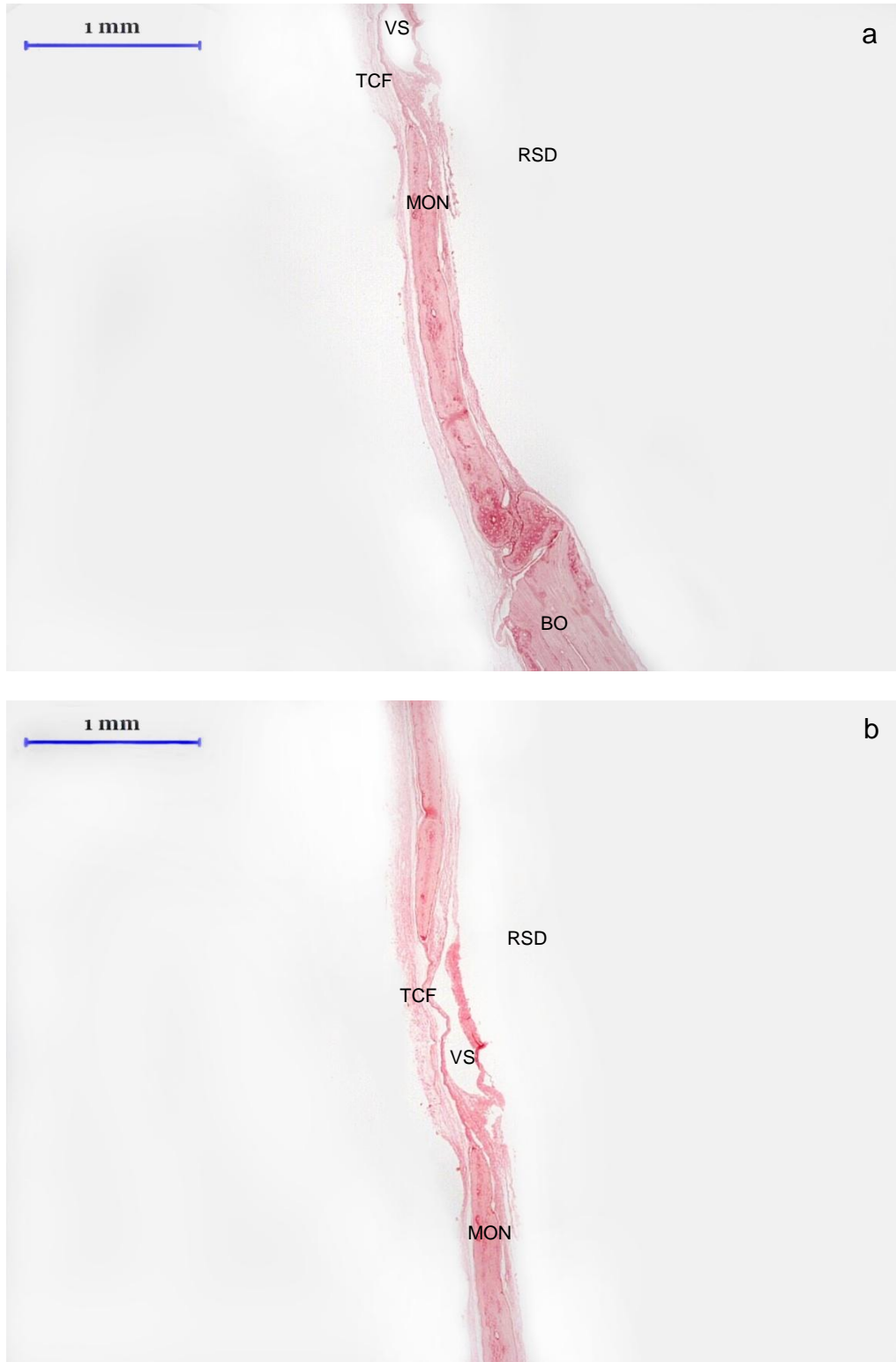


Figura 55: GFRS 45 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito e em maior espessura quando localizada próximo à borda óssea, principalmente nas proximidades da região supradural (RSD). Região central do defeito com ocupação linear de matriz osteóide neoformada (MON) e ocupação linear de tecido conjuntivo fibroso (TCF). Vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito - (PIFG).



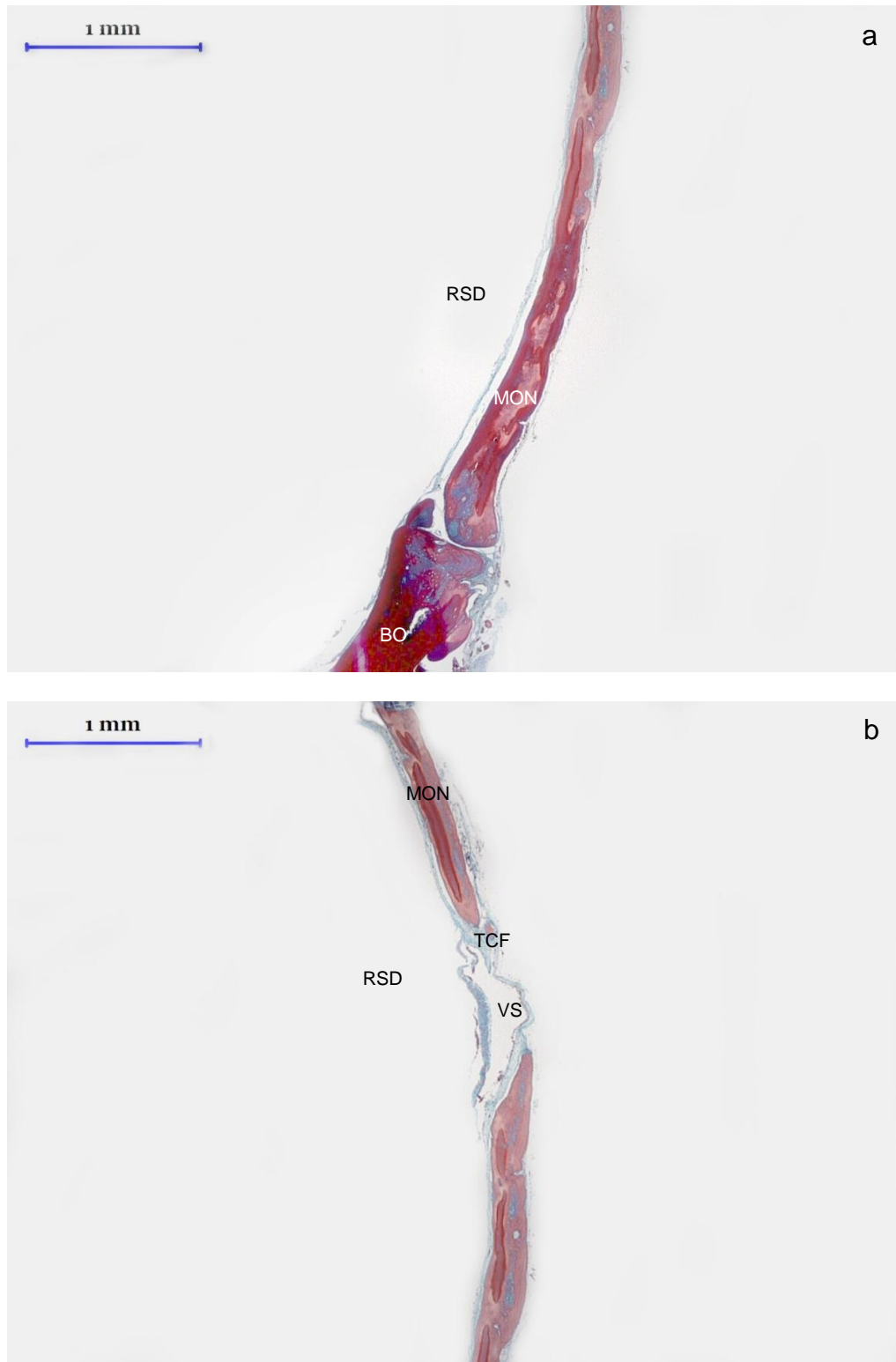


Figura 56: GFRS 120 dias – (a) e (b) – borda óssea (BO) e matriz osteóide neoformada (MON) ao longo do defeito. Presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) apenas na região central do defeito. Vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito - (TMG).

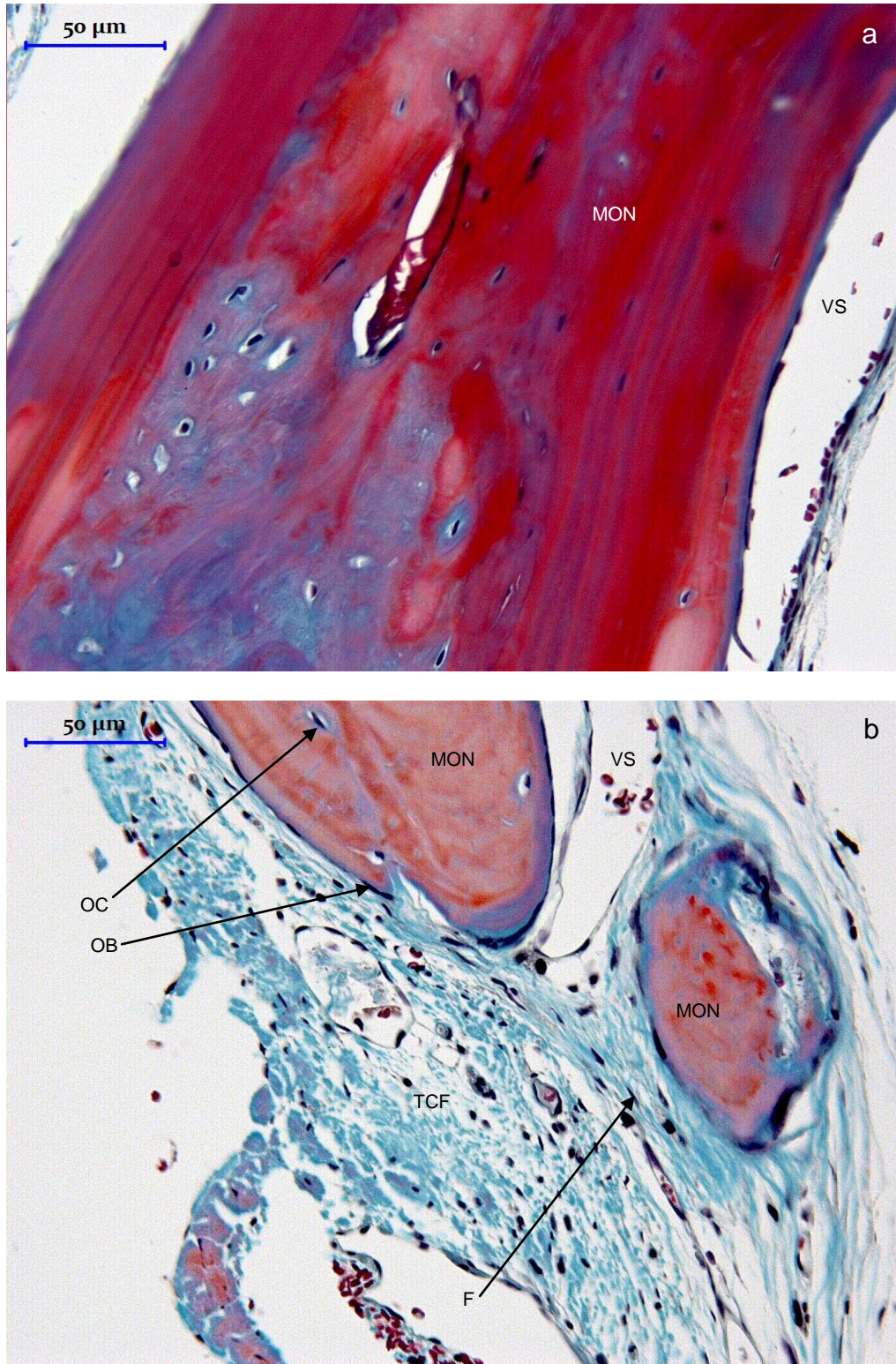


Figura 57: GFRS 120 dias – (a) e (b) – matriz osteóide neoformada (MON), osteoblastos (OB) e osteócitos (OC). No tecido conjuntivo fibroso (TCF) observam-se vasos sanguíneos (VS) e fibroblastos (F) - (TMG).



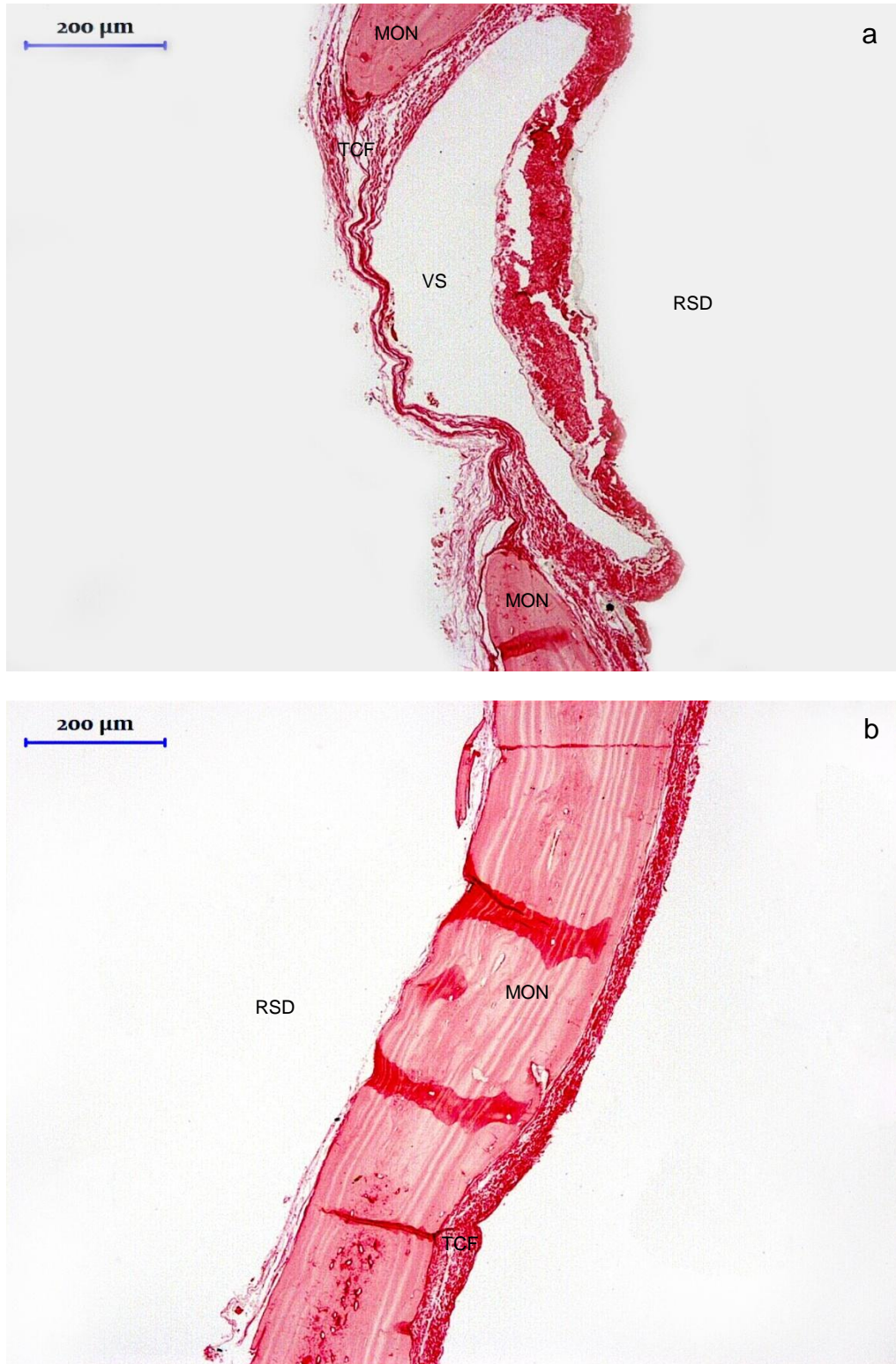


Figura 58: GFRS 120 dias – (a) e (b) – presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) principalmente na região central do defeito. Vaso sanguíneo (VS) no centro do defeito. Matriz osteóide neoformada (MON) - (PIFG).

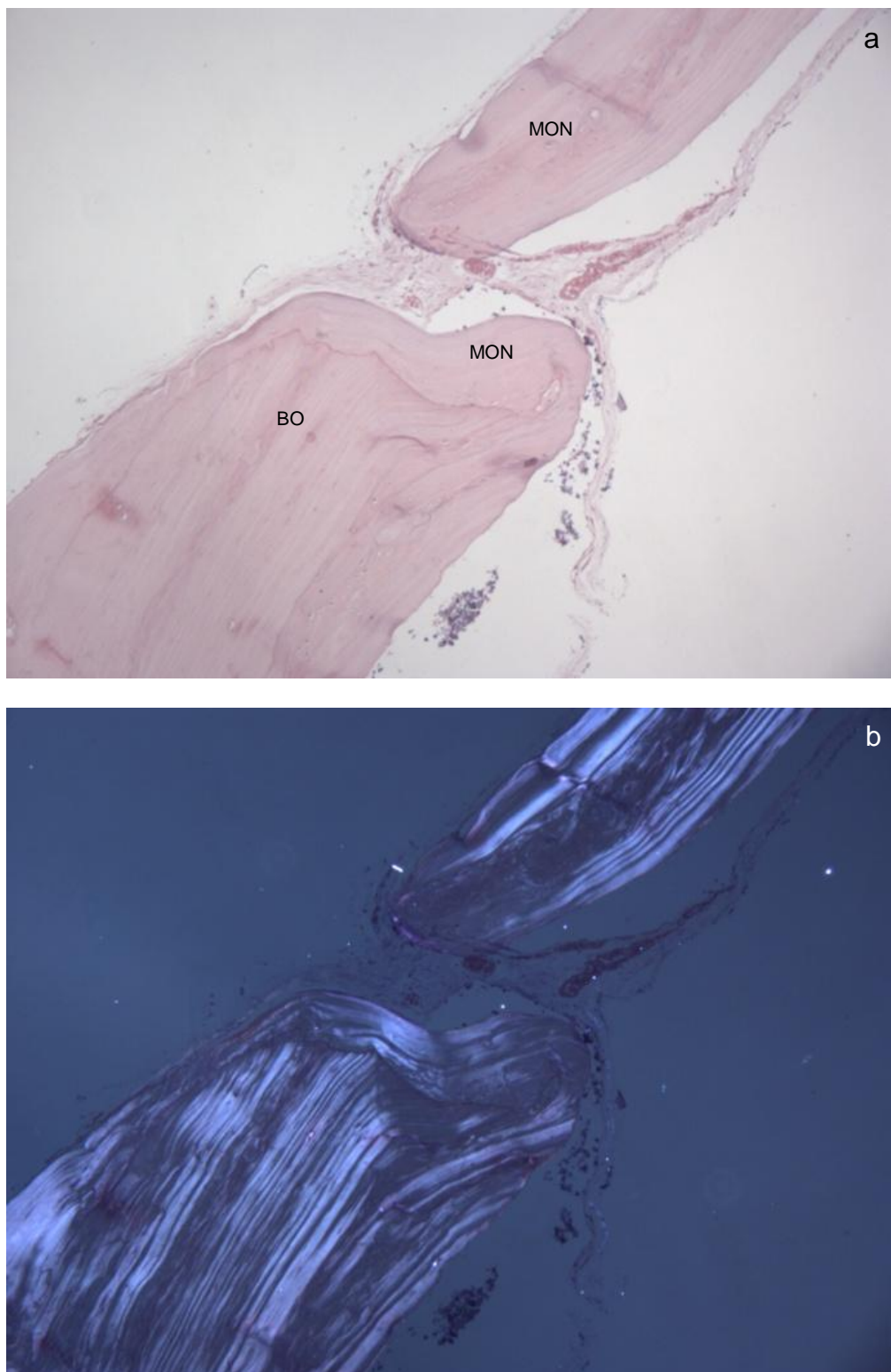


Figura 59: GFRS 120 dias – (a) – representa região de borda óssea (BO) com matriz osteóide neoformada (MON) justaposta (HE) e (b) representa a mesma região, obtida por microscopia de polarização em que é observado aspecto lamelar na região de matriz osteóide neoformada.

#### **5.1.4 Grupo Hidroxiapatita Associado à Fibrina com Administração de Ranelato de Estrôncio (GHAFRS)**

Em todos os pontos biológicos, foi observada matriz osteóide neoformada reparativa nas contiguidades das bordas ósseas do defeito (Figuras 60a, 64a, 66a, 66b). Aos 120 dias, notou-se que a distribuição da matriz osteóide em direção ao biomaterial ocorreu de forma centrípeta, porém não foi observada, na região central do defeito, coalescência entre os focos de neoformação osteóide, formados nas proximidades de algumas microesferas. Osteoblastos permearam o biomaterial, nas proximidades da sua periferia, e foi notada interligação de matriz osteóide com formação de pequenas pontes na região mais periférica do biomaterial (Figuras 67a, 67b).

Em todos os pontos biológicos, o biomaterial apresentou-se em múltiplas camadas (em média, quatro), e a maioria das microesferas encontrava-se sem fragmentação perceptível (Figuras 61a, 63a e 66a).

Aos 15 dias, o estroma apresentou-se edemaciado e com neoformação vascular acentuada (Figuras 61a, 62a e 62b). Nos demais pontos biológicos, não foi observada neoformação vascular, porém houve a permanência dos espaços vasculares. Aos 45 dias, o edema apresentou-se menos intenso, e aos 120 dias não estava presente (Figura 63a). No ponto biológico de 15 dias, o tecido conjuntivo apresentou-se do tipo frouxo, com depósito de fibras colágenas pouco organizadas e com densidade um pouco maior nas proximidades das microesferas. Notou-se, também, início de formação de septos fibrosos (Figuras 61a e 61b). Aos 45 dias, a maioria das microesferas encontrava-se com cápsula delgada e, no seu interior, havia células fusiformes e mesenquimais e maior quantidade de finos septos em comparação com o ponto biológico anterior (Figura 64b). Aos 120 dias, o estroma apresentou característica de estabilidade, com morfologia dos septos fibrosos com espessura delgada e o padrão dos vasos sanguíneos semelhante ao ponto biológico anterior (Figuras 67b e 68b). Compondo esse tecido, em todos os pontos biológicos, observou-se a presença de muitas células fusiformes, possivelmente fibroblastos, e de outras células mesenquimais, aos 45 e 120 dias, no interior do biomaterial (Figuras 62b e 67a).

Aos 15 dias, não foi encontrada reação granulomatosa intimamente em contato com o biomaterial, e o estroma apresentou infiltrado mononuclear difuso (Figura 62b). Aos 45 dias, observou-se maior fragmentação do biomaterial, e a inflamação mostrou-se moderada com reação granulomatosa mais intensa, adentrando as microesferas (Figuras 65b). Foi observada, ainda, neste ponto biológico e em toda a extensão do defeito, reação inflamatória crônica linfoplasmocitária, com predomínio linfocitário (Figura 65b). Aos 120 dias, observou-se infiltrado inflamatório discreto e difuso (Figura 68b).



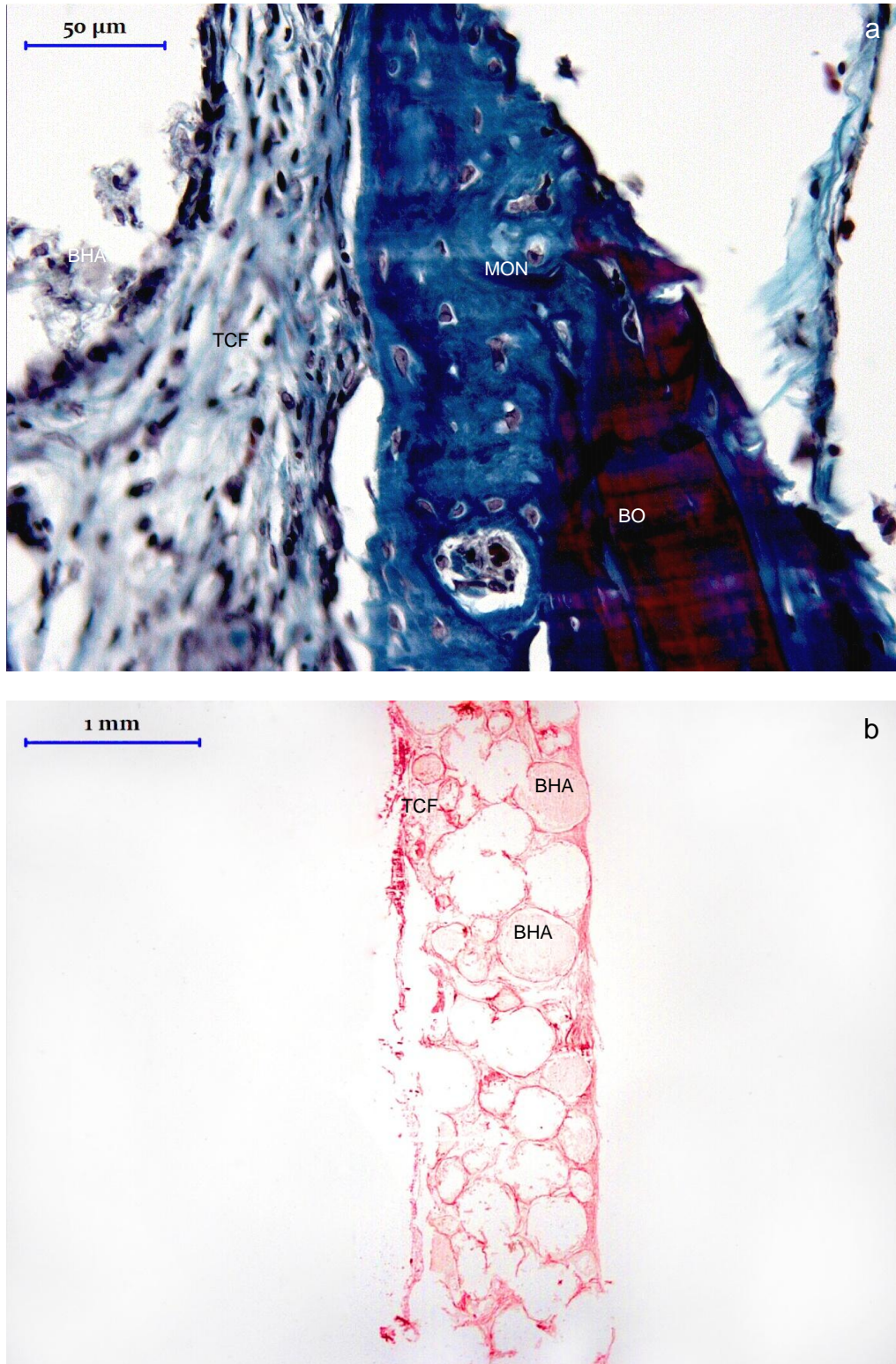


Figura 60: GHAFRS 15 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO), presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento do defeito ósseo com o BHA - (TMG), (PIFG).



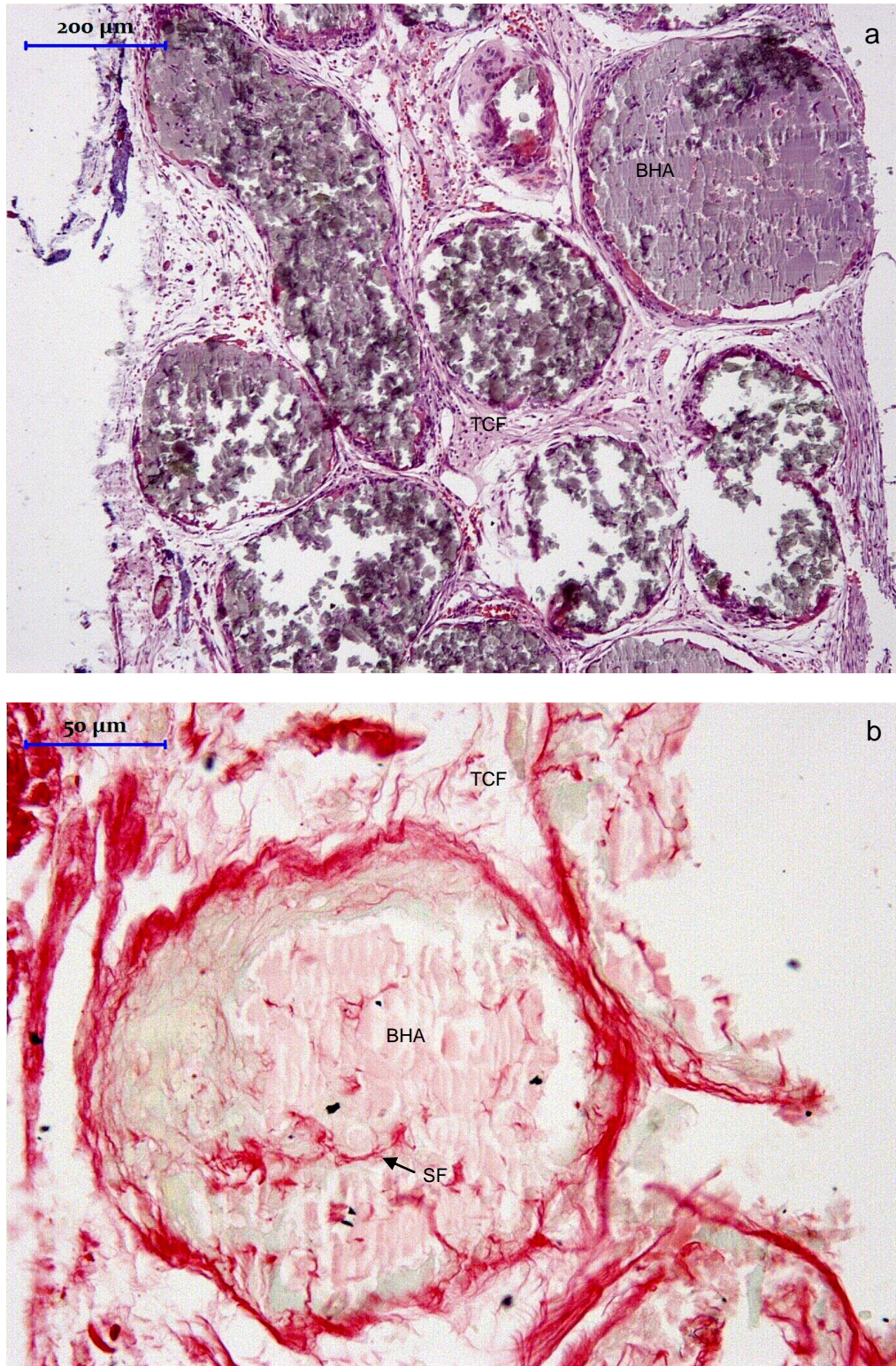


Figura 61: GHAFRS 15 dias – (a) e (b) – tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA), com início de formação dos septos fibrosos (SF) e preenchimento dos BHA - (HE), (PIFG).



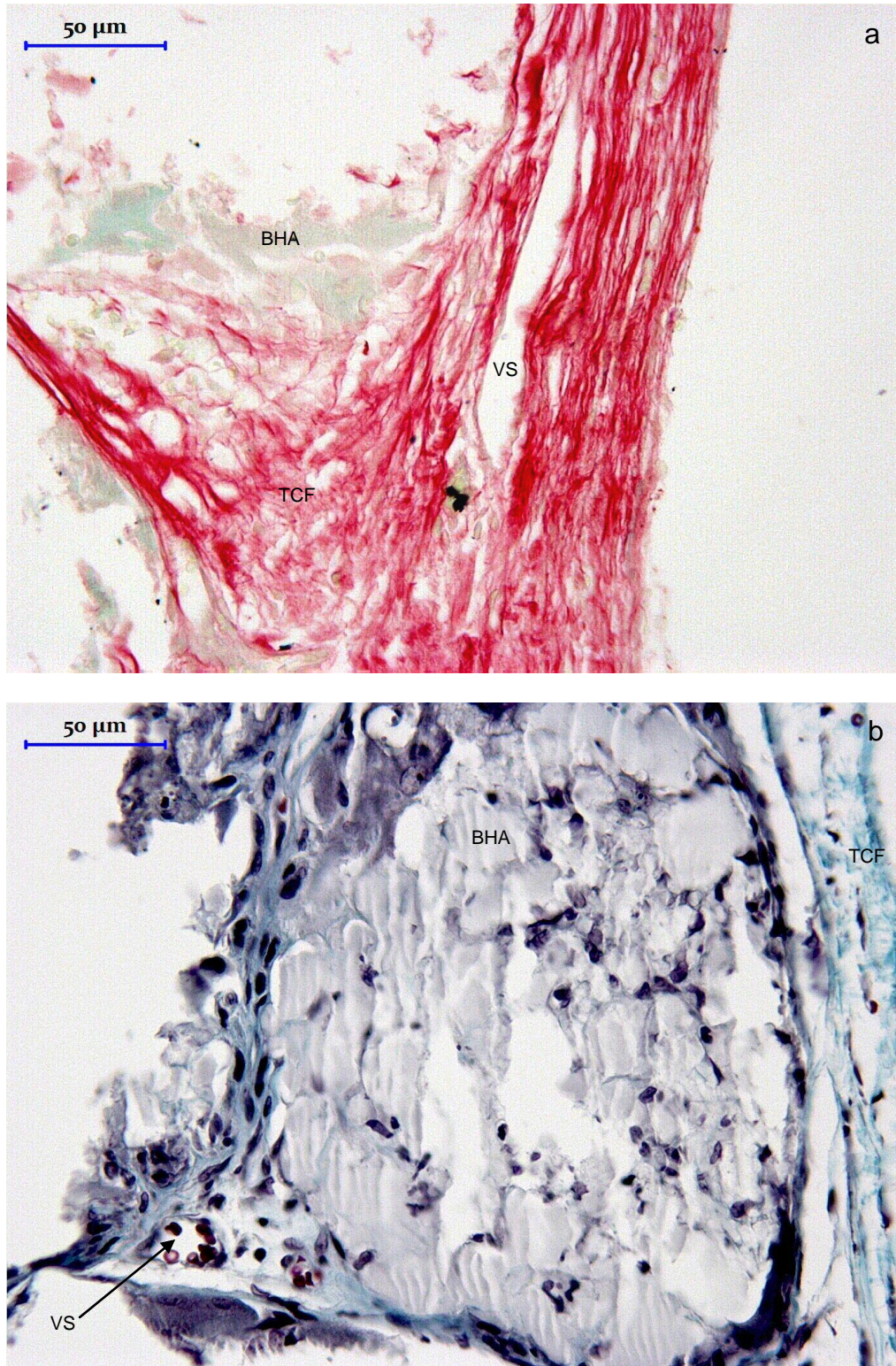


Figura 62: GHAFRS 15 dias – (a) e (b) – estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF), vasos sanguíneos (VS), biomaterial de HA (BHA) - (PIFG), (TMG).



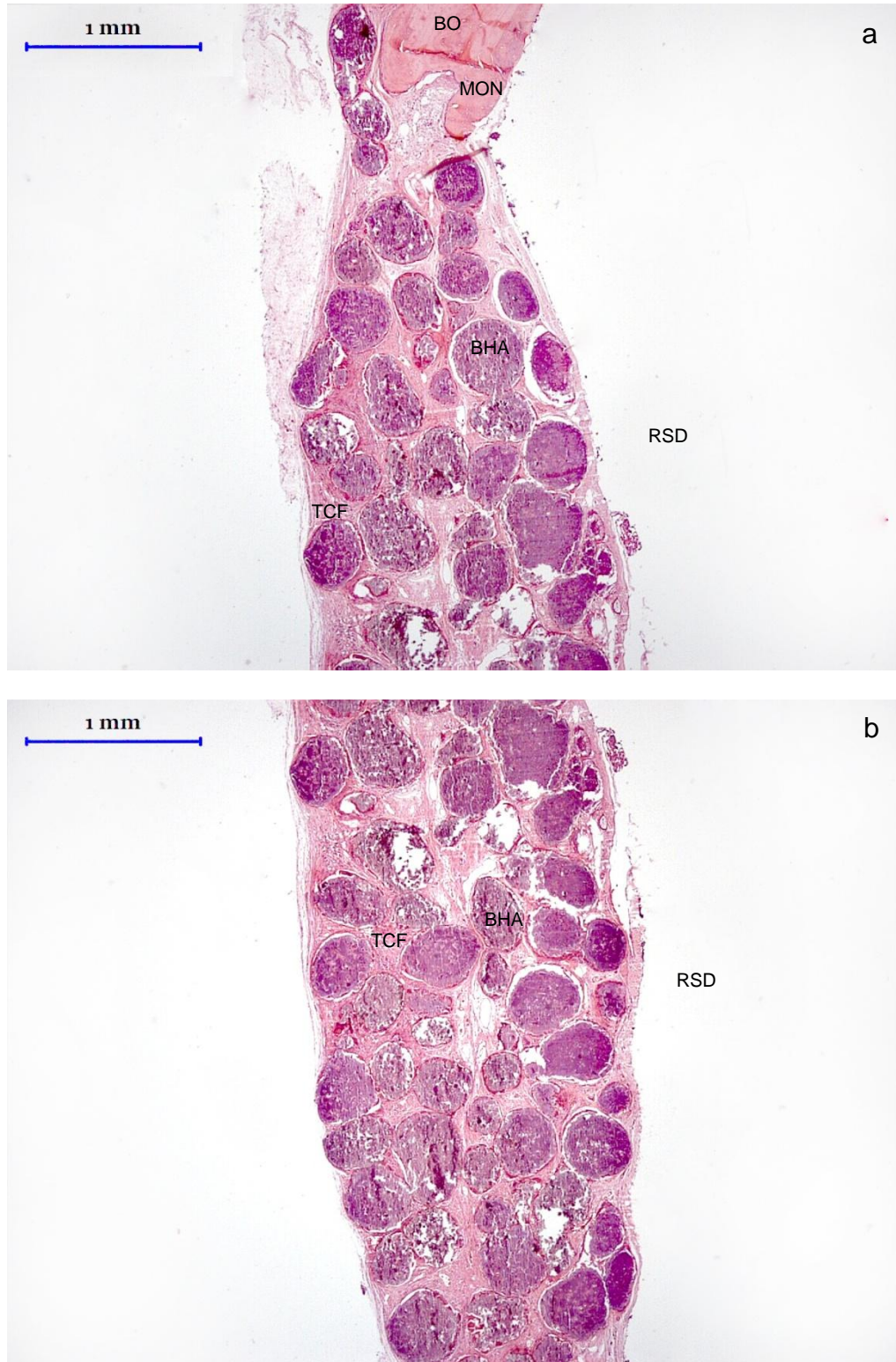


Figura 63: GHAFRS 45 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO), presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento do defeito ósseo pelo BHA - (HE).



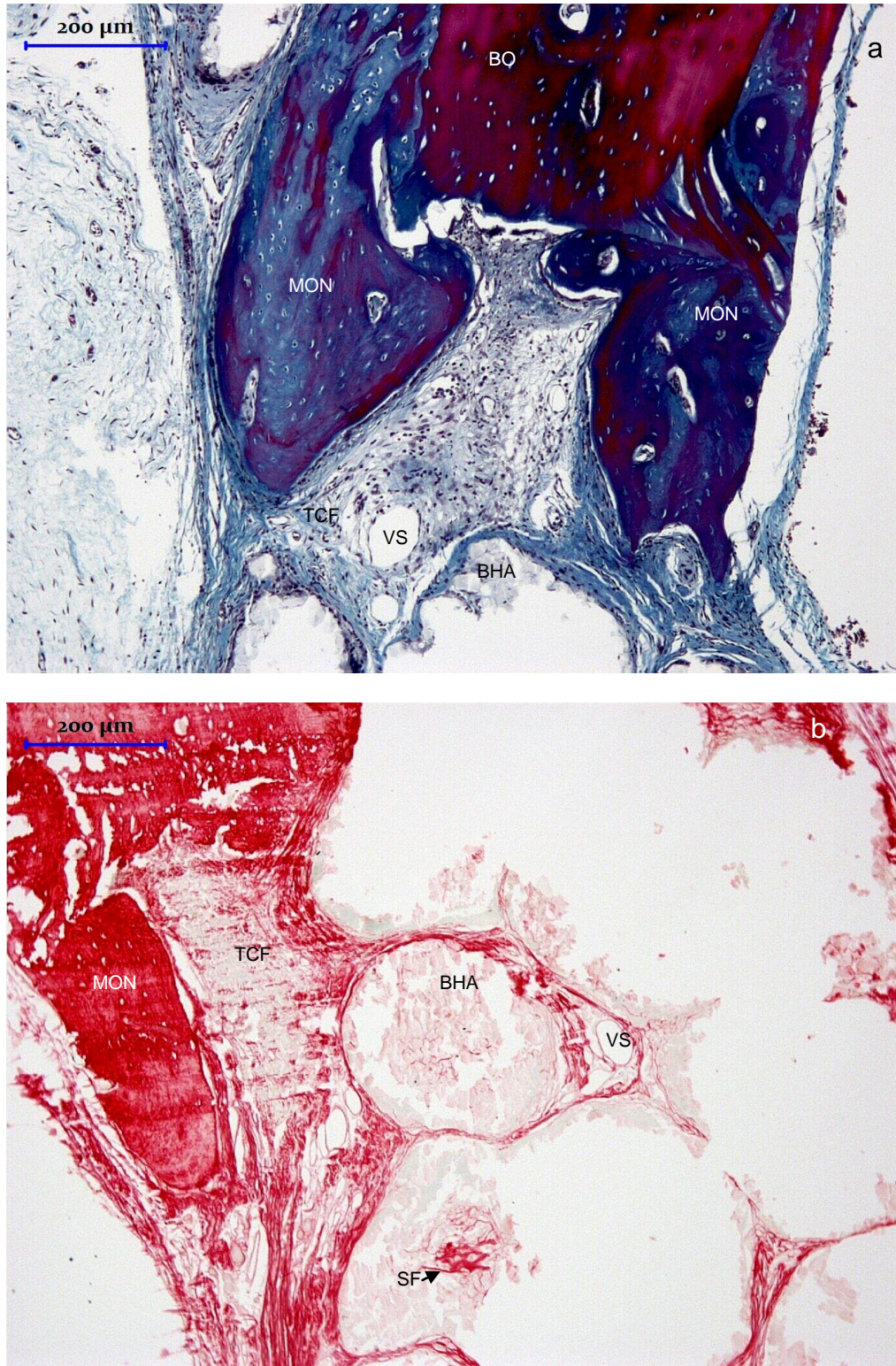


Figura 64: GHAFRS 45 dias – (a) e (b) – presença de matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO), presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio ao biomaterial de HA (BHA), septos fibrosos (SF) no interior do BHA, vasos sanguíneos (VS) – (TMG), (PIFG).



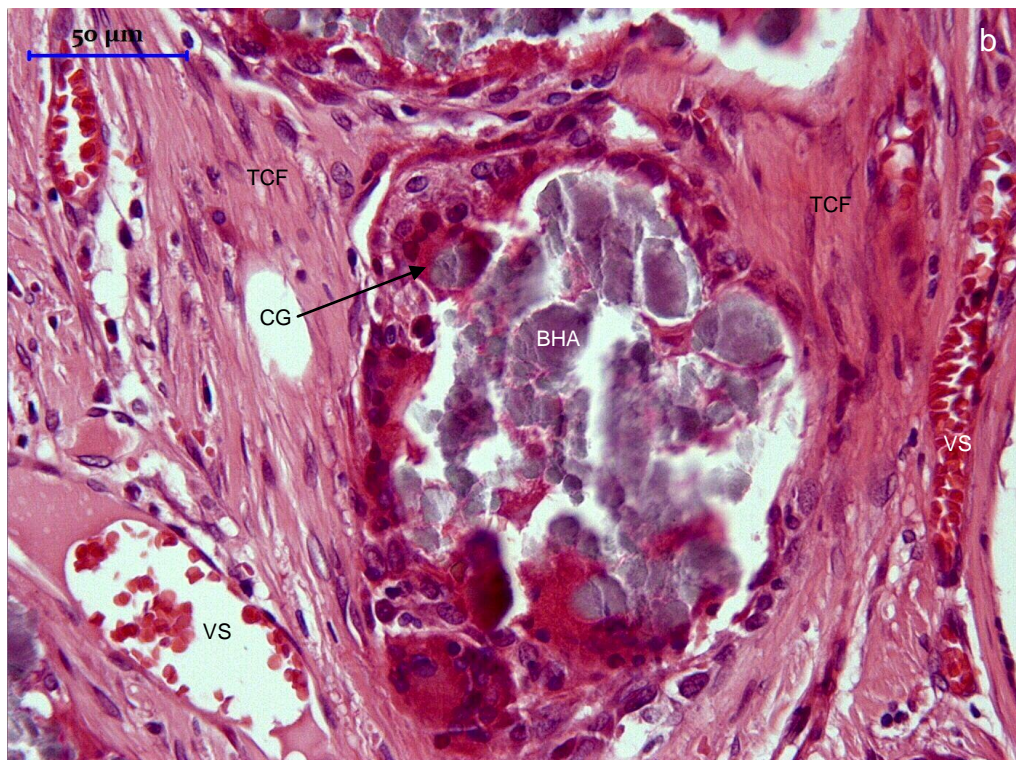
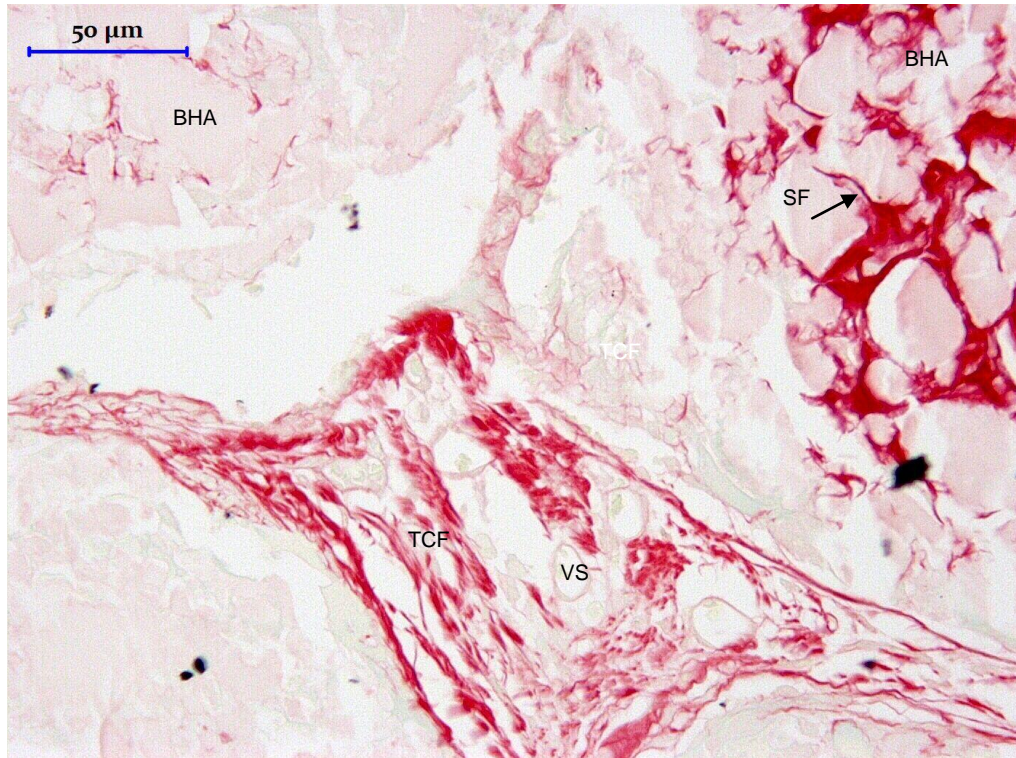


Figura 65: GHAFRS 45 dias – (a) e (b) – estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF), septos fibrosos (SF) no interior do BHA, vasos sanguíneos (VS), biomaterial de HA (BHA) e presença de células gigantes (CG) englobando fragmentos do BHA - (PIFG), (HE).



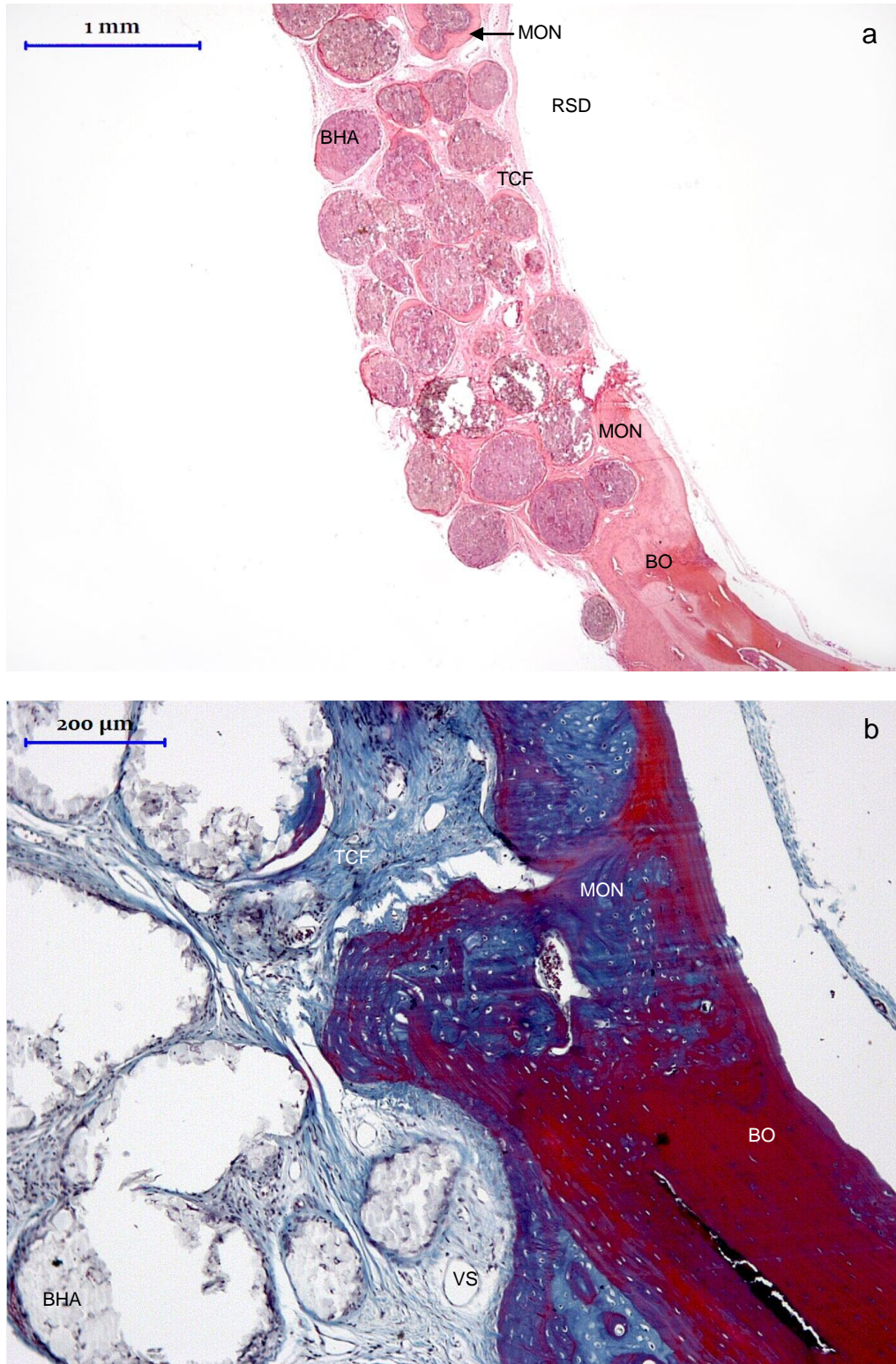


Figura 66: GHAFRS 120 dias – (a) e (b) – matriz osteóide neoformada (MON) nas proximidades da borda óssea (BO) e justaposta ao biomaterial de HA (BHA). Presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento do defeito ósseo com o BHA, vasos sanguíneos (VS) - (HE), (TMG).



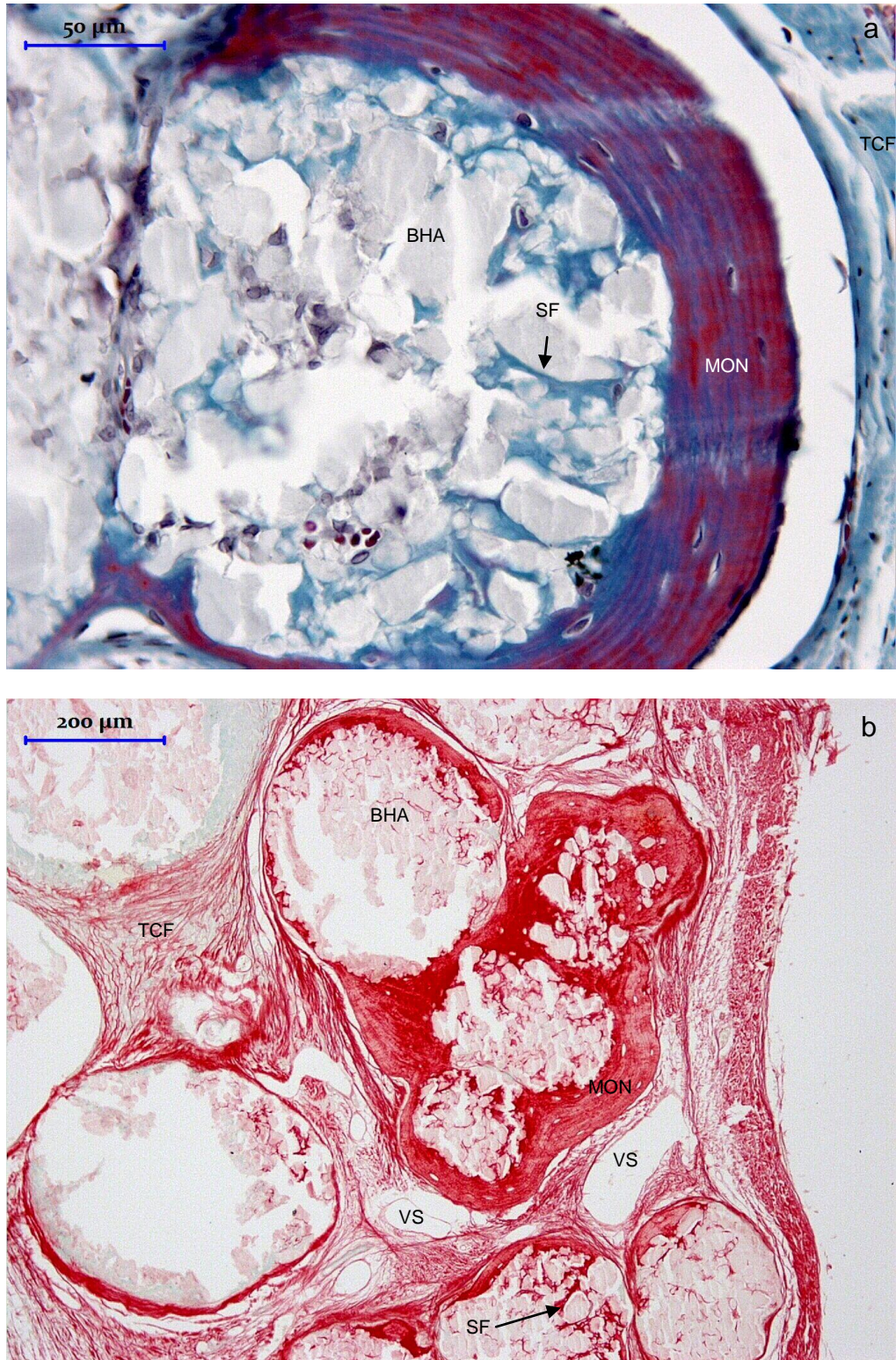


Figura 67: GHAFRS 120 dias – (a) e (b) – matriz osteóide neoformada (MON) justaposta ao biomaterial de HA (BHA). Presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) com septos fibrosos (SF) e preenchimento do defeito ósseo com o BHA. Estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF) e vasos sanguíneos (VS) - (TMG), (PIFG).



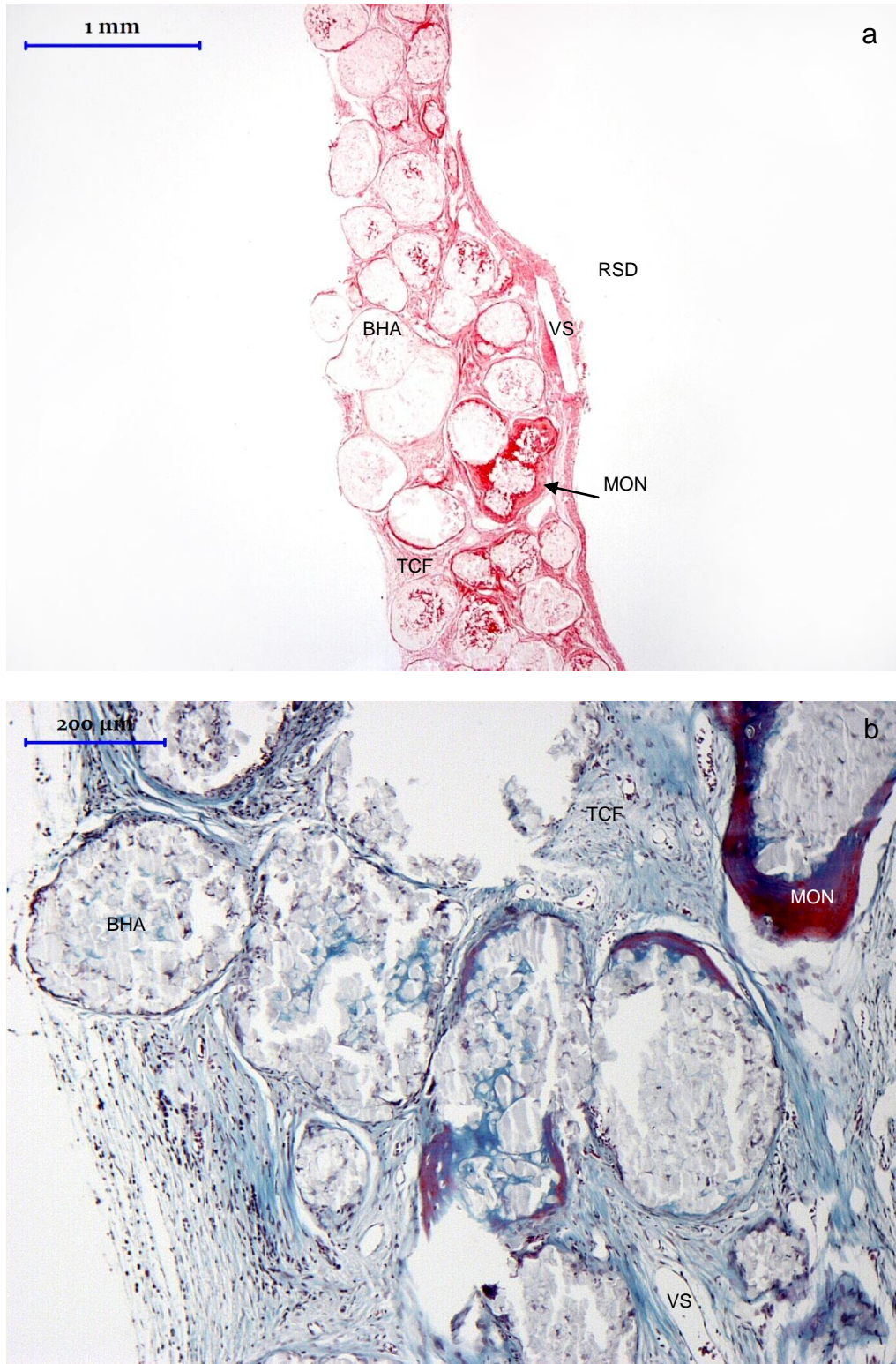


Figura 68: GHAFRS 120 dias – (a) e (b) – matriz osteóide neoformada (MON) justaposta ao biomaterial de HA (BHA). Presença de tecido conjuntivo fibroso de permeio ao biomaterial de HA (BHA) e preenchimento dos BHA. Estroma com tecido conjuntivo fibroso (TCF) e vasos sanguíneos (VS) - (PIFG), (TMG).

## 5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 5.2.1 Percentagem de matriz osteóide neoformada

Iniciou-se o estudo pela avaliação do atendimento de suposições por parte dos dados que embasam a análise de variância. Este estudo foi conduzido com apoio do software LAB do sistema SAS e será comentado em seguida.

```
D.DADOS_IB
OBSERVATIONS (N=72): all
ANALYSIS: Multiple regression and ANOVA
RESPONSE: neoformada
FACTORS: grupos tempo
CLASSES: grupos tempo
Model: GRUPOS, TEMPO, GRUPOS*TEMPO
USER-EXCLUDED OBSERVATIONS: none
ASSUMPTIONS VIOLATED:
  Response scaling
  Outliers
  Constant variance
  Influential observations
```

O relatório dos dados inicialmente avaliados revelou indícios de violação de quatro suposições que embasam a análise de variância: adequação da variável de resposta, a ausência de *outliers*, a homogeneidade de variâncias e a ausência de observações excessivamente influentes.

Diante das violações percebidas, deve-se avaliar a adoção de medidas saneadoras, e a primeira atividade foi a avaliação da existência de dados discrepantes. Estes são dados com valores muito diferentes daqueles esperados, e a sua presença pode conduzir a problemas graves na aplicação da análise de variância.



Potential outlier observations: Prob < 0.05

Observation number	Matriz Óssea Neoformada	grupos	Tempo (dias)	Studentized residual without current obs	P-value for outlier test
38	91.74	GCRS	45	6.39711	0.000005
63	23.97	GCRS	120	-3.96747	0.017768

#### Outliers

2 observations qualify as outliers by exceeding a studentized residual value of +/-3.631567 with an overall significance level less than 0.05. Examine the data for correctness; consider a curvilinear model, a transformation, or deletion of the observation.

Duas observações foram qualificadas como potencialmente discrepantes: a observação de número 38 e a observação de número 63, ambas observadas no tratamento estatístico do GCRS, uma no tempo de 45 dias e outra no tempo de 120 dias.

O resíduo estudentizado (*studentized residual without current obs*) apresenta, em dados não problemáticos, valores entre -2 e +2. O primeiro valor apresenta um resíduo estudentizado superior a 6, o que apresenta uma certeza muito grande de se tratar de um valor obtido em condição de erro. Valores menores que -3 também têm grande probabilidade de serem discrepantes.

A observação 38, por ter resíduo estudentizado maior que 2, tem probabilidade de ser muito maior que os demais dados, o que de fato se verifica, pois no mesmo tratamento e tempo, os outros dois valores são 26,42 e 39,76 – valores muito menores que o 91,74.

A observação 63 tem resíduo estudentizado muito menor que -2, havendo indícios, portanto, de que este número seja menor que os outros dados obtidos, e, quando se observam as três repetições, veem-se os dados 64,43 e 69,63, que foram muito maiores que o 23,97, tido como discrepante. Deve-se, portanto, excluir esses dados e avaliar a eficácia da adoção desta medida saneadora com um novo estudo de suposições, apresentado em seguida.

```

D.DADOS_IB
OBSERVATIONS (N=72): all
  70 observations were used in the analysis
  2 outliers were excluded by the user
ANALYSIS: Multiple regression and ANOVA
RESPONSE: neoformada
FACTORS: grupos tempo
CLASSES: grupos tempo
Model: GRUPOS, TEMPO, GRUPOS*TEMPO
USER-EXCLUDED OBSERVATIONS
  Outliers: #38, #63
ASSUMPTIONS VIOLATED:
  Response scaling
  Outliers
  Constant variance
  Influential observations

```

A exclusão dos dados não foi suficiente para eliminar os problemas, e, diante desta constatação, resolveu-se aplicar a técnica de transformação de dados, por meio da técnica de Box-Cox<sup>1</sup>, que procura por uma potência que maximiza a probabilidade. O resultado da aplicação da técnica é apresentado em seguida.

```

+LAB: Optimal Power Transformation-----
--+
| Specify powers: [ -1 TO 1 BY 0.1 ]
|
|                                     Recalculate
|                                     Power
|                                     Optimal: 0.2
|                                     To be used: [ 0.2 ]
|
+-----
--+
Optimal Power Transformation

The optimal power transformation analysis suggests that the power 0.2
of neoformada may be more easily modeled.

```

A técnica sugere a aplicação da potência 0,2 para transformar os dados preliminarmente à aplicação da análise de variância. A eficácia da transformação de dados é avaliada através de um novo estudo de suposições.

<sup>1</sup> Box, George E. P.; Cox, D. R.(1964). An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, Series B **26** (2): 211–252. Disponível em: JSTOR 2984418. MR192611. Acesso em: 7 nov. 2011.

```

D.DADOS_IB
OBSERVATIONS (N=72): all
  70 observations were used in the analysis
  2 outliers were excluded by the user
ANALYSIS: Multiple regression and ANOVA
RESPONSE: neoformada**0.2
FACTORS: grupos tempo
CLASSES: grupos tempo
Model: GRUPOS, TEMPO, GRUPOS*TEMPO
USER-EXCLUDED OBSERVATIONS
  Outliers: #38, #63
ASSUMPTIONS VIOLATED:
  Influential observations

```

Restou apenas a violação da suposição de ausência de valores excessivamente influentes, os quais são apresentados em seguida para que se proceda a avaliação do problema.

Potential influential observations: Abs(Dffits) > 2

Observation number	Original neoformada variable	Standard influence grupos (dias)	Tempo on predicted value	Leverage	
10	1.38845	GHAF	15	2.15264	0.33333
11	0.94156	GHAF	15	-2.53203	0.33333
44	1.88786	GFRS	45	-2.36921	0.33333
71	1.34059	GHAFRS	120	-2.50968	0.33333

Influential Observations

4 observations qualify as influential by exceeding a DFFITS statistic value of +/- 2. The results of the analysis may depend too much upon these observations.

Uma observação é considerada excessivamente influente quando ela exerce excessiva influência no resultado, e a estatística que identifica este problema é a influência padronizada sobre o valor predito (*standard influence on predicted value*) que, a exemplo do resíduo estudentizado, também se situa entre -2 e +2 para dados que não exerçam excessiva influência.

Quatro dados são identificados como excessivamente influentes, mas o valor da estatística DFFITS é muito pouco superior a 2 em termos absolutos; por isso, não se recomenda adotar medidas saneadoras em relação a estes dados,

desconsiderando-se os indícios de se tratarem de dados que tragam problemas para a análise de variância (Tabela 5).

Tabela 5: Análise de variância para os dados de percentagem de matriz osteóide neoformada.

Causa de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor F	Valor-p
Grupos	7	93,12375972	13,30339425	137,94	<0,0001
Tempo	2	8,19424446	4,09712223	42,48	<0,0001
Grupos*Tempo	14	3,16654671	0,22618191	2,35	0,0152
Resíduo	46	4,4363791	0,0964430		
Total corrigido	69	108,9209300			

$R^2$ : 0,9593 – CV:14,14

Inicia-se a interpretação do quadro de análise de variância pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), que fornece uma indicação de uma excelente aderência dos dados ao modelo, pois mais de 95% da variação observada nas quantidades de percentagem de matriz osteóide neoformada se associam a efeitos contemplados no modelo, havendo uma percentagem muito pequena de erro experimental.

O coeficiente de variação de 14,14 também fornece indícios de uma excelente relação entre a média e o desvio padrão.

Por fim, parte-se para os testes de hipóteses, que fornecem fortes indícios ( $p < 0,01$ ) da existência de diferenças entre as médias verdadeiras da variável de resposta nos diferentes níveis dos fatores principais (Grupos e Tempo).

Também são observados indícios ( $p < 0,05$ ) da existência de efeito significativo da interação entre os dois fatores principais sobre a variável de resposta.

Nessas condições, deve-se desprezar a existência de indícios de existência de efeitos principais significativos e aplicar o teste de Tukey para a comparação das médias das combinações de grupos e tempos. Para isso são comparadas as médias de tratamentos dentro dos tempos e as médias de tempos independentemente dentro de cada tratamento (Tabela 6).

Tabela 6: Médias (desvios padrão) da porcentagem de matriz osteóide neoformada nos níveis dos fatores grupo e tempo e teste de Tukey para comparação de médias com nível de significância de 5%.

Grupos	Tempo		
	15	45	120
GC	13,367 (0,075) a A	16,393 (0,495) a A	22,353 (0,530) ab A
GCRS	33,710 (1,741) a A	33,090 (9,433) a A	67,030 (3,677) a A
GF	16,260 (4,630) a A	17,237 (0,025) a A	23,810 (0,030) ab A
GFRS	42,467 (0,710) a A	44,690 (19,092) a A	56,180 (14,283) a A
GHA	1,250 (0,010) c C	1,597 (0,035) d B	3,910 (0,170) d A
GHAF	2,827 (2,220) b A	3,197 (0,115) c A	5,430 (1,497) cd A
GHAFRS	3,547 (0,372) b B	6,247 (0,035) b AB	10,950 (6,489) bc A
GHARS	0,973 (0,230) c B	3,327 (0,438) c A	5,883 (1,960) cd A

Letras minúsculas compararam grupos dentro dos tempos (comparação na coluna) e letras maiúsculas comparam tempos dentro de um mesmo grupo (comparação nas linhas).

A interpretação da Tabela 6 é relativamente complexa, pois representa a influência das combinações dos níveis de grupos e tempo sobre a variável de resposta. Tal análise é necessária quando os efeitos de um e outro fator se coadunam em resultados dependentes da combinação e não, simplesmente, dos efeitos de um e de outro fator de forma independente.

Não se pode afirmar que o tempo tenha efeito igual em todos os grupos. A análise do tempo é feita através da comparação dentro de cada linha, e as médias são comparadas estatisticamente pelas letras maiúsculas.

Observa-se, na linha do grupo GC, que todas as letras maiúsculas são iguais (A), indicando que o teste estatístico não é eficaz para apoiar a decisão de que o tempo é um fator no qual são observadas médias diferentes de porcentagem de matriz osteóide. O mesmo se observa nos tratamentos GCRS, GF, GFRS e GHAF.

Isso significa que, nesses grupos, não há indícios de que o tempo se associe a diferenças das médias, conforme ilustra o Gráfico 3.



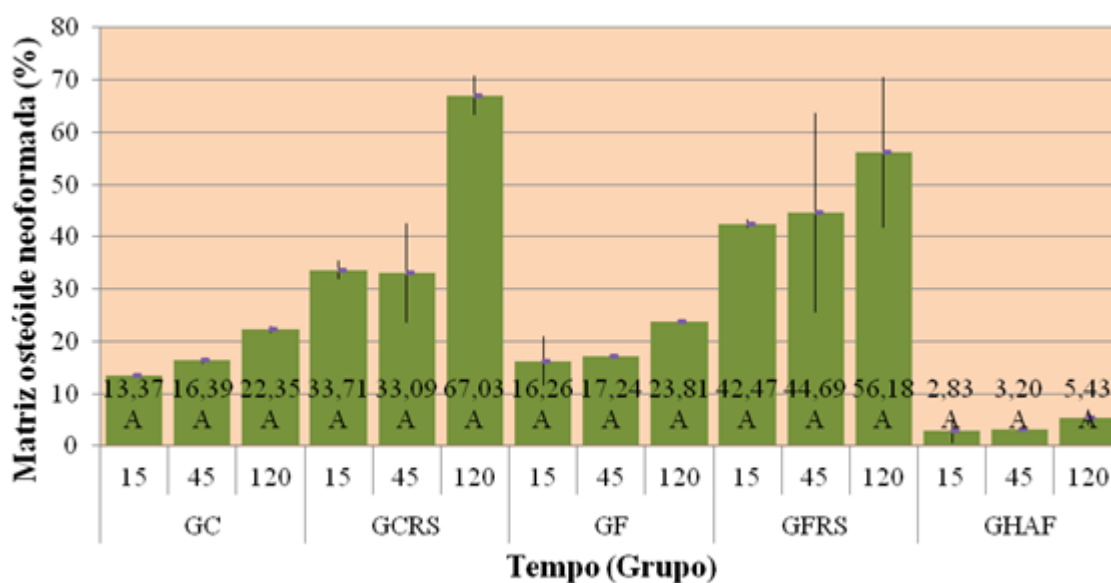


Gráfico 3: Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para comparação das médias de matriz osteóide neoformada nos níveis de tempo dentro de cada grupo. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%.

Por meio do Gráfico 3, podem-se observar informações diferentes daquelas observadas na estatística, pois há alguns grupos cujas médias de tempo parecem diferir. No grupo GC, parecem ocorreram diferenças entre todas as médias de forma que a matriz osteóide neoformada foi aumentando ao longo do tempo. No grupo GCRS, a média no tempo 120 é maior do que as médias dos demais tempos, o mesmo ocorrendo no grupo GFRS.

Nos demais grupos (GFRS e GHAF) de fato não houve diferença entre as médias em função do tempo.

Nessa situação, quando não se tem diferença estatística significativa, mas há indícios visuais (gráficos) de diferenças, cabe avaliar a validade em se argumentar a existência de diferenças, não com respaldo da estatística, mas sim com embasamento conceitual, diferente dos próximos grupos nos quais a estatística subsidia a conclusão da existência de efeito significativo.

Diferentemente dos grupos anteriores, no grupo GHA há indícios de diferenças entre todos os tempos, de forma que a média foi significativamente maior no tempo de 120 dias em relação ao tempo de 45 dias, e a média deste, por sua

vez, foi significativamente maior que a do tempo 15 dias, conforme ilustra o Gráfico 4.

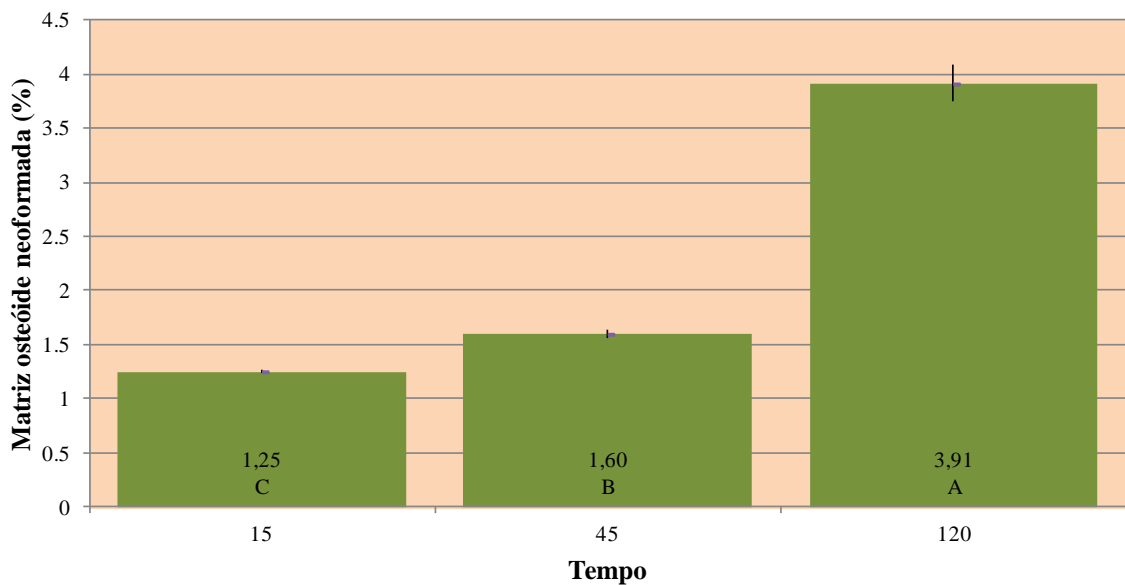


Gráfico 4: Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para comparação das médias de matriz osteóide neoformada nos níveis de tempo no grupo GHA. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%.

O Gráfico 4 corrobora os achados do teste estatístico evidenciando o aumento da porcentagem de matriz osteóide neoformada ao longo do tempo.

Já no grupo GHAFRS somente há indícios de que a média do tempo 120 dias é significativamente maior do que a de 15 dias, não havendo indícios de diferenças entre o tempo de 45 dias e os demais tempos.

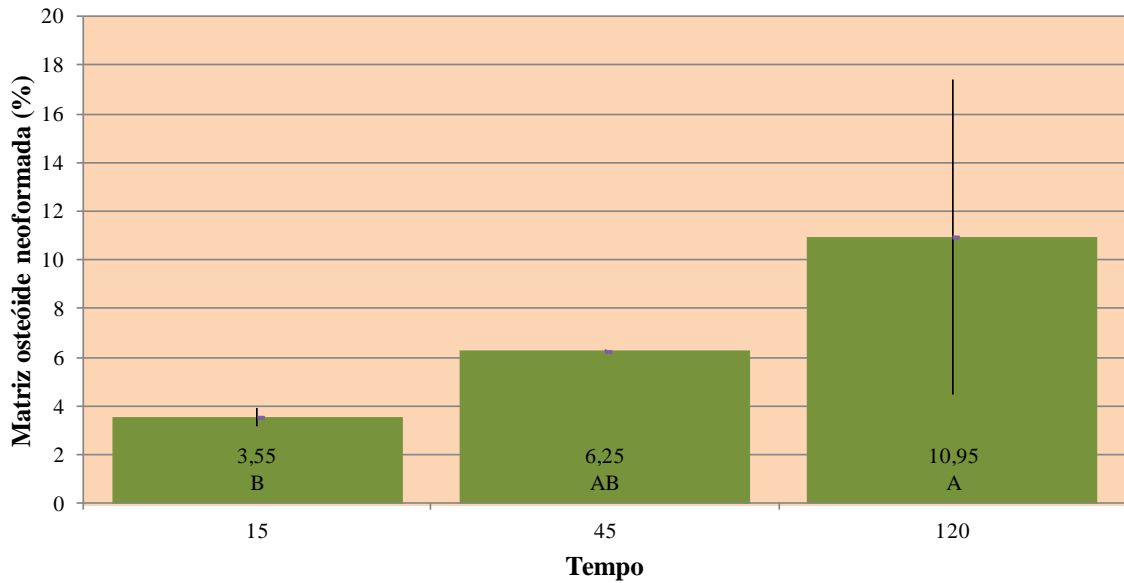


Gráfico 5: Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para comparação das médias de matriz osteóide neoformada nos níveis de tempo no grupo GHAFRS. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%.

Por fim, no grupo GHARS há indícios de que a média do tempo 15 dias é significativamente menor que a dos demais tempos (Gráfico 6).

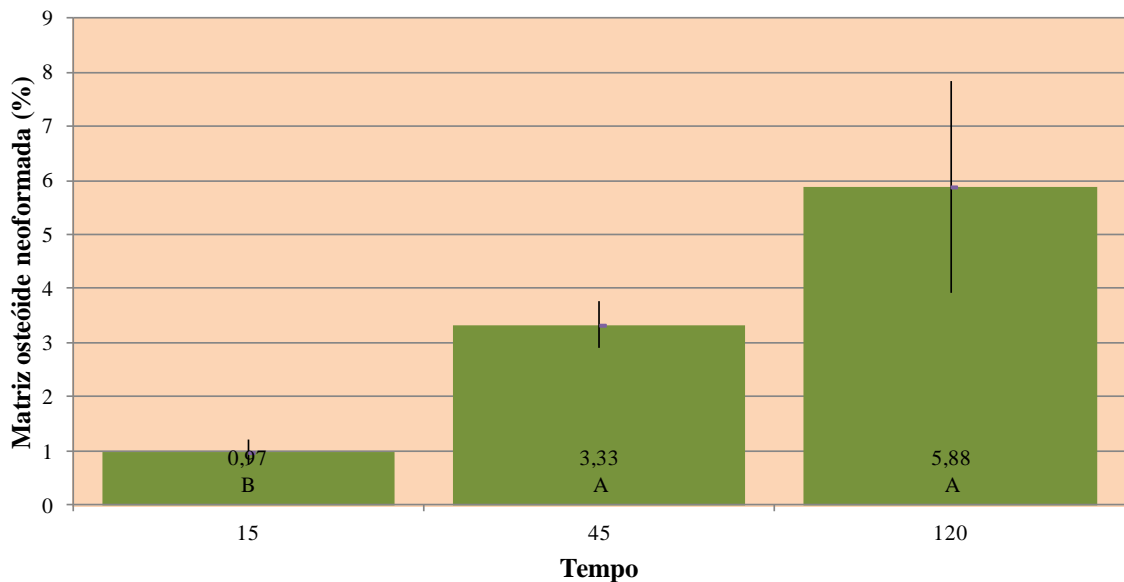


Gráfico 6: Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para comparação das médias de matriz osteóide neoformada nos níveis de tempo no grupo GHARS. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%.

Neste caso, também parece haver uma dissonância entre a análise gráfica e a análise estatística, pois o tempo de 120 dias parece ter média maior que o tempo de 45 dias. Entretanto, a variabilidade representada no gráfico pela barra de erros do tempo de 120 dias é bastante exagerada, não dando suficiente confiança à média deste tempo, fazendo com que a estatística não capte a diferença entre este e o tempo de 45 dias.

Uma vez concluída a análise do efeito do tempo, passa-se a comparar as diferenças entre os grupos, o que deve ser feito pelo fato de terem sido detectados indícios de interação significativa, o que quer dizer que, de acordo com o tempo, os grupos se comportam de maneira diferente.

Iniciando-se pelo tempo de 15 dias, observa-se a formação de três blocos de grupos com médias significativamente diferentes entre si: um bloco com média mais alta formada pelos grupos GC, GCRS, GF e GFRS, em que não há indícios de diferenças entre as médias desses grupos; entretanto, a média é significativamente maior que de todos os demais.

Essas conclusões são obtidas por meio das letras minúsculas apresentadas na primeira coluna de médias, e elas comparam os grupos entre si.

Os grupos GHAF e GHAFRS apresentaram médias significativamente inferiores em relação às do primeiro bloco, entretanto, maiores que as do terceiro bloco, formado pelos grupos GHA e GHARS, estes últimos apresentando as menores médias conforme ilustra o Gráfico 7.

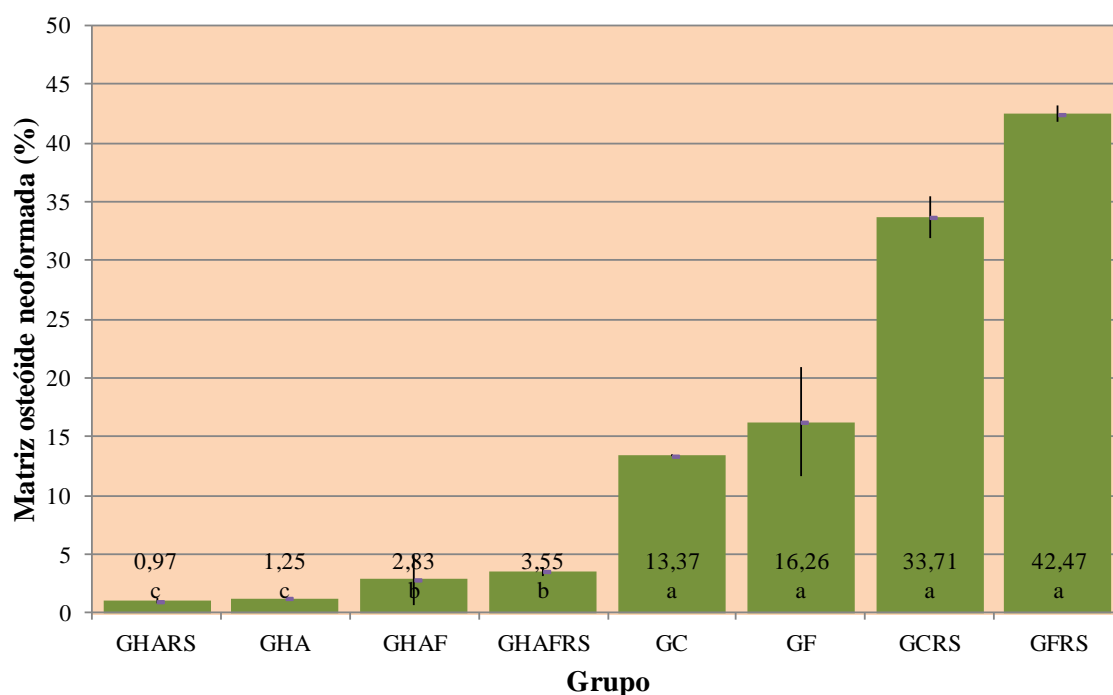


Gráfico 7: Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para comparação das médias de matriz osteóide neoformada nos de grupo no tempo de 15 dias. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%.

O mesmo tipo de comparação é feita no tempo de 45 dias, quando são observados 4 blocos de grupos com médias que diferem significativamente entre si. Um primeiro bloco é similar àquele observado no tempo de 15 dias e congrega os grupos GC, GCRS, GF e GFRS, todos eles com médias significativamente maiores do que a dos demais grupos.

O grupo GHAFRS apresenta, por sua vez, média menor que os grupos do primeiro bloco, porém significativamente maior que a dos demais. Em seguida, os grupos GHAF e GHARS são os que apresentaram média maior que a do grupo GHA, que apresentou média significativamente inferior a todos os demais grupos testados.

Nota-se que, apesar de parecidos, os resultados dos tempos 15 e 45 são diferentes em relação à comparação dos grupos, daí o significado da interação significativa.

Não houve um comportamento único que se repetiu em todos os tempos. As comparações de médias são ilustradas no Gráfico 8.



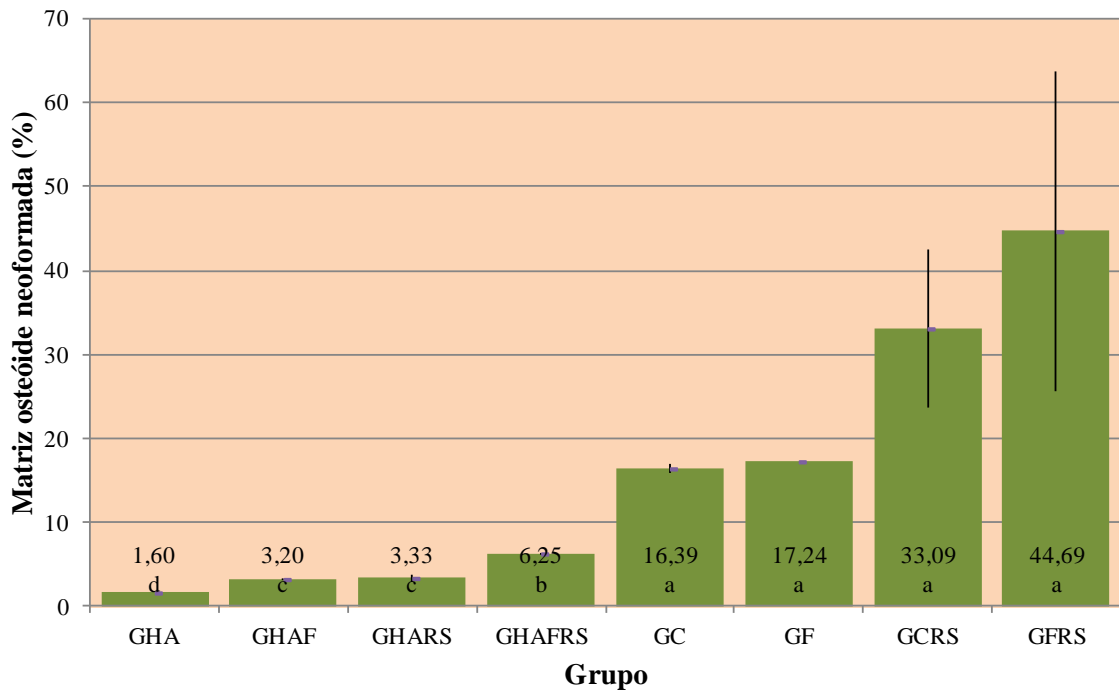


Gráfico 8: Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para comparação das médias de matriz osteóide neoformada nos de grupo no tempo de 45 dias. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%.

Por fim, no tempo de 120 dias foi feita a comparação dos grupos, e, neste caso, não houve formação de blocos com médias diferentes, havendo uma maior suavidade entre as médias dos grupos.

Os grupos GCRS e GFRS foram os que apresentaram maiores médias, mas elas foram significativamente diferentes das médias dos grupos GHA, GHAF, GHAFRS e GHARS.

Os grupos GC e GF, por sua vez, apresentaram médias inferiores às dos grupos GCRS e GFRS, porém, significativamente maiores que a dos grupos GHA, GHAF e GHARS.

O grupo GHAFRS apresentou média superior à do tratamento GHA, e todas essas comparações são ilustradas no Gráfico 9.

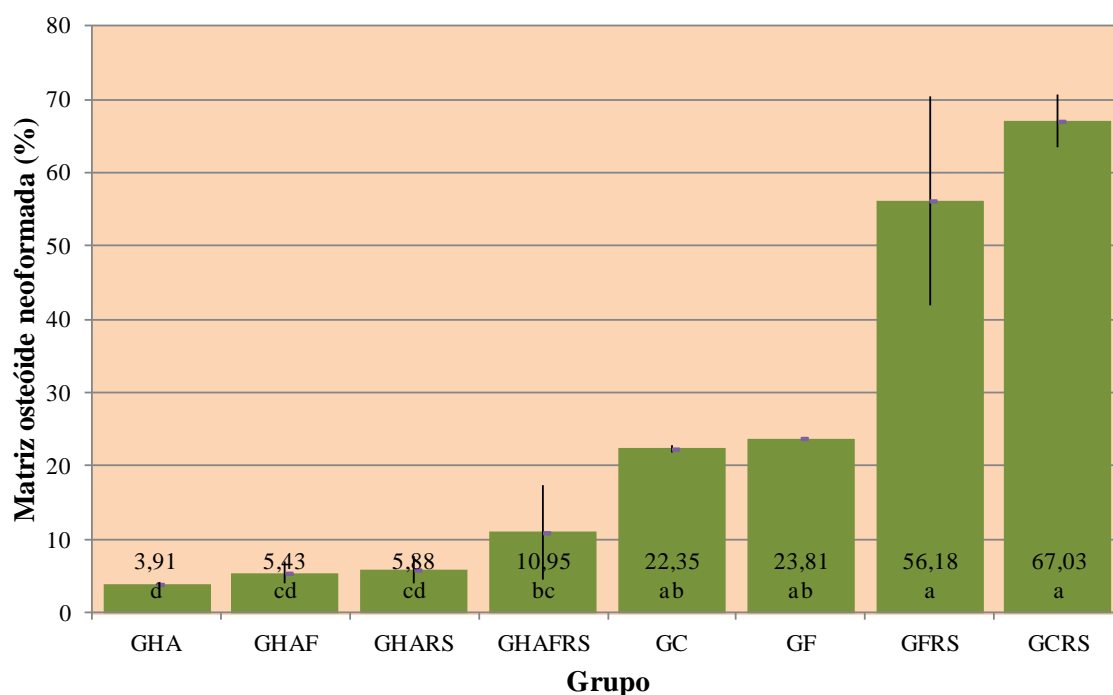


Gráfico 9: Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para comparação das médias de matriz osteóide neoformada nos de grupo no tempo de 120 dias. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%.

Conclui-se, dessa forma, a análise da variável de resposta percentagem da matriz osteóide neoformada na qual se detectou, por meio da análise de variância, efeito significativo da interação entre os fatores tempo e grupos, o que exigiu a comparação de médias através do teste de Tukey, que desmembrou o estudo de um fator em cada nível do outro.

### 5.2.2 Extensão linear do defeito

Iniciou-se, como na análise anterior, o processo de análise com a avaliação da aderência dos dados às suposições que embasam a análise de variância.

```

D.DADOS_IB
OBSERVATIONS (N=72): all
ANALYSIS: Multiple regression and ANOVA
RESPONSE: eL_defeito
FACTORS: grupos tempo
CLASSES: grupos tempo
Model:  GRUPOS, TEMPO, GRUPOS*TEMPO
USER-EXCLUDED OBSERVATIONS: none
ASSUMPTIONS VIOLATED:
    Influential observations

```

Somente foi detectada a violação em relação à inexistência de valores excessivamente influentes. Diante dessa condição, buscou-se conhecer o dado potencialmente problemático, por meio da estatística DFFITS, apresentada em seguida.

Potential influential observations: Abs(Dffits) > 2

Extensão on predicted number	defeito (um)	Standard influence grupos	(dias)	Observation value	linear do Leverage	Tempo
51	8750.17	GC	120	2.08156	0.33333	

Influential Observations

One observation qualifies as influential by exceeding a DFFITS statistic value of +/- 2. The results of the analysis may depend too much upon this observation.

Observa-se um único dado discrepante e com valor de influência padronizada no valor predito (*Standard influence on predicted value*) muito pouco superior a 2, valor limite para adequação da estatística.

Diante desse achado, recomenda-se descartar os indícios da existência de valor excessivamente influente e proceder à análise de variância, pois o dado não se apresenta como discrepante.

Passa-se então à apresentação da análise de variância na Tabela 7.

Tabela 7. Análise de variância para os dados de extensão linear do defeito

Causa de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor F	Valor-p
Grupos	7	5.785.594,93	826.513,56	3,99	0,0016
Tempo	2	522.900,03	261.450,02	1,26	0,2921
Grupos*Tempo	14	3.370.311,40	240.736,53	1,16	0,3331
Resíduo	48	9.937.609,51	207.033,53		
Total corrigido	71	19.616.415,88			

$R^2$ : 0,4934 – CV:5,68

Inicia-se a interpretação do quadro de análise de variância pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) que indica uma moderada aderência dos dados ao modelo, pois aproximadamente 50% da variação observada nas extensões lineares dos defeitos se associam a efeitos contemplados no modelo, havendo uma percentagem razoável de erro experimental (50%).

Em seguida, avaliou-se a existência de fortes indícios ( $p < 0,01$ ) de diferença significativa entre as médias dos grupos, que não existia indício de efeito significativo do tempo ou da interação entre tempo e grupos, quando assumido o nível de significância de 5%.

Diante desse resultado, faz-se apenas a comparação das médias de extensão linear do defeito nos diferentes grupos, concluindo-se que tais diferenças são válidas para todos os tempos (Tabela 8).

Tabela 8: Média, desvio padrão e teste de Tukey ( $p=0,05$ ) para os diferentes grupos

Grupos	Média	Desvio padrão	Grupos de Tukey
GHARS	8602,028	495,561	A
GHAFRS	8131,582	595,076	A B
GCRS	8092,496	403,133	A B
GHAF	8081,792	271,402	A B
GHA	8002,653	453,436	A B
GF	7888,518	322,543	B
GC	7687,411	610,388	B
GFRS	7626,767	459,096	B

O teste de Tukey fornece indícios de que a média do grupo GHARS é significativamente superior à média de extensão linear do defeito dos grupos GF, GC e GFRS, conforme ilustra o Gráfico 10.

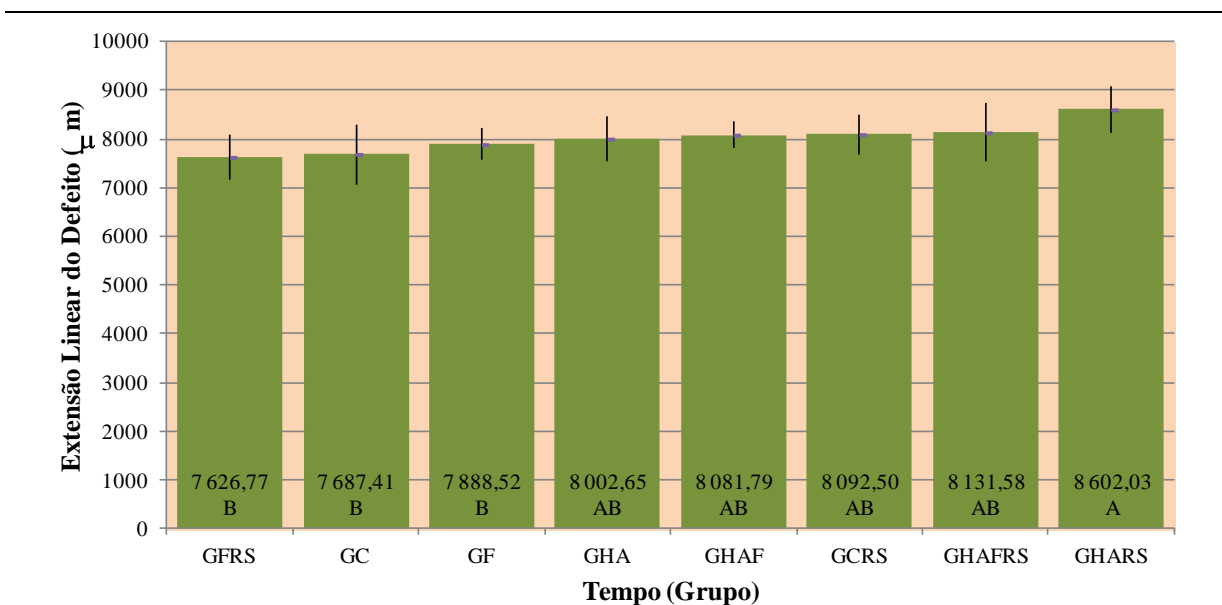


Gráfico 10: Média ( $\pm$ desvio padrão) e resultado do teste de Tukey para comparação das médias de extensão linear do defeito nos grupos. Barras com letras iguais não diferem entre si no nível de significância de 5%.



### 5.3 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROMETRIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDS)

Esta análise teve como objetivo mapear o elemento estrôncio e o conteúdo mineral presente no GCRS do ponto biológico de 120 dias (Figuras 69 a 74; Gráficos 11 a 26; Tabelas 9 a 12). Para este grupo, nas análises por EDS, detectou-se o pico da série L do estrôncio ( $L_{\alpha 1}=1,807$  keV) na fase mineral da amostra em todos os gráficos, com exceção dos gráficos 19, 21 e 26, nos quais não se observou pico correspondente ao elemento estrôncio. Isso foi feito por meio da análise de EDS de pequenas áreas, em que foi possível obter espectros com pico  $L_{\alpha 1}$  de estrôncio. Portanto, detectou-se pequeno pico de estrôncio em regiões de borda óssea e de osso neoformado. No mapa de EDS, observou-se forte sinal de cálcio nas áreas mineralizadas, como também o sinal de estrôncio presente nessas áreas. Na amostra representada pelo controle negativo, o GC, correspondente ao ponto biológico de 120 dias, não foi detectado pico de estrôncio na fase mineral da amostra (Figura 75; Gráficos 27 a 30; Tabelas 13 e 14).

É válido ressaltar que os elementos O, P, Ca e Mg compõem o tecido ósseo. Os elementos como C, Cl, Na e N estão presentes devido à preparação da amostra, enquanto que não se pode considerar que elementos como K e Al estejam presentes na amostra analisada, pois estes se encontram na faixa de ruído, o que gera um resultado falso positivo. Estes elementos estão presentes nas tabelas e gráficos.

### 5.3.1 Grupo Controle com Administração de ranelato de estrôncio (GCRS)

Calvaria\_rato\_120dias\_250x(1)

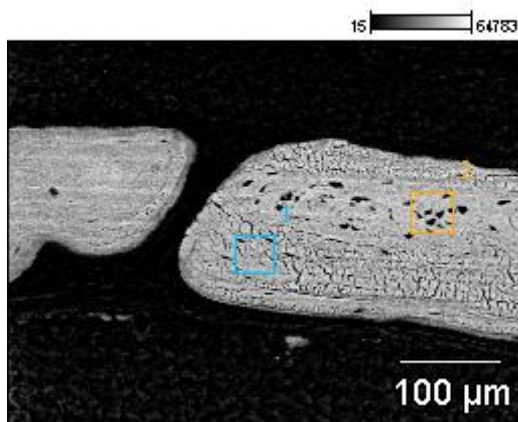


Image Name:

Calvaria\_rato\_120dias\_250x(1)

Accelerating Voltage: 30.0 kV

Magnification: 250

Figura 69: Região de matriz osteóide neoformada, próxima à borda óssea, mostrando duas regiões selecionadas para EDS.

Calvaria\_rato\_120dias\_250x(1)\_pt1

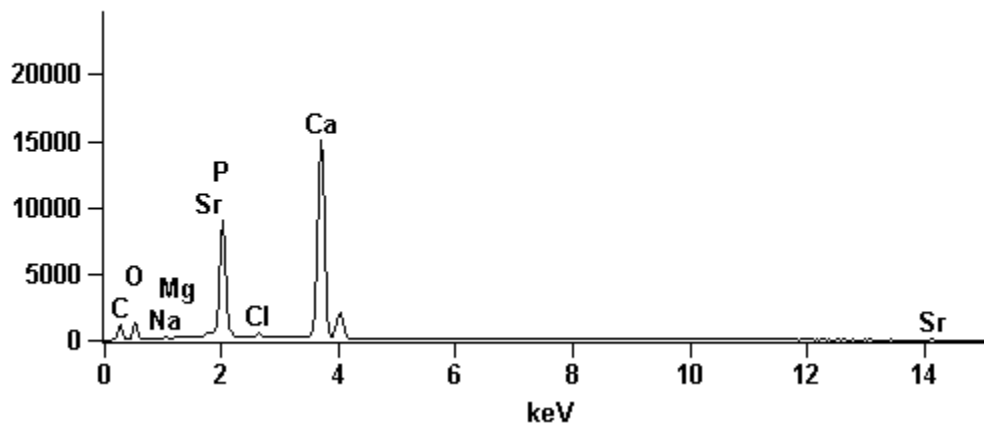


Gráfico 11: EDS corresponde à 1ª região selecionada da figura 69.

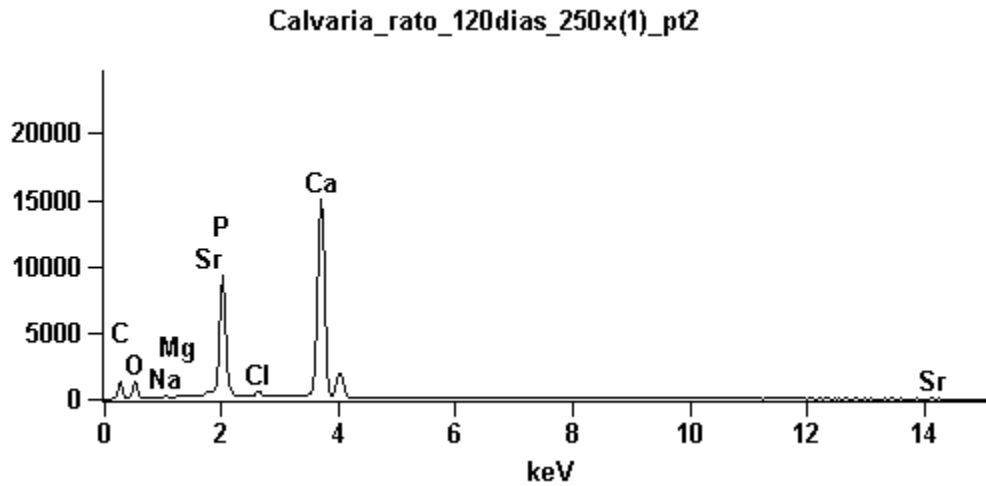


Gráfico 12: EDS corresponde à 2ª região selecionada da figura 69.

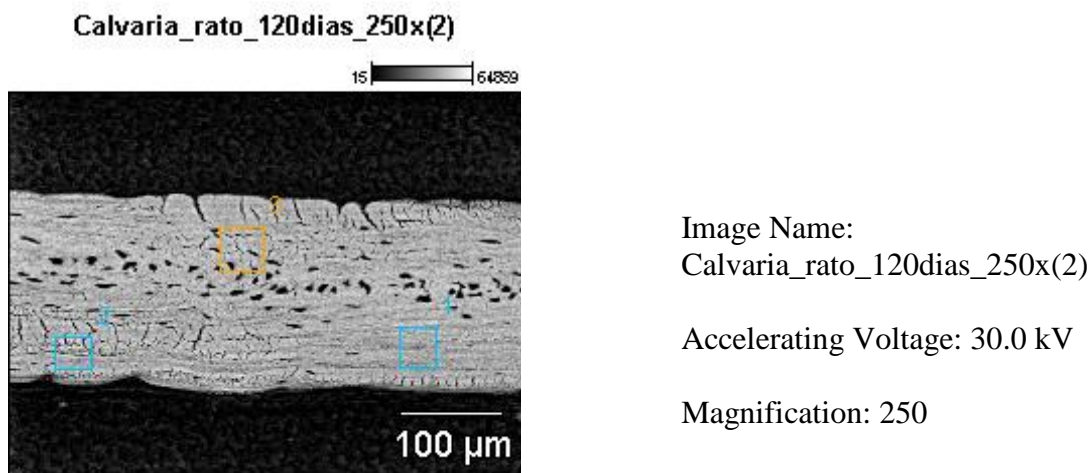


Figura 70: Matriz osteóide neoformada na região central do defeito, mostrando três regiões selecionadas para EDS.

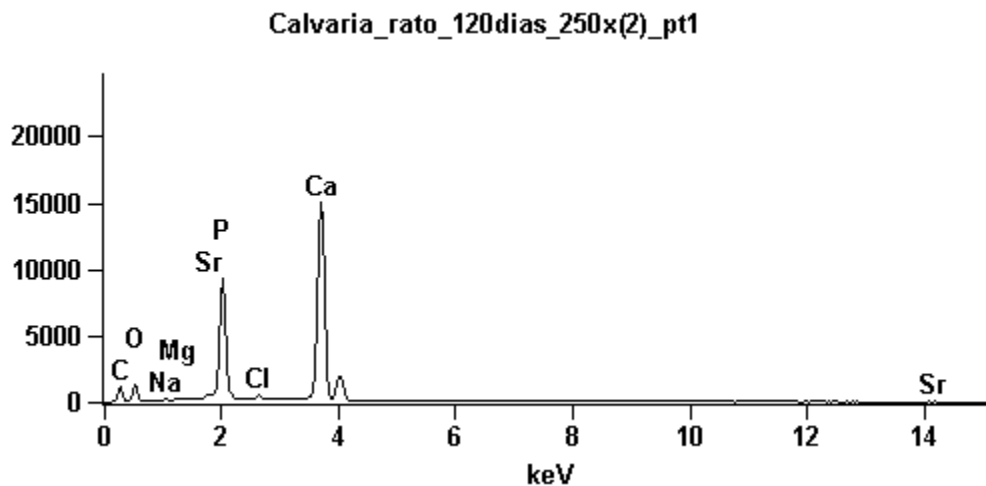


Gráfico 13: EDS corresponde à 1ª região selecionada da figura 70.

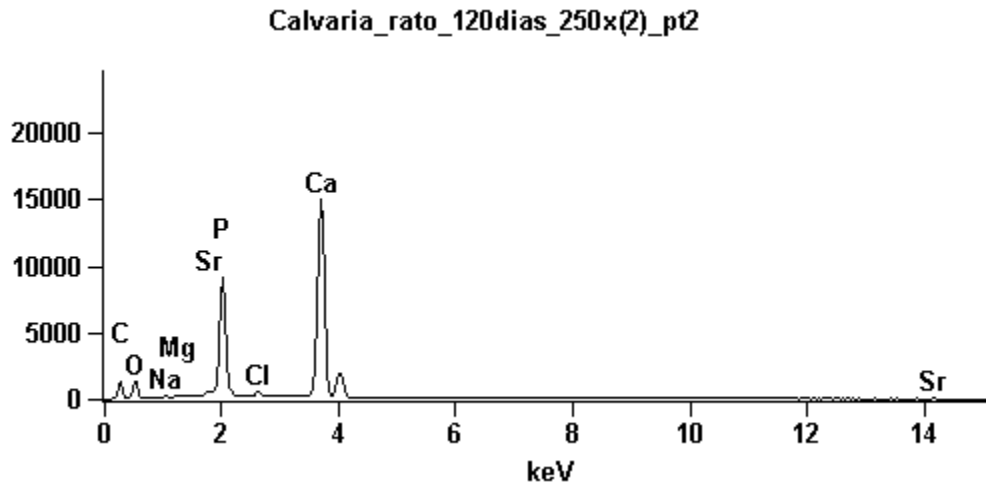


Gráfico 14: EDS corresponde à 2ª região selecionada da figura 70.

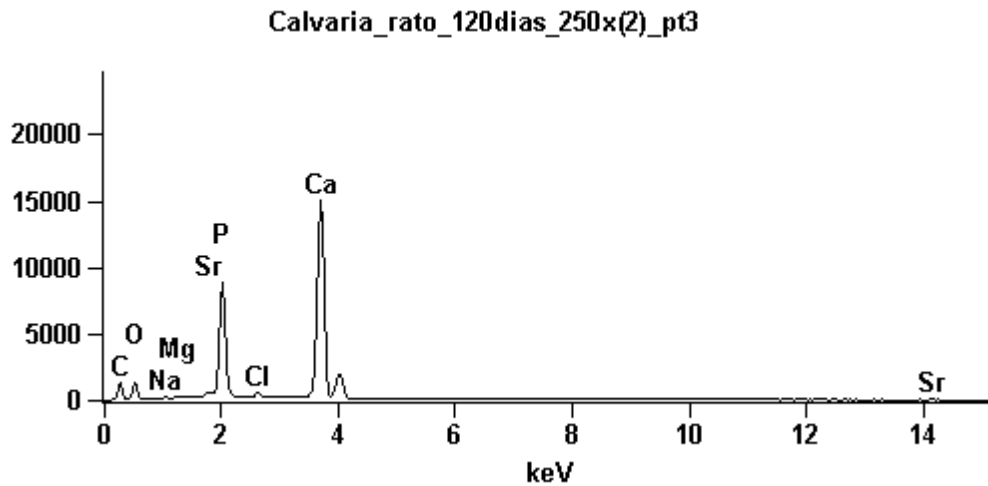


Gráfico 15: EDS corresponde à 3ª região selecionada da figura 70.

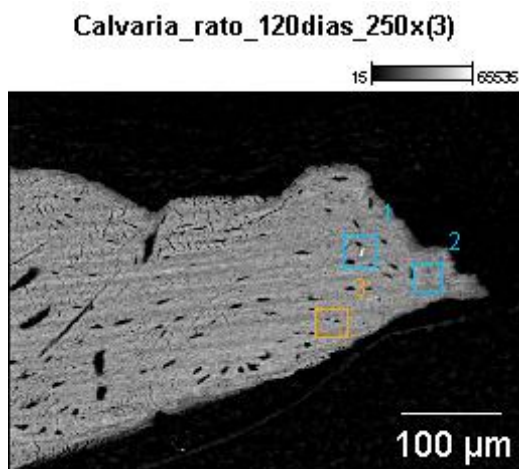


Image Name:  
Calvaria\_rato\_120dias\_250x(3)

Accelerating Voltage: 30.0 kV

Magnification: 250

Figura 71: Região correspondente à borda óssea, mostrando três regiões selecionadas para EDS.

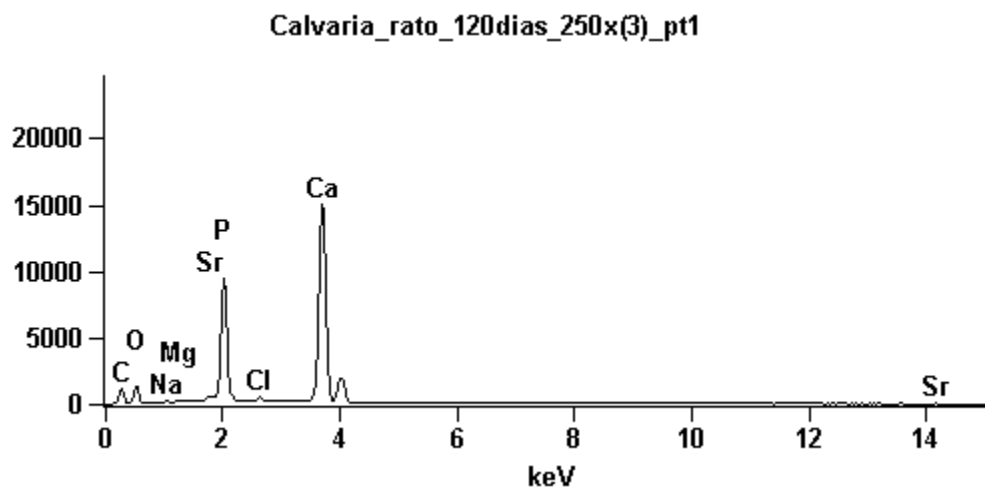


Gráfico 16: EDS corresponde à 1ª região selecionada da figura 71.

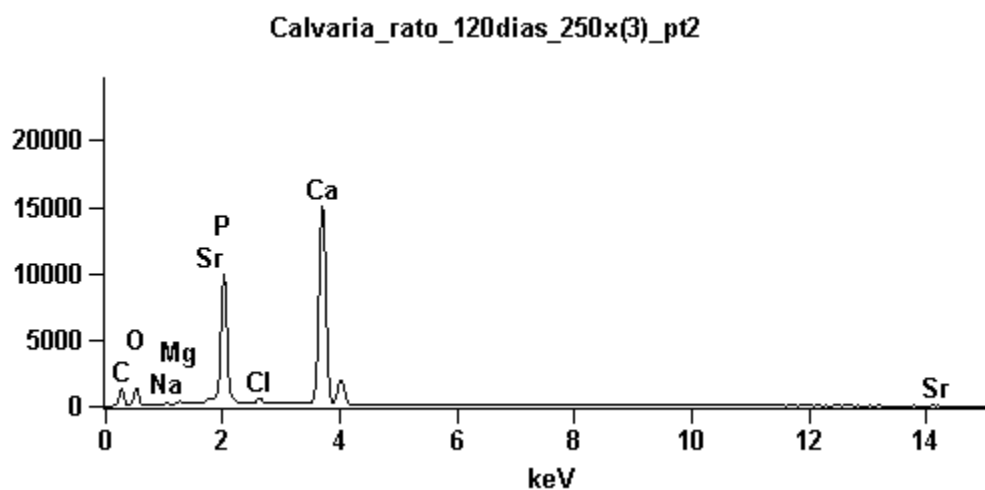


Gráfico 17: EDS corresponde à 2ª região selecionada da figura 71.

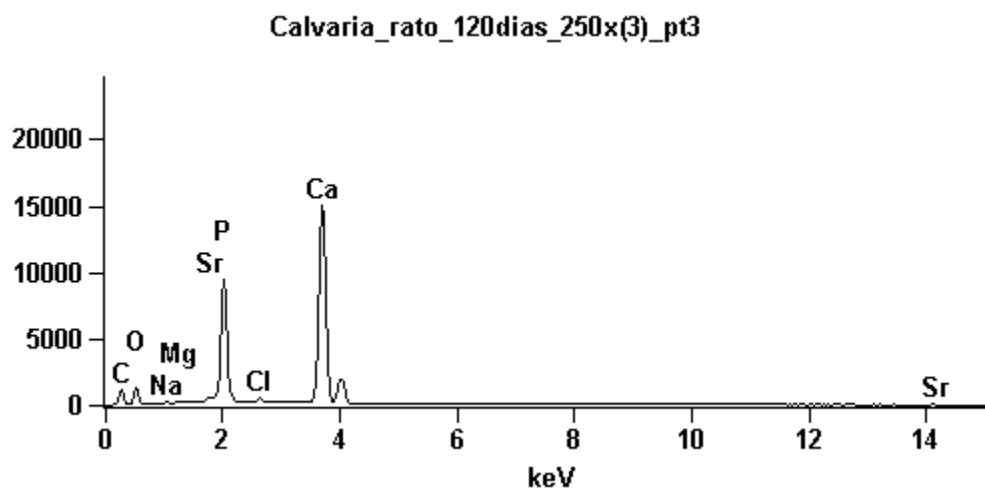


Gráfico 18: EDS corresponde à 3ª região selecionada da figura 71.



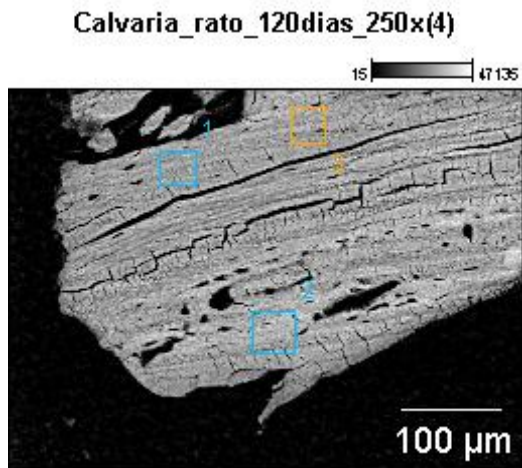


Image Name:  
Calvaria\_rato\_120dias\_250x(4)

Accelerating Voltage: 30.0 kV

Magnification: 250

Figura 72: Região correspondente à borda óssea, mostrando três regiões selecionadas para EDS.

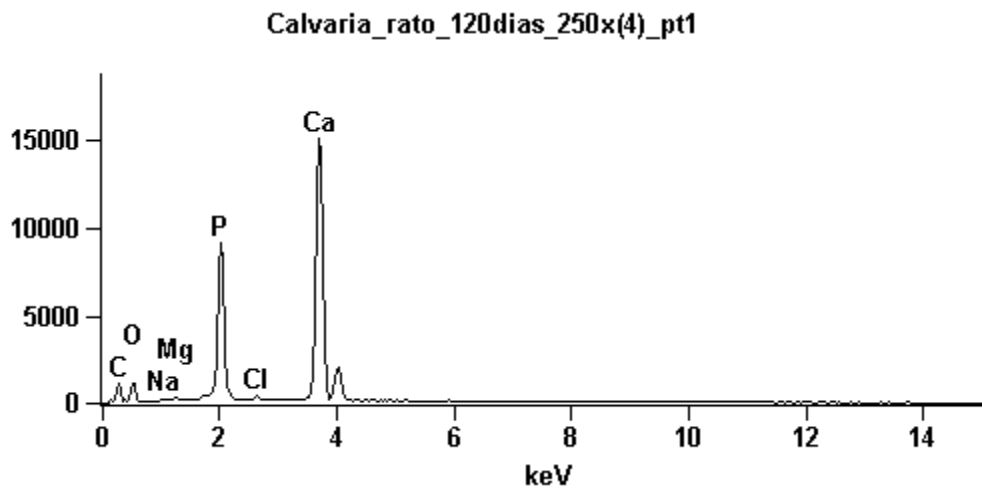


Gráfico 19: EDS corresponde à 1ª região selecionada da figura 72.

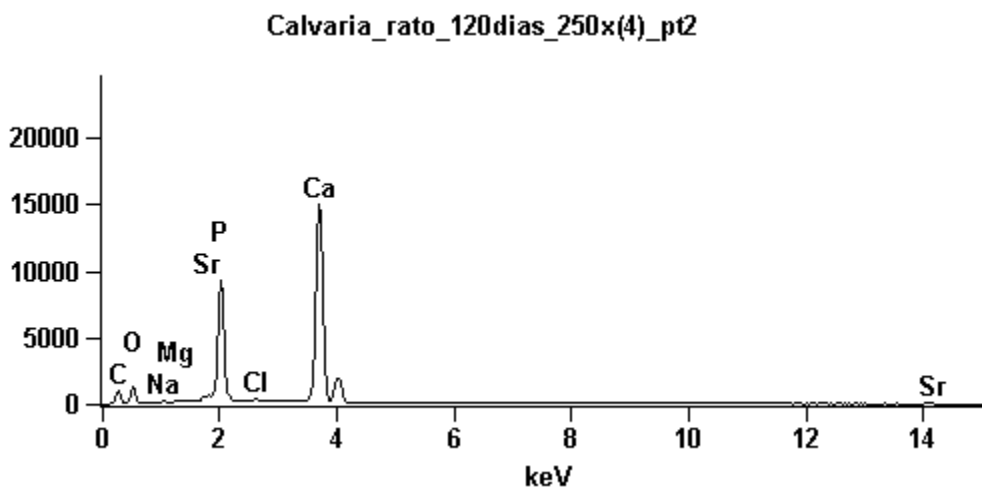


Gráfico 20: EDS corresponde à 2ª região selecionada da figura 72.

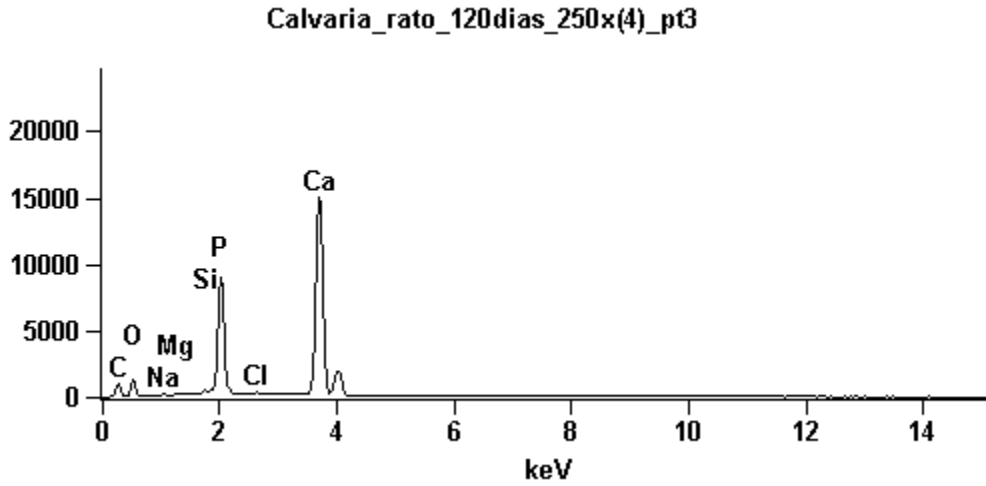


Gráfico 21: EDS corresponde à 3ª região selecionada da figura 72.

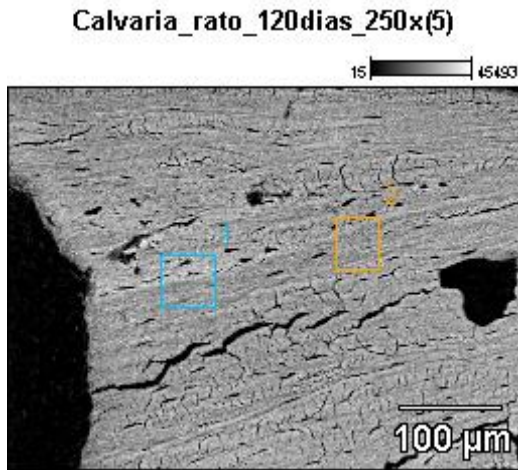


Image Name:  
Calvaria\_rato\_120dias\_250x(5)

Accelerating Voltage: 30.0 kV

Magnification: 250

Figura 73: Região de matriz osteóide neoformada, próxima à borda óssea, mostrando duas regiões selecionadas para EDS.

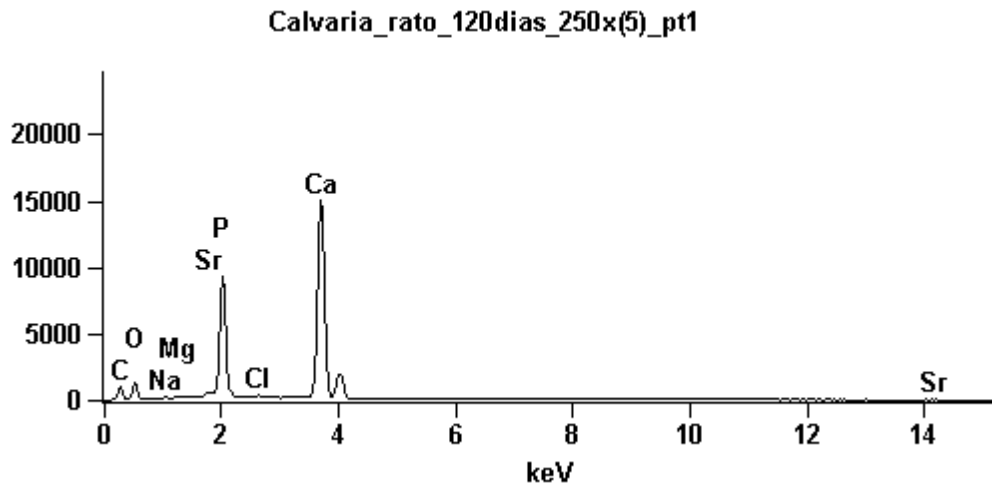


Gráfico 22: EDS corresponde à 1ª região selecionada da figura 73.

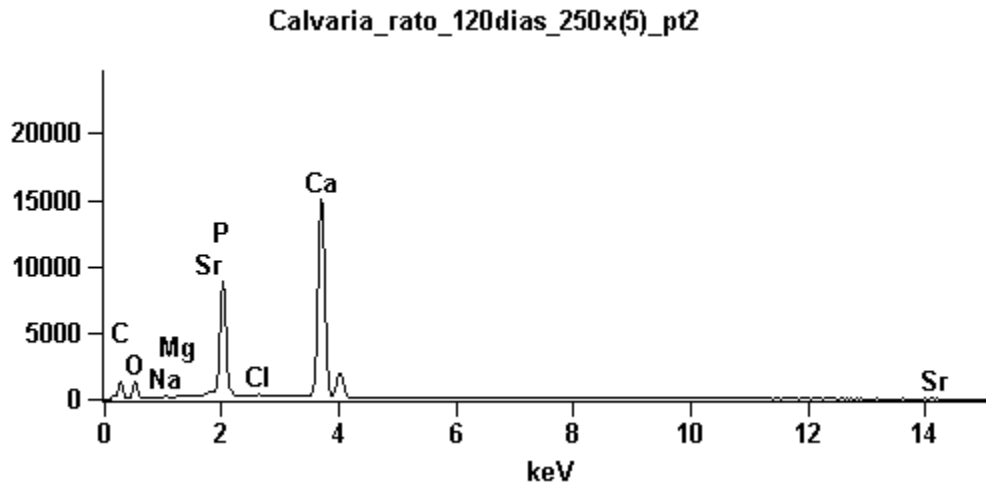


Gráfico 23: EDS corresponde à 2ª região selecionada da figura 73.

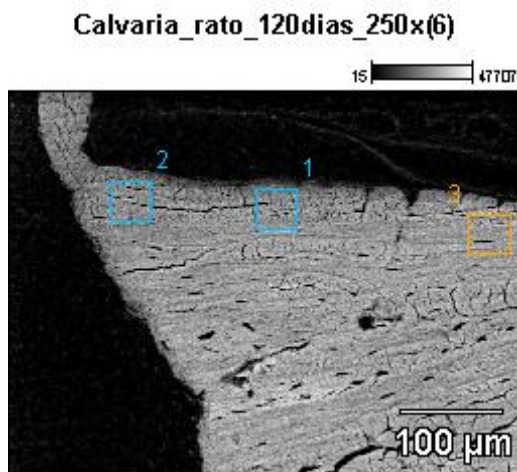


Image Name:  
Calvaria\_rato\_120dias\_250x(6)

Accelerating Voltage: 30.0 kV

Magnification: 250

Figura 74: Região correspondente à borda óssea, mostrando três regiões selecionadas para EDS.

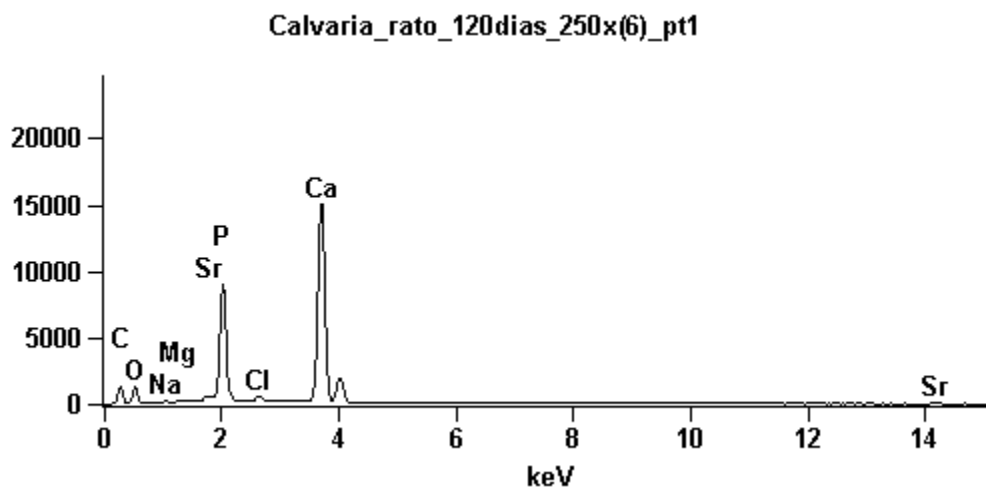


Gráfico 24: EDS corresponde à 1ª região selecionada da figura 74.

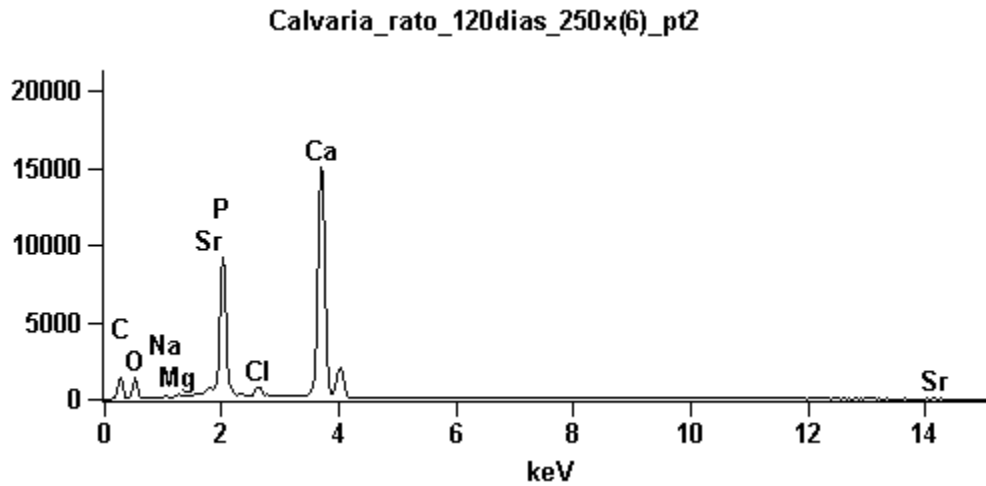


Gráfico 25: EDS corresponde à 2ª região selecionada da figura 74.

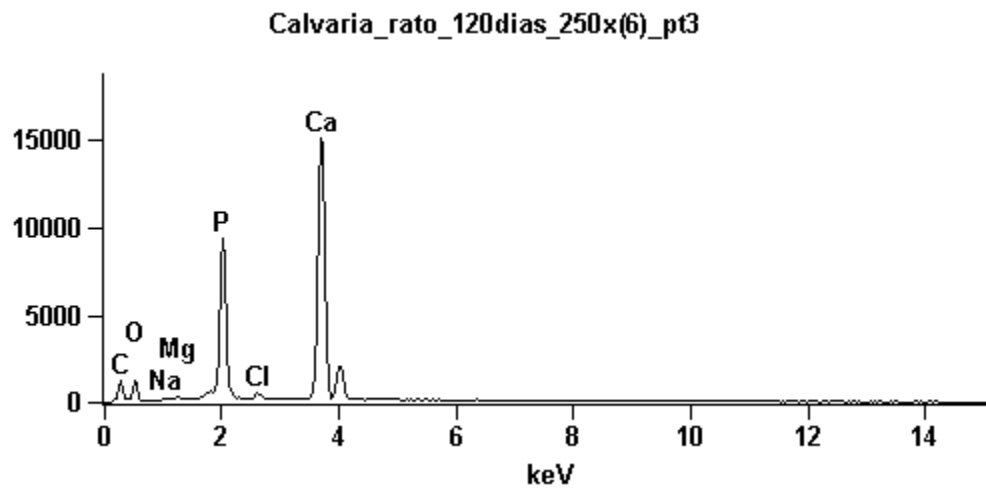


Gráfico 26: EDS corresponde à 3ª região selecionada da figura 74.

### 5.3.2 Grupo Controle (GC)

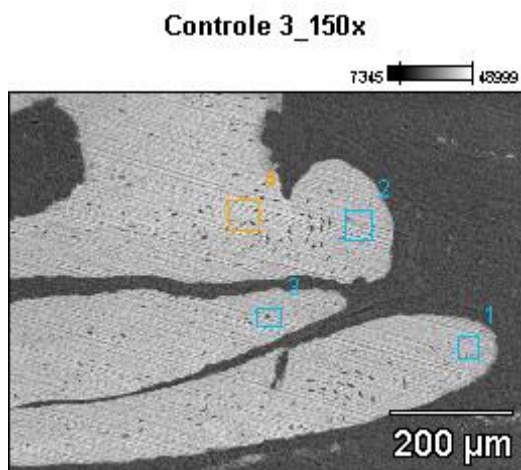


Image Name: Controle 3\_150x

Accelerating Voltage: 30.0 kV

Magnification: 150

Figura 75: Região correspondente à borda óssea, mostrando quatro regiões selecionadas para EDS.

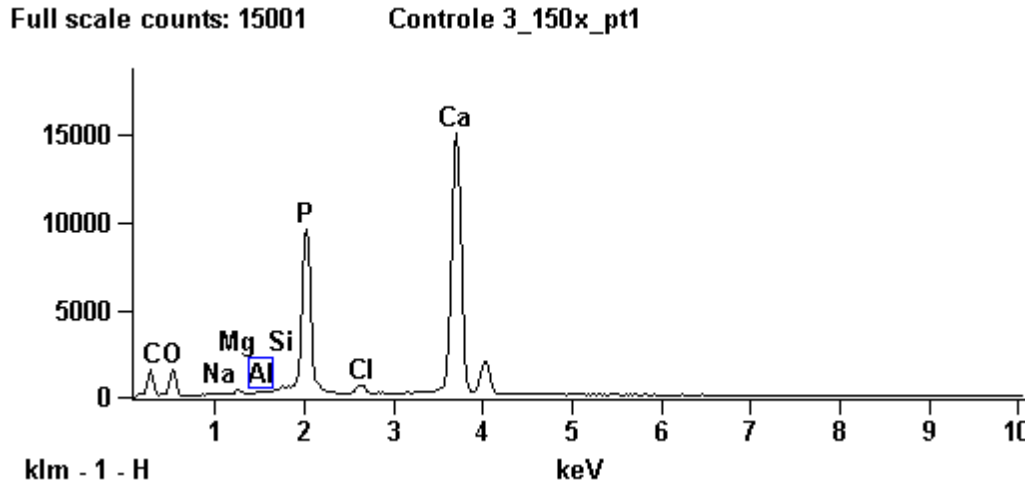


Gráfico 27: EDS corresponde à 1ª região selecionada da figura 75.

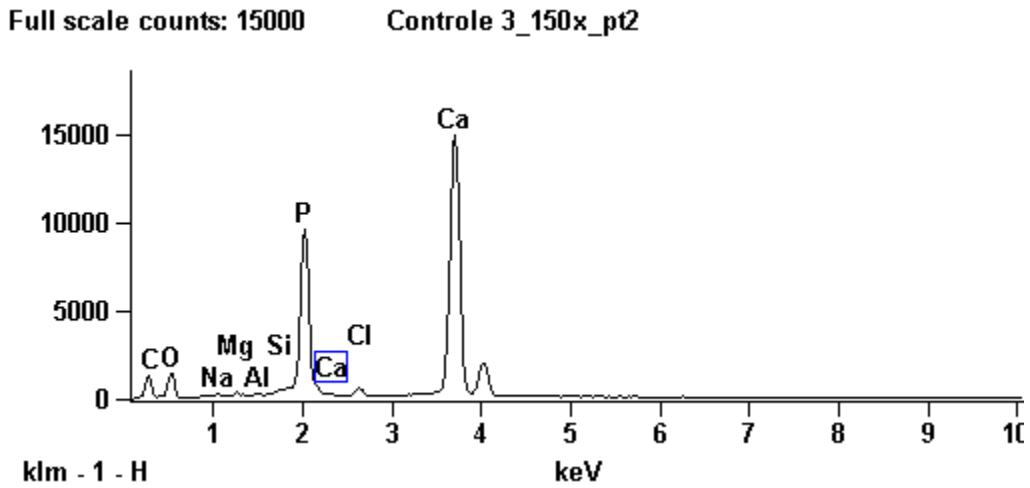


Gráfico 28: EDS corresponde à 2ª região selecionada da figura 75.

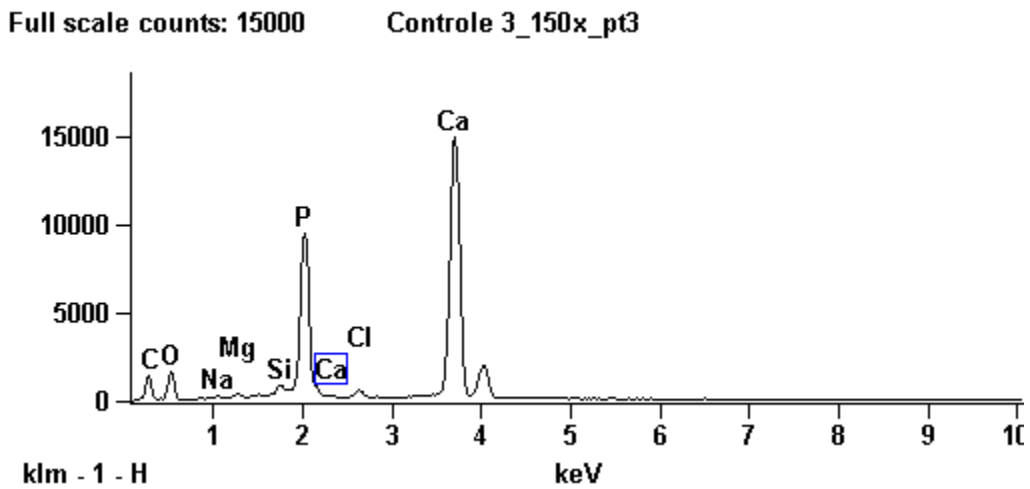


Gráfico 29: EDS corresponde à 3ª região selecionada da figura 75.



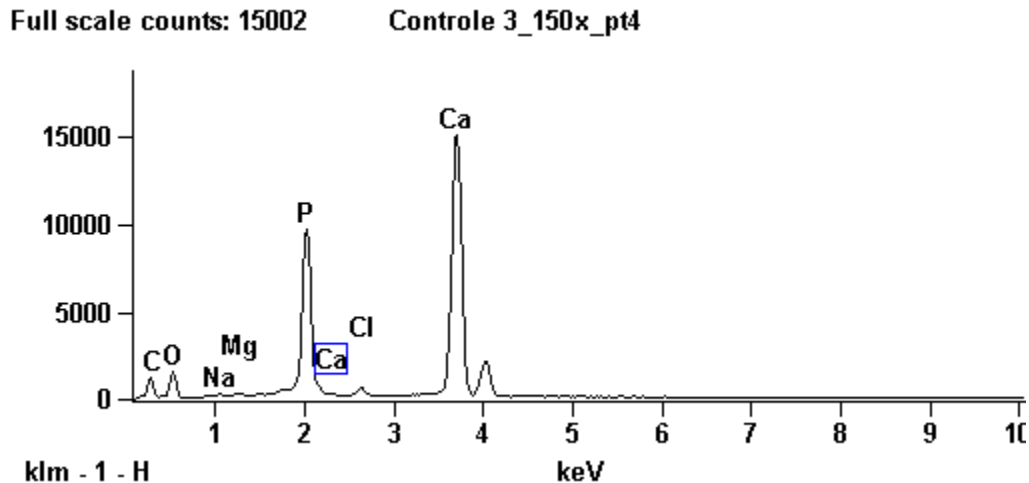


Gráfico 30: EDS corresponde à 4ª região selecionada da figura 75.

#### 5.4 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE ALTA RESOLUÇÃO E ESPECTROMETRIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDS)

Foram realizadas, no GCRS 120 dias, análises por MET, referente à região da matriz osteóide neoformada (Figuras 76a e 76c), onde foi possível visualizar o padrão de organização cristalográfica do tecido ósseo (Figura 76c). Ao lado da figura 76a, localiza-se o gráfico de EDS (Figura 76b), no qual o pico do elemento estrôncio encontra-se presente. Observaram-se, ainda, picos de Ca, P e O, elementos que compõem o tecido ósseo. Os elementos C, Cl, Na e N estão presentes devido à preparação da amostra, enquanto que o elemento Au está presente no gráfico, pois existe na grade que suporta a amostra.

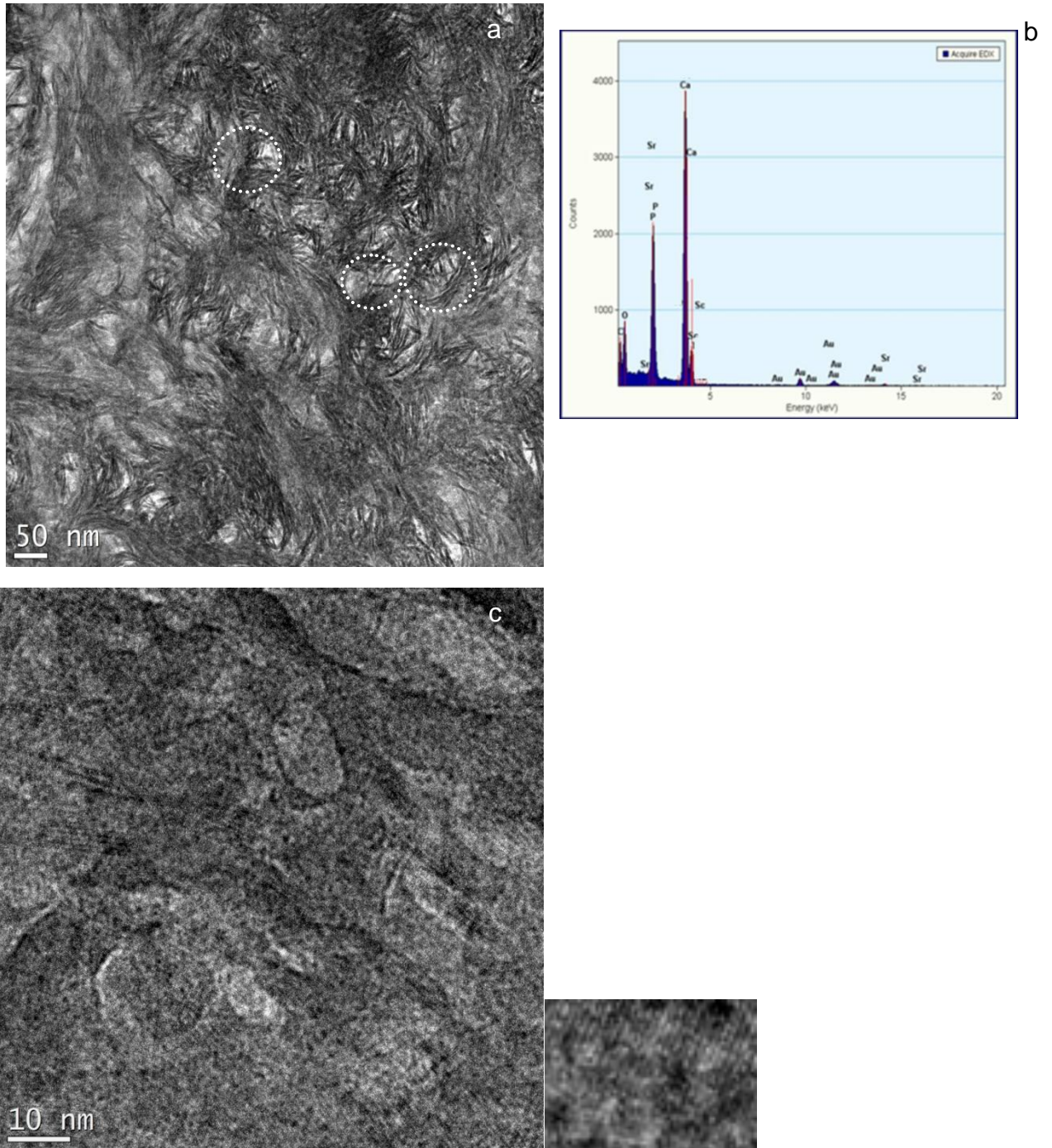


Figura 76: As figuras 76a e 76c representam a área correspondente à matriz osteóide neoformada. A figura 76a mostra o arranjo dos cristais de HA em um padrão circular (círculos pontilhados) típico de observação na direção do eixo cristalográfico em direção paralela às fibrilas de colágeno. Na figura 76c, observa-se a estrutura cristalina do osso. No detalhe desta figura, mostra-se um cristal de HA. A figura 76b mostra espectro de EDS, no qual o pico do elemento estrôncio encontra-se presente.

***Discussão***

## 6 DISCUSSÃO

A medicina regenerativa busca o reparo de tecidos lesionados por meio do controle e ampliação da capacidade natural de regeneração dos tecidos. A bioengenharia tecidual insere-se neste contexto e visa à utilização de biomateriais que atuem como arcabouços capazes de substituírem tecidos ou órgãos que perderam a sua estrutura ou função. Estudiosos da bioengenharia tecidual óssea almejam a regeneração de defeitos ósseos de dimensões críticas, que podem ser decorrentes de defeitos congênitos, de doenças metabólicas e degenerativas na população idosa, como a osteoporose, de neoplasias e de traumas, principalmente aqueles provenientes de acidentes automobilísticos que ocorrem, predominantemente, na população jovem das grandes cidades (MULLIKEN et al., 1980; NEVINS; MELLONIG, 1994; JOVANOVIC, 1995; UEMURA et al., 2003; BOROJEVIC, 2008). Neste tipo de defeito, a regeneração óssea espontânea não é completa, e o reparo tecidual ocorre com formação de tecido conjuntivo fibroso cicatricial, o que resulta em danos estéticos ou funcionais e limita a qualidade de vida do indivíduo acometido (LIM; LEE; YEO, 2000; SICCA et al., 2000; SEAL; OTERO; PANITCH, 2001; LOGEART-AVRAMOULOU et al., 2005; BOROJEVIC, 2008).

Previamente à aplicação clínica desses novos substitutos biológicos, faz-se necessário realizar estudos experimentais *in vivo* com o objetivo de comprovar a capacidade dos biomateriais em guiar e sustentar os processos regenerativos, verificando-se, portanto, o seu potencial osteogênico por meio das interações específicas entre células e biomaterial, a sua biocompatibilidade, o estímulo à migração, adesão e proliferação celular e o ritmo de degradação do biomaterial, que deve ser coerente com o de neoformação tecidual óssea (ROSE; OREFFO, 2002; ROSE et al., 2004; STEVENS; GEORGE, 2005; FLECKENSTEIN et al., 2006; BOROJEVIC, 2008).

Pesquisadores da área da bioengenharia tecidual óssea têm empregado diferentes modelos animais, como cabra (ANDERSON et al., 1999), cão (UEDA et al., 2007), coelho (GOSAIN et al., 2003), porco (SCHLEGEL et al., 2006), ovelha

(VIATEAU et al., 2007) e rato (CARDOSO et al., 2006; MIGUEL et al., 2006; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2011; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2011) para testar o potencial osteogênico de novos biomateriais. Para a escolha do modelo animal, deve-se considerar o custo, manejo e facilidade de obtenção, assim como os sítios anatômicos onde os defeitos ósseos serão confeccionados, que devem situar-se em região estável que inclua, preferencialmente, tecido ósseo cortical e esponjoso e reduzido risco de fratura (FRAME, 1980; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Em nosso estudo, optou-se pela utilização de defeito ósseo crítico em calvária de rato. Este modelo experimental tem se mostrado útil para a avaliação do potencial osteogênico de novos biomateriais (CARDOSO et al., 2006; MIGUEL et al., 2006; CARVALHO, 2010; ROLIM, 2010; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2011; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2011). Neste tipo de animal e no sítio anatômico referido, o defeito de 8,5 mm é considerado crítico, por não haver regeneração espontânea em toda a sua extensão, de acordo com conceitos fundamentados por Schmitz e Hollinger (1986). A calvária é um dos sítios anatômicos eleitos para avaliar o potencial osteogênico de novos biomateriais, por apresentar baixo suprimento sanguíneo, que reduz o aporte de moléculas sinalizadoras, nutrientes e fatores de crescimento e dificulta a regeneração tecidual óssea (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998). A ampla utilização deste modelo experimental é justificada, ainda, por outros fatores, como a facilidade de manipulação do animal, por ser de pequeno porte, ciclos vitais curtos e metabolismo acelerado, quando comparado com os seres humanos, anatomia conhecida, necessita de pouca quantidade de biomaterial para preenchimento do defeito e facilidade de implantação do biomaterial no leito receptor (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Com o objetivo de atestar o diâmetro de 8,5 mm, pré-estabelecido na metodologia empregada neste estudo, foi quantificada a extensão linear dos defeitos ósseos realizados. Verificou-se que as médias do diâmetro do defeito ósseo entre grupos variaram entre 7,6 mm e 8,6 mm. Esta diferença pode ser justificada pelo fato de a calvária possuir formato em cúpula, apresentar espessura aproximada de 1,0 mm, estar em íntimo contato com a dura-máter e o encéfalo, e em contiguidade com a veia central subdural, que se situa próxima à sutura interparietal. Desse



modo, essa estrutura delgada e convexa pode ter interferido na firmeza e precisão da broca trefina durante a confecção dos defeitos ósseos, o que gerou esta pequena diferença entre as médias do parâmetro citado.

Neste estudo experimental, optou-se pela utilização de *Rattus norvegicus* da linhagem wistar albino do gênero masculino para evitar que houvesse variações hormonais observadas durante o ciclo estral de ratas, o que poderia influenciar o processo de reparo tecidual ósseo. Os animais utilizados neste experimento possuíam, no dia da cirurgia, idade entre três e quatro meses e peso corpóreo entre 350 e 400 g, o que os caracterizou como animais adultos. Optou-se por esta idade pelo fato de que, nesta fase da vida, os animais possuem metabolismo ósseo mais lento e menos dinâmico, quando se compara com animais jovens, que estão em processo de crescimento.

Em relação ao padrão de reparo tecidual ósseo, encontramos, no GC, resultados histológicos similares aos descritos na literatura (CARDOSO et al., 2006; MIGUEL et al., 2006; CARVALHO, 2010; ROLIM, 2010; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2011; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2011). Neste grupo, a maior parte da área total do defeito foi preenchida por tecido conjuntivo fibroso e, aos 15 dias, tal tecido mostrou-se do tipo frouxo, enquanto que, nos demais pontos biológicos, o tecido conjuntivo mostrou-se adensado e com menor espessura em comparação com as bordas ósseas. A formação de matriz osteóide ocorreu apenas nas áreas periféricas do defeito e correspondeu a aproximadamente 19% de ocupação, aos 120 dias, em relação à área total do defeito.

Um dos objetivos deste trabalho foi analisar o potencial osteogênico de biomaterial composto por HA estequiométrica sinterizada. Utilizou-se microesferas de HA sinterizadas estequiométricas, com diâmetro entre 250 a 425  $\mu\text{m}$ , fórmula molecular representada por  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$  e razão Ca/P de 1,67. A presença dos grupamentos químicos pertencentes à HA foi confirmada por meio de análise por FTIR. O biomaterial utilizado neste experimento apresentou alto grau de cristalinidade, confirmada por seus picos estreitos em análise realizada por DRX. Esta característica pode ser justificada pelo fato de que, durante a confecção do pó de HA, a temperatura utilizada para o seu preparo foi de 90<sup>o</sup> C, considerada elevada, o que propicia a formação de HA cristalina e, posteriormente, as microesferas de HA passaram pelo processo de sinterização. Este Tal processo resulta na formação de

um biomaterial denso, com maior resistência mecânica e reduzido percentual amorfo, pois promove a remoção de água da sua estrutura e determina maior cristalinidade devido à difusão dos átomos de duas redes cristalinas, o que garante maior coesão aos cristais (ROSA; SHAREEF; NOORT, 2000; LEGEROS, 2002; RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2004; TADIC et al., 2004; REY et al., 2006; LACERDA; LAMEIRAS; SILVA, 2006).

A escolha de biomaterial cerâmico composto por HA utilizado no nosso experimento justifica-se fundamentalmente pelo fato de este possuir biomimetismo com o osso, isto é, estrutura química compatível com a fração inorgânica do tecido ósseo; por isso, esse tipo de biomaterial é empregado vastamente na literatura para o preenchimento de defeitos ósseos (BOSCH; MELSEN; VARGEVIC, 1998; BRAZ et al., 2003; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2011; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2011). Ademais, a cerâmica de HA é um biomaterial de fácil preparo e apresenta baixo custo de produção (LEGEROS, 2002; HING, 2004; PATEL et al., 2005; LONG, 2008; ZANG et al., 2007). Apesar desses atributos atrativos, as biocerâmicas apresentam como desvantagem a reduzida competência mecânica quando comparada à do tecido ósseo (ROSE; OREFFO, 2002).

Neste estudo, observou-se a presença de neoformação vascular, aos 15 dias, de permeio às microesferas de HA, e a manutenção destes desses vasos nos demais pontos biológicos, bem como a presença de células mesenquimais em íntimo contato com esse biomaterial em todos os pontos biológicos. Possivelmente, a proliferação vascular e tecidual foi favorecida devido ao formato esferoidal do biomaterial, o que possibilitou a formação de espaços criados entre as microesferas de HA (SIVAKUMAR; MANJUBALA; PANDURANGA RAO, 2002; BARRIAS et al., 2005; 2006; MARCACCI et al., 2007). Esses achados estão de acordo com os princípios da bioengenharia tecidual, que visa a produzir biomateriais capazes de promoverem o restabelecimento funcional e estrutural da região a ser reparada (UEMURA et al., 2003; BOROJEVIC, 2008).

Assim, as vantagens de se inserir um biomaterial em defeito crítico residem no fato de que, além de preencher fisicamente o defeito e de assegurar a manutenção do volume que foi perdido, propicie mecanismos osteoindutores, osteoestimuladores ou osteocondutores. A cerâmica de HA é considerada um biomaterial osteocondutor por possibilitar o mecanismo de angiogênese, que

favorece o aporte de células mesenquimais indiferenciadas, as quais, ao chegarem ao leito receptor, encontram um meio propício para a migração, adesão, proliferação e diferenciação em células da linhagem osteogênica, o que culmina na neoformação de matriz osteóide (GOSAIN et al., 2002; DERUBEIS; CANCEDDA, 2004; BURG; PORTER; KELLAM, 2000; ZANG et al., 2007; HABIBOVIC et al., 2008).

No nosso trabalho, nos grupos experimentais em que houve a implantação de microesferas de HA, foi observada a manutenção do volume relacionado à área em que houve a confecção do defeito ósseo, considerando-se isso uma vantagem quanto ao emprego desses biomateriais. Adicionalmente, foi observada a presença de matriz osteóide interagindo diretamente com o biomaterial de HA, com maior formação de tal matriz nas áreas periféricas do biomaterial, dirigindo-se provavelmente para o seu interior. A bioengenharia tecidual busca o desenvolvimento de biomateriais de preenchimento com características físico-químicas que possibilitem a sua biointegração ao leito receptor de forma compatível com os processos biológicos, de modo que possam atuar ativamente com os componentes celulares e a matriz extracelular (DEE et al., 2002; FULMER et al., 2002; LEGEROS, 2002; DIETMAR; GARCIA, 2005; BOROJEVIC, 2008). A bioatividade é uma característica atribuída às biocerâmicas de HA e ocorre em decorrência da solubilização desse biomaterial no microambiente tecidual, com a liberação de íons cálcio e fosfato, que interagem ativamente com os componentes moleculares e celulares presentes no local e favorecem o reparo ósseo e a íntima associação do biomaterial cerâmico com o tecido ósseo. A maior concentração de cálcio na matriz extracelular estimula a produção de colágeno e BMPs, enquanto que a maior concentração de fosfato neste meio leva ao estímulo à produção da osteopontina (NAKADE et al., 2001; BECK, 2003; OSATHANON et al., 2008).

Apesar de ter sido identificada neoformação de matriz osteóide intimamente conectada às microesferas de HA nos nossos grupos experimentais, aos 120 dias, esta se restringiu a diminutas regiões do defeito ósseo, em média 3,9% da área de ocupação total do defeito para o GHA; 5,4% para o GHAF; 5,9% para o GHARS; e de 10,9% para o GHAFRS, com maior ocupação da área do defeito ósseo por tecido conjuntivo fibroso. Estes dados percentuais obtidos podem ser explicados devido ao fato de os fibroblastos serem as células responsáveis pela produção de tecido conjuntivo fibroso, formado durante o processo de reparo tecidual e, quando há

implantação de biomateriais, a interação dessas células com o biomaterial pode levar ao encapsulamento fibroso, o que dificulta o processo regenerativo do tecido ósseo (BAXTER et al., 2002; PAN; JIANG; CHEN, 2006). Nos grupos experimentais em que houve a implantação das microesferas de HA (GHA, GHAF, GHARS e GFHARS), em todos os pontos biológicos, foi observada a formação de cápsula fibrosa delgada a circundar as microesferas e septos fibrosos que adentraram este biomaterial.

De acordo com Rey e colaboradores (2006), o processo de sinterização empregado na HA pode afetar a sua textura de superfície, o que tolhe o reparo tecidual ósseo. Ademais, o processo de sinterização resulta na produção de biocerâmicas com baixo grau de solubilidade aos fluidos biológicos, o que dificulta o trânsito dos íons cálcio e fosfato para o microambiente tecidual e pode restringir a neoformação de matriz osteóide. O baixo grau de solubilidade mencionado foi verificado no presente estudo, nos grupos experimentais em que houve implantação das microesferas (GHA, GHAF, GHARS e GHAFRS), pois, ao longo dos 120 dias de pós-operatório, observou-se área de ocupação do biomaterial similar intragrupos, quando comparada com os pontos biológicos de 15 e 45 dias; logo, não houve biodegradação expressiva das microesferas de HA. Foi notado, ainda, reduzido grau de dispersão do biomaterial na matriz extracelular em toda a área do defeito.

Os grupos experimentais que possuíam biomaterial de HA incitaram resposta inflamatória similar aos trabalhos descritos na literatura frente ao padrão de resposta do organismo à implantação de um biomaterial. Um biomaterial é considerado biocompatível quando estimula uma mínima resposta inflamatória ou imunitária após a sua interação com os fluidos tissulares presentes no microambiente do leito receptor (STANFORD, 1980; WATAHA, 2001). A confecção de defeitos ósseos, em nível experimental, para ensaios de cunho regenerativo, desencadeia uma resposta inflamatória causada pelo rompimento vascular, seguido de extravasamento sanguíneo e, quando se associa a este procedimento cirúrgico a implantação de biomateriais na região lesionada, ocorre interação sangue-superfície do biomaterial, formação de coágulo sanguíneo, inflamação aguda, inflamação crônica, reação granulomatosa e encapsulamento fibroso (ANDERSON; RODRIGUES; CHANG, 2008).

Aos 15 dias, a maioria das microesferas se encontrava íntegra e estava circundada por discreta inflamação crônica granulomatosa, enquanto que as microesferas que se apresentaram mais fragmentadas foram permeadas por reação granulomatosa um pouco mais acentuada. A reação granulomatosa esteve presente, porém menos acentuada, aos 45 dias. A cerâmica de HA é um biomaterial friável, logo, pelo fato de ter fragmentado, provavelmente formou ângulos agudos, o que pode ter auxiliado a incitar esta resposta inflamatória (LEGEROS, 2002; ANDERSON; RODRIGUES; CHANG, 2008). Estes fragmentos, que estavam presentes no estroma fibroso, foram englobados por células gigantes multinucleadas. Aos 15 e 45 dias identificou-se, ainda, infiltrado mononuclear linfocitário discreto e, aos 45 dias, em algumas regiões, havia um infiltrado mononuclear moderado com predomínio linfoplasmocitário e histiocítico, com macrófagos presentes no interior do biomaterial, mais concentrado em regiões perivasculares. Os macrófagos são células importantes para a formação vascular e estão relacionados com a liberação de mediadores inflamatórios, principalmente citocinas, e estimulam a migração e proliferação de células endoteliais, com a consequente formação de vasos sanguíneos (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). O padrão inflamatório observado nos grupos GHA, GHAF, GHARS e GHAFRS tornou-se mais discreto e difuso no ponto biológico de 120 dias.

Além das reações inflamatórias desencadeadas no leito doador após a implantação de um biomaterial, espera-se que ocorra também a adsorção de proteínas ao biomaterial, tais como, albumina, fibrinogênio, fibronectina, vitronectina e globulinas e subsequente adesão de macrófagos e fusão destes para formação de células gigantes, além da interação entre tais células e tantas outras relacionadas ao reparo tecidual (ANSELME, 2000; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008).

A utilização do selante de fibrina neste estudo teve como objetivo evitar o deslocamento das microesferas de HA e, como consequência, incrementar a regeneração óssea. Essa estabilidade se faz por meio da adesão do selante de fibrina às paredes do defeito e às microesferas de HA, pela formação de uma rede firme e mecanicamente estável, com boas propriedades adesivas e pelo fato de ser um agente hemostático e por estimular a angiogênese, o que auxilia no reparo tecidual (CHAN; BOISJOLY, 2004; SPOTNITZ; PRABHU, 2005; LE NIHOANNEN et al., 2007). É importante que ocorra o preenchimento satisfatório do defeito ósseo



para que haja vascularização efetiva e oferta de arcabouço que permita a adesão, migração e proliferação das células da linhagem osteoblástica.

A capacidade regenerativa de um biomaterial está diretamente relacionada à manutenção da sua forma no sítio de implantação (BOYDE et al., 1999) e o deslocamento do biomaterial deve ser prevenido, pois esta movimentação auxilia no desencadeamento de processo inflamatório crônico (ANDERSON, 2000). Ademais, o deslocamento do material deve ser evitado, ainda, pelo fato de que os *Rattus norvegicus* possuem o hábito de posicionar a cabeça, ao dormirem, com a região da calvária voltada para a cama de maravalha. Os animais podem, ainda, manipular a região operada, devido ao prurido relacionado à fase cicatricial de contração da ferida, que também auxilia no deslocamento deste biomaterial.

No nosso experimento, os grupos experimentais que apresentaram selante de fibrina associado às microesferas de HA apresentaram maior percentual de neoformação de matriz osteóide aos 120 dias [GHAFRS (11%); GHAF (5,4%)], quando comparados com os grupos em que houve apenas a implantação de microesferas de HA [GHARS (5,9%); GHA (3,9%)], o que demonstrou o papel do selante de fibrina como biomaterial auxiliar no processo de regeneração óssea.

Neste estudo, a administração por via oral do ranelato de estrôncio, medicamento empregado clinicamente para o tratamento de osteoporose, teve como propósito incrementar o reparo do defeito ósseo crítico em animais que não apresentavam osteopenia induzida. A dose de administração escolhida do medicamento, 900 mg/Kg/dia, foi fundamentada por estudos prévios que demonstraram efeito positivo do ranelato de estrôncio em relação ao tecido ósseo, quanto à melhoria da sua qualidade e microarquitetura, ao aumento da sua massa, por meio do estímulo à sua formação e inibição da sua reabsorção em ratos que não foram submetidos à indução de osteopenia (HOTT et al., 2003; AMMANN et al., 2004).

No nosso experimento, nos grupos em que houve administração do ranelato de estrôncio, a ocupação de matriz osteóide em relação à área total do defeito no ponto biológico de 120 dias ocorreu da seguinte maneira: GCRS (67%), GFRS (56%), GHAFRS (11%) e GHARS (5,9%). Em comparação, nos respectivos grupos controle negativo, a formação de matriz osteóide neoformada mostrou-se bastante

reduzida aos 120 dias: GF (23%), GC (22%), GHAF (5,4%) e GHA (3,9%). O aumento significativo da neoformação óssea deve-se ao fato de o estrôncio possuir atuação dual, agindo de forma simultânea na estimulação da secreção de matriz osteóide, via ativação de pré-osteoblastos, e na redução da sua reabsorção, via inibição de pré-osteoclastos e indução da apoptose dos osteoclastos, o que leva à prevenção da perda óssea e aumento da sua massa e da sua resistência (FARLAY et al., 2005; MARIE, 2006; REGINSTER et al., 2008).

É válido ressaltar que, nos grupos GCRS e GFRS, em que não houve implantação das microesferas de HA, os melhores resultados foram obtidos quanto à neoformação óssea, pois, logo aos 15 dias, foi observada que a ocupação linear de matriz osteóide neoformada correspondeu a, aproximadamente, dois terços do defeito. Aos 120 dias, este tecido ocupou, aproximadamente, quatro quintos do defeito e apenas a região correspondente à sutura interparietal encontrava-se com ausência de matriz osteóide neoformada na extensão linear do defeito.

A presença do elemento estrôncio foi comprovada no nosso estudo, no GCRS aos 120 dias, a partir de imagens por MEV, MET, que foram analisadas pelo EDS. Detectou-se pico de estrôncio em regiões de borda óssea e de osso neoformado, o que poderia estar correlacionado com maior percentual de matriz osteóide neoformada nos animais que foram submetidos ao tratamento com o ranelato de estrôncio. O medicamento composto por ranelato de estrôncio mostra-se seguro, por não afetar o perfil mineral do tecido ósseo e não alterar os parâmetros da rede cristalina. Este medicamento provavelmente age estimulando a diferenciação de pré-osteoblastos, e inibindo a diferenciação dos pré-osteoclastos, bem como estimulando a apoptose dos osteoclastos (BOIVIN et al., 1996; BOIVIN; MEUNIER, 2003; AMMANN et al., 2004; REGINSTER et al., 2005; CEBESOV et al., 2007; ROSCHGER et al., 2010).

A interação do estrôncio com o osso ocorre por meio de trocas iônicas com o cristal de HA, pela sua adsorção na superfície dos cristais de HA ou pela substituição de íons cálcio por íons estrôncio no interior da sua rede cristalina. O raio iônico do estrôncio (1,13 Å) é maior do que o do cálcio (0,99 Å), conseqüentemente, os íons cálcio serão preferidos em relação aos íons estrôncio, e a quantidade de substituições nos cristais de HA do tecido ósseo é relativamente baixa. No tratamento com ranelato de estrôncio, a incorporação do estrôncio no cristal de

apatita é feita pela troca de, aproximadamente, um íon estrôncio a cada 10 íons cálcio, o que não afeta o padrão de deposição da matriz colagênica nem o grau de mineralização do tecido ósseo, mas promove o aumento da resistência óssea (BOIVIN et al., 1996; BOIVIN; MEUNIER, 2003; AMMANN et al., 2004; REGINSTER et al., 2005; ROSCHGER et al., 2010).

Foi realizado um trabalho de dissertação de mestrado por uma integrante do nosso grupo de pesquisa (NASCIMENTO, 2010), que consistiu fundamentalmente na realização de análise plasmática das concentrações dos elementos cálcio e estrôncio dos animais utilizados no presente estudo que compuseram os grupos GC, GCRS, GFRS, GHAFRS e GHARS. Dentre os quatro grupos tratados com o medicamento, o que apresentou menores concentrações plasmáticas de estrôncio em relação aos demais grupos analisados foram os grupos em que houve a implantação das microesferas de HA. Além disso, estes grupos apresentaram maiores concentrações plasmáticas de cálcio. Isso provavelmente ocorreu devido às trocas iônicas estabelecidas entre os fluidos biológicos e as microesferas de HA, possivelmente pela incorporação do estrôncio nos cristais que compuseram as microesferas de HA (WANG; YE, 2008; TIAN et al., 2009; QIU et al., 2006).

O estrôncio ainda está associado ao aumento da expressão de osteoprotegerina e à inibição da expressão RANKL, que pode levar à redução na formação dos osteoclastos e à indução da apoptose dessas células. Tais efeitos parecem ser mediados pela ativação do receptor sensível ao cálcio (MARIE, 2006; BONNELYE et al., 2008; ATKINS et al., 2009; BRENNAN et al., 2009; HURTELLEMAIRE et al., 2009; FROMIGUÉ et al., 2009). Adicionalmente, a incorporação de estrôncio ao osso é mais rápida no processo de regeneração tecidual óssea, com formação de tecido ósseo *de novo*, do que durante a renovação para a manutenção da homeostase no osso antigo (DAHL et al., 2001; AMMANN et al., 2004; PHILLIPS, 2005).

Apesar de ter havido o maior percentual de matriz osteóide neoformada no GCRS, observou-se que houve uma aceleração no processo de maturação óssea no GFRS, pois, no ponto biológico de 15 dias, em algumas regiões do defeito, já existiam áreas com neoformação de matriz osteóide mais organizadas, com aspecto lamelar e presença de medula óssea. De acordo com dados da literatura, espera-se que, em ratos adultos, a formação de osso lamelar ocorra, fisiologicamente, após 3 a

4 semanas do estabelecimento da lesão (EINHORN, 2005; PHILLIPS, 2005). Além do potencial osteogênico atribuído ao estrôncio, esta aceleração na maturação óssea que ocorreu no GFRS pode ser justificada por estudos experimentais realizados *in vitro* e *in vivo*, que evidenciam o potencial osteogênico da fibrina, que é um polímero natural atóxico, absorvível e capaz de auxiliar no reparo ósseo pelo estímulo à angiogênese, o que favorece o aporte de células mesenquimais indiferenciadas ao leito receptor, sua adesão, diferenciação em células da linhagem osteoblástica, proliferação dessas células e secreção de matriz osteóide (TAKEY et al., 1995; BOOTLE-WILBRAHAM et al., 2001; SCHMOEKEL et al., 2005; OSATHANON et al., 2008).

A regeneração de defeitos ósseos críticos representa um desafio para a bioengenharia tecidual. A busca de novas estratégias regenerativas fundamentadas na formação óssea, a partir da atuação local de biomateriais, e sistêmica, por meio da utilização de fármacos, torna-se promissora.

***Conclusão***



## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais deste estudo, conclui-se:

- A administração do ranelato de estrôncio promoveu a regeneração parcial do defeito ósseo, sem o restabelecimento do volume ósseo original, com maior percentual de neoformação óssea quando utilizado sem associação com biomateriais;
- O elemento estrôncio foi incorporado à estrutura do tecido ósseo quando houve a administração do ranelato de estrôncio;
- As microesferas de HA foram biocompatíveis, atuaram, fundamentalmente, como biomaterial para preenchimento do defeito ósseo, e o seu potencial osteogênico restringiu-se à osteocondutividade;
- O selante de fibrina mostrou-se eficaz como agente aglutinante e acelerou a maturação óssea quando associado exclusivamente com o ranelato de estrôncio.

***Referências***

## REFERÊNCIAS

ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical-size calvarial defects. **The Journal of Materials Science**, v. 22, n. 4, p. 997-1004, 2011.

AMMANN, P. et al. Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 12, p. 2012-2020, 2004.

ANDERSON, M. L. et al. Critical size defect in the goat's os ilium. A model to evaluate bone grafts and substitutes. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 364, p. 231-239, 1999.

ANDERSON, H. C. Matrix vesicles and calcification. **Current Rheumatology Reports**, v. 5, n. 3, p. 222-226, 2003.

ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, v. 20, n. 2, p. 86-100, 2008.

ANDERSON, J. M. The cellular cascades of wound healing. In: DAVIES, J. E. (Edit.). **Bone Engineering**. 1. ed. Toronto, Canada: Squared incorporated, 2000, p. 81-93.

ANDRADE, A. D. et al. Biologia óssea: uma revisão da literatura. **Revista Implant News**, v. 4, n. 6, p. 659-662, 2007.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, n. 7, p. 667-681, 2000.

ARAUJO, M. G. et al. Lateral ridge augmentation by the use of grafts comprised of autologous bone or a biomaterial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, n. 12, p. 1122-1131, 2003.

ARAUJO, M. G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 2, p. 212-218, 2005.

ATKINS, G. J. et al. Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. **Osteoporosis International**, v. 20, n. 4, p. 653-64, 2008.

AUBIN, J. E.; LIU, F. The osteoblast lineage. In: Bilizekian, J., Raisz, L., and Rodan, G., editors. **Principles of Bone Biology**. San Diego, CA: Academic press: 1996, p. 39-50.

BALCERZAK, M et al. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. **Acta Biochimica Poloica**, v. 50, n. 4, p. 1019-1038, 2003.

BARRALET, J. et al. Thermal decomposition of synthesized carbonate hydroxyapatite. **The Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 13, n. 6, p. 529-533, 2002.

BARRIAS, C. C. et al. Calcium Phosphate Microsphere for Localised Delivery of a Therapeutic Enzyme. **Key Engineering Materials**, v. 309-311, p. 903-906, 2006.

BARRIAS, C. C.; RIBEIRO, C. C.; RODRIGUES, D.; MIRANDA, M. C. S. Effect of calcium phosphate addition to alginate microspheres: modulation of enzyme release kinetics and improvement of cell adhesion. **Key Engineering Materials**, v. 284-286, p. 689-692, 2005.

BAXTER, L. C. et al. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. **European Cells & Materials Journal**, v. 30, n. 4, p. 1-17, 2002.

BECK, G. R. Jr. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 90, n. 2, p. 234-243, 2003.

BEZERRA, M. C. et al. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 2, p. 161-170, 2005.

BOIVIN, G. et al. Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11, n. 9, p. 1302-1311, 1996.

BOIVIN, G.; MEUNIER, P. J. The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research. **Osteoporosis International**, v. 14, Supl. 3, S. 19-24, 2003.

BONNELYE, E. et al. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro.

**Bone**, v. 42, n. 1, p. 129-138, 2008.

BOOTLE-WILBRAHAM, C. A. et al. Fibrin fragment E stimulates the proliferation, migration and differentiation of human microvascular endothelial cells in vitro.

**Angiogenesis**, v. 4, n. 4, p. 269–275, 2001.

BOROJEVIC, R. Terapias Celulares e Bioengenharia. **Gazeta Médica da Bahia**. v. 78, supl. 1, p. 42-46, 2008.

BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 9, n. 4, p. 310-316, 1998.

BOSKEY, A. L. Mineralization of bones and teeth. **Elements**, v. 3, n. 6, p. 385-391, 2007.

BOYDE, A. et al. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. **Bone**, v. 24, n. 6, p. 579-589, 1999.

BRAZ, F. et al. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 19-24, 2003.

BRENNAN, T. C. et al. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 7, p. 1291-300, 2009.

BRUYÈRE, O. et al. Relationship between change in femoral neck bone mineral density and hip fracture incidence during treatment with strontium ranelate. **Current Medical Research and Opinion**, v. 23, n. 12, p. 3041-3052, 2007.

BURG, K. J. L.; PORTER, S.; KELAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**. v. 21, n. 23, p. 2347-2359, 2000.

CACCIAFESTA, V. et al. Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects. **European Journal of Orthodontics**, v. 23, n. 6, p. 733-740, 2001.



CAPUCCINI, C. et al. Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: in vitro osteoblast and osteoclast response. **Acta Biomaterialia**, v.4, n.6, p.1885-1893, 2008.

CARANO, A. D.; FILVAROFF, E. H. Angiogenesis and bone repair. **Drug discovery today**, v. 8, n. 21, p. 980-984, 2003.

CARDOSO, A. K. et al. Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. **Cells, Tissues, Organs**, v. 184, n. 3-4, p. 128-137, 2006.

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.

CARVALHO, P. S. P.; BASSI, A. P. F.; VIOLIN, L. A. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. **Revista Implant News**, v. 1, n. 3, p. 255-259, 2004.

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

CHAN, S. M.; BOISJOLY, H. Advances in the use of adhesives in ophthalmology. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 15, n. 4, p. 305-310, 2004.

CONZ, M. B.; GRANJEIRO, J. M.; SOARES, G. A. Hydroxyapatite crystallinity does not affect the repair of critical size bone defects. **Journal of Applied Oral Science**, v. 19, n. 4, p. 337-342, 2011.

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

CORREA, B. S.; BICAS, H. E. A. Estudo sobre a aplicabilidade de adesivos biológicos à reinserção de músculo ocular externo em coelhos – I Experimento I - Medidas dos tempos dos procedimentos, das forças de adesão mioescleral e estudos clínico e histopatológico. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 68, n. 5, p. 599-607, 2005.

- COSTA, R. C. C.; MIGUEL, F. B.; ROSA, F. P. Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 4, n. 1, p. 70-76, 2005.
- DAHL, S. G. et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. **Bone**, v. 28, n. 4, p. 446-453, 2001.
- DACULSI, G. Micro Macroporous Calcium Phosphate Bioceramics, **Business Briefing: Global Surgery**, p. 1-4, 2004.
- DEE, K. C. et al. Research report: learning styles of biomedical engineering students. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 30, n. 8, p. 1100-1106, 2002.
- DELACURE, M. Physiology of bone healing and bone grafts. **Otolaryngologic clinics of North America**, v. 27, n. 5, p. 859-874, 1994.
- DELANNOY, P.; BAZOT, D.; MARIE, P. J. Long-term treatment with strontium ranelate increases vertebral bone mass without deleterious effect in mice. **Metabolism**, v. 51, n. 7, p. 906-911, 2002.
- DERUBEIS, A. R.; CANCEDDA, R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, p. 160-165, 2004.
- DIETMAR, W. H.; GARCIA, A. J. Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells. **Gene**, v. 347, n. 1, p. 1-10, 2005.
- DUCHEYNE, P.; QIU, Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. **Biomaterials**, v. 20, n. 23-24, p. 2287-2303, 1999.
- EINHORN, T. A. The science of fracture healing. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 19, suppl. 10, S. 4-6, 2005.
- FARLAY, D. et al. Long-term strontium ranelate administration in monkeys preserves characteristics of bone mineral crystals and degree of mineralization of bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 9, p. 1569-1578, 2005.
- FONSECA, J. E. Rebalancing bone turnover in favour of formation with strontium ranelate: implications for bone strength. **Rheumatology**, v. 47, p. iv17-iv19, 2008.

FLECKENSTEIN, K. B. et al. Effect of a hydroxyapatite tricalcium phosphate alloplast on osseous repair in the rat calvarium. **Journal of Periodontology**, v. 77, n. 1, p. 39-45, 2006.

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**, v. 13, n. 8B, p. 2189-2199, 2009.

FULMER, M. T. et al. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. **Biomaterials**, v. 23, n. 3, p. 751-755, 2002.

GARG, A. K. **Grafting Materials in Repair and Restoration**. In: Tissue Engineering – Applications in Maxillofacial. Surgery and Periodontics. Cap. 5, Quintessence. Books (Publishing) 1999.

GAROFALO, G. S. Autogenous, allogenic and xenogenetic grafts for maxillary sinus elevation: literature review, current status and prospects. **Minerva Stomatologica**, v. 56, n. 7-8, p. 373-392, 2007.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULUS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: An update. **Injury**, Bristol, v. 36, n. 3, p. S20-S27, 2005.

GOSAIN, A. K. et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 109, n. 2, p. 619-630, 2002.

GREEN, D. et al. The potential of biomimesis in bone tissue engineering: lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons. **Bone**, v. 30, n. 6, p. 810-815, 2002.

HABIBOVIC, P. et al. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. **Biomaterials**, v. 29, n. 7, p. 944-953, 2008.

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I.I. Bone remodeling. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1092, p. 385-396, 2006.

HEANEY, R. P. How does bone support calcium homeostasis? **Bone**, v. 33, n. 3, p. 264-268, 2003.

HENCH, L. L. Bioceramics. **The Journal of the American Ceramic Society**, v. 81, n. 7, p. 1705-1728, 1998.

HING, K. A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? **Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series A**, v. 362, n. 1825, p. 2821-2850, 2004.

HOLZER, G. et al. Hip fractures and the contribution of cortical versus trabecular bone to femoral neck strength. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 3, p. 468-74, 2009.

HOTT, M. et al. S12911-2 reduces bone loss induced by short-term immobilization in rats. **Bone**, v. 33, n. 1, p. 115-123, 2003.

HURTEL-LEMAIRE, A. S. et al. The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways. **Journal of Chemical Biology**, v. 284, n. 1, p. 575-584, 2009.

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. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 7, p. 1217-1224, 2008.

JOVANOVIC, S. A., NEVINS, M. Bone formation utilizing titanium-reinforced barrier membranes. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 15, p. 57-69, 1995.

KANIA, R. et al. Addition of fibrin sealant to ceramic promotes bone repair: long term study in rabbit femoral defect model. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 43, n. 1, p. 38-45, 1998.

KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 518-522, 2000.

KAY, M. I.; YOUNG, R. A.; POSNER, A. S. Crystal structure of hydroxyapatite. **Nature**, v. 12, n. 204, p. 1050-1052, 1964.

KIM, S. S. et al. Poly (lactide-coglycolide)/ hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 8, p. 1399-1409, 2006.

KRISHNAN, L. K. et al. Fibrinolysis inhibitors adversely affect remodeling of tissues sealed with fibrin glue. **Biomaterials**, v. 24, n. 2, p. 321-327, 2003.

LACERDA, K. A.; LAMEIRAS, F. S.; SILVA, V. V. Síntese e caracterização de matrizes porosas de hidroxiapatita para aplicação como fontes radioativas em braquiterapia. **Revista Escola de Minas**, v. 59, n. 2, p. 217-223, 2006.

LANGER, R. S.; VACANTI, J. P. Tissue engineering: the challenges ahead. **Scientific American**, v. 280, n. 4, 1999.

LAURENT, J. J. et al. The use of bone morphogenetic protein-6 gene therapy for percutaneous spinal fusion in rabbit. **Journal of Neurosurgery**, v. 1, n. 1, p. 90-94, 2004.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 395, p. 81-98, 2002.

LE GUÉHENNEC, L.; LAYROLLE, P.; DACULSI, G. A review of bioceramics and fibrin sealant. **European Cells and Materials**, v. 8, p. 01-11, 2004.

LE NIHOUANEN, D. Bone tissue formation in sheep muscles induced by a biphasic calcium phosphate ceramic and fibrin glue composite. **The Journal of Materials Science**, v. 19, n. 2, p. 667-675, 2008.

LE NIHOUANEN, D. et al. Osteogenic properties of calcium phosphate ceramics and fibrin glue based composites. **The Journal of Materials Science**, v. 18, n. 2, p. 225-235, 2007.

LIM, S. C.; LEE, M. J.; YEO, H. H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. **Pathology International**, v. 50, n. 8, p. 594-602, 2000.

LOGEART-AVRAMOGLU, D. et al. Engineering bone: challenges and obstacles. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, n. 1, p. 72-84, 2005.

LONG, P. H. Medical devices in orthopedic applications. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 1, p. 85-91, 2008.

LYNCH, S. E.; GENKO, R.; MARX, R. Tissue engineering application in maxillofacial surgery and periodontics, **Quintessence**, v. 5, p. 93-112, 1999.

MAÏMOUN, N. et al. Strontium ranelate improves implant osseointegration, **Bone**, v. 46, 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 Engineering**, v. 13, n. 5, p. 947-955, 2007.

MARIE, P. J. et al. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. **Calcified Tissue International**, 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**, v. 18, Supl. 1, S11-15, 2006.

MASTROGIACOMO, M. et al. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. **Orthodontics & Craniofacial Research**, v. 8, n. 4, p. 277-284, 2005.

MEGHJI, S. Bone remodelling. **Brazilian Dental Journal**, v. 172, n. 6, p. 235-242, 1992.

MEINEL, L. et al. Silk implants for the healing of critical size bone defects. **Bone**, v. 37, n. 5, p. 688-698, 2005.

MEUNIER, P. J. The Effects of Strontium Ranelate on the Risk of Vertebral Fracture in Women with Postmenopausal Osteoporosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 5, p. 459-68, 2004.

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**. 158f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2008.

MIGUEL, F. B. et al. Morphological assessment of the behavior of threedimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v. 78, n. 2, p. 334-339, 2006.



MIRANDA, F. C. et al. Injeção percutânea de trombina guiada por ultra-som com Doppler colorido para o tratamento de pseudo-aneurismas femorais. **Einstein**, v. 6, n. 4, p. 428-33, 2008.

MULLIKEN, J. et al. Use of demineralized allogeneic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities. **Annals of Surgery**, v. 194, n. 3, p. 366-372, 1980.

NAIR, M. B.; VARMA, H. K.; JOHN, A. Platelet-rich plasma and fibrin glue-coated bioactive ceramics enhance growth and differentiation of goat bone marrow-derived stem cells. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, n. 7, p. 1619-1631, 2009.

NAKADE, O. et al. Effect of extracellular calcium on the gene expression of bone morphogenetic protein-2 and -4 of normal human bone cells. **The Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 13-19, 2001.

NAKAMURA, M. et al., Interaction of a blood coagulation factor on electrically polarized hydroxyapatite surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 82, n. 1, p. 29-36, 2007.

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

NEVINS, M.; MELLONIG, J. T. The advantages of localized ridge augmentation prior to implant placement. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 14, n. 2, p. 97-111, 1994.

NIHOJANNEN, D. L. et al. Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 13, p. 2716-2722, 2006.

OKAMOTO, T. et al. Interference of the blood clot on granulation tissue formation after tooth extraction. Histomorphological study in rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 5, n. 2, p. 85-92, 1994.

OKAMOTO, T. et al. Osseous regeneration in the presence of fibrin adhesive material (Tissucol) and epsilon-aminocaproic acid (EACA). **Brazilian Dental Journal**, v. 6, n. 2, p. 77-83, 1995.

OSATHANON, T. et al. Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n.30, p. 4091-4099, 2008.

PAN, H.; JIANG, H. L.; CHEN, W. L. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-coglycolide. **Biomaterials**, v. 27, n. 17, p. 3209-3220, 2006.

PARFITT, A. M. Life history of osteocytes: relationship to bone age, bone remodeling, and bone fragilit. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 2, n. 6, p. 499-500, 2002.

PATEL, N. et al. In vivo assessment of hydroxyapatite and silicate-substituted hydroxyapatite granules using an ovine defect model. **The Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, n. 5, p. 429-440, 2005.

PETERSON, L. J. et al. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

PHILLIPS, A. M. Overview of the fracture healing cascade. **Injury**, v. 36, supl. 3, S5-7, 2005.

QIU, K. et al. Effect of strontium ions on the growth of ROS 17/ 2.8 cells on porous calcium polyphosphate scaffolds. **Biomaterials**, v. 27, p. 1277-1286, 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 Rheumathology**, v. 58, n. 6, p. 1687-1695, 2008.

REGINSTER, J. Y. et al. Strontium ranelate: a new paradigm in the treatment of osteoporosis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 13, n. 7, p. 857-864, 2004.

REY, C. et al. Bone mineral: update on chemical composition and structure. **Osteoporosis International**, v. 20, n. 6, p. 1013-1021, 2009.

REY, C. et al. Chemical diversity of apatites. **Advances in Science and Technology**, v. 49, p. 27-36, 2006.

RHO, J. Y.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Medical Engineering & Physics**, v. 20, n. 2, p. 92-102, 1998.

RIBEIRO, C. C.; BARRIAS, C. C.; BARBOSA, M. A. Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 4363-4373, 2004.

RIMINUCCI, M.; BIANCO, P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 8, p. 1027-1036, 2003.

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

ROSCHGER, P. et al. Bone material quality in transiliac bone biopsies of postmenopausal osteoporotic women after 3 years of strontium ranelate treatment. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 4, p. 891-900, 2010.

ROSA, A. L.; SHAREEF, M. Y.; NOORT, R. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 273-277, 2000.

ROSE, F. R. A. et al. In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. **Biomaterials**, v. 25, n. 24, p. 5507-5514, 2004.

ROSE, F. R. A.; OREFFO, R.O.C. Bone tissue engineering: hope vs hype. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, n. 1, p. 1-7, 2002.

SAADEH, P. B. et al. Repair of a critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 12, n. 6, p. 573-573, 2001.

SANDEEP, G. et al. Characterization of novel bioactive glass coated hydroxyapatite granules in correlation with in vitro and in vivo studies. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, v. 19, n. 2, p. 99–107, 2006.

SANTIN, M. et al. Calcium-binding phospholipids as a coating material for implant osteointegration. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 3, n. 7, p. 277-281, 2006.

SCHLEGEL, K. A.; LANG, F. J.; DONATH, K.; KULOW, J. T.; WILTFANG, J. The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v. 102, n. 1, p. 7-13, 2006.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 205, p. 299-308, 1986.

SCHMOEKEL, H. G. et al. Bone repair with a form of BMP-2 engineered for incorporation into fibrin cell ingrowth matrices. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova York, v. 89, n. 3, p. 253-262, 2005.

SEAL, B. L.; OTERO, T. C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science and Engineering**, v. 34, p. 147-230, 2001.

SICCA, C. M. et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos: efeito do tamanho da partícula. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v. 8, n. 1/2, p. 1-10, 2000.

SIVAKUMAR, M.; PANDURANGA RAO, K. Preparation, Characterization and In Vitro Release of Gentamicin from Coralline Hydroxyapatite-Gelatin Composite Microspheres. **Biomaterials**, v. 23, n. 15, p. 3175-3181, 2002.

SPOTNITZ, W. D.; PRABHU, R. Fibrin sealant tissue adhesive-review and update. **Journal of Long-Term Effects of Medical Implants**, v. 15, n. 3, p. 245-270, 2005.

SODEK, J.; MCKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology 2000**, v. 24, p. 99-126, 2000.

STANFORD, J. W. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. **International Dental Journal**, v. 30, n. 2, p. 140-188, 1980.

STEVENS, M. M.; GEORGE, J. H. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. **Science**, v. 310, n. 18, p. 1135-1138, 2005.

TADIC, D.; BECKMANN, F.; SCHWARZ, K.; EPPLE, M. A novel method to produce hydroxyapatite objects with interconnecting porosity that avoids sintering. **Biomaterials**, v. 25, n. 16, p. 3335-3340, 2004.

TAKANO, Y. et al. Differential involvement of matrix vesicles during the initial and appositional mineralization processes in bone, dentin, and cementum. **Bone**, v. 26, n. 4, p. 333-339, 2000.

TAKEI, A. et al. Effects of fibrin on the angiogenesis in vitro of bovine endothelial cells in collagen gel. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 31, n. 6, p. 467-472, 1995.

TANAKA, Y.; HIRATA, Y.; YOSHINAKA, R. Synthesis and characteristics of ultrafine hydroxyapatite particles. **Journal of Ceramic Processing Research**, v. 4, n. 4, p. 197-201, 2003.

TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484; p. 1504-1508, 2000.

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

TURNER, C. H. Homeostatic control of bone structure: An application of feedback theory. **Bone**, v. 12, n. 3, p. 203-207, 1991.

UEDA, M. et al. Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery. **Materials Science and Engineering**, v. 13, n. 1-2, p. 7-14, 2000.

UEMURA, T. et al. Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2277-2286, 2003.

VENUGOPAL, J.; RAMAKRISHNA, S. Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 125, n. 3, p. 147-158, 2005.

- VIATEAU, V. et al. Long-bone critical size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, n. 6, p. 741-749, 2007.
- WANG, X.; YE, J. Variation of crystal structure of hydroxyapatite in calcium phosphate cement by the substitution of strontium ions. **The Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 3, p. 1183-1186, 2008.
- WATAHA, J. C. Principles of biocompatibility for dental practitioners. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 86, n. 2, p. 203-209, 2001.
- YANG, Y.; DENNISON, D.; ONG, J. L. Protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to hydroxyapatite of different crystallinities. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 20, n. 2, p. 187-92, 2005.
- YOH, R., et al. Biomimetic fabrication of fibrin/apatite composite material, **Journal of Biomedical Materials Research: Part A**, v. 87, n. 1, p.222-228, 2008.
- YÜCEL, E. A. et al. Effects of fibrin glue on wound healing in oral cavity. **Journal of Dentistry**, v. 31,n. 8, p. 569-575, 2003.
- ZHANG, H. et al. Precipitation of biocompatible hydroxyapatite whisker from moderately acidic solution. **Ceramics International**, v. 29, n. 4, p. 413-418, 2003.
- ZHANG, Y. F. et al. Three-dimensional nanohydroxyapatite/ chitosan scaffolds as potential tissue-engineered periodontal tissue. **The Journal of Biomaterials Applications**, v. 21, n. 4, p. 333-349, 2007.



**Анехо**

## ANEXO



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**  
**COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**  
 Av. Universitária, S/N - Módulo I - 44.031-460 - Feira de Santana -Ba -  
 Fone: (75) 3224-8398

Feira de Santana, 26 de agosto de 2009.

### PARECER

O projeto N° 003/2009, "AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA, RADIOGRÁFICA E BIOQUÍMICA DA UTILIZAÇÃO DE MICROSFERAS DE HIDROXIAPATITA NO REPARO DE DEFEITO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATO", de autoria dos estudantes: Ana Clara Alves de Carvalho, Isabela Cerqueira Barreto, Luciana Soares de Almeida Freitas Oliveira e Marion Alves do Nascimento, sob a orientação dos professores Dr. Aryon de Almeida Barbosa Junior e Dra. Fabiana Paim Rosa, incluiu na versão final as modificações e correções encaminhados pelo parecerista (1º e 2º pareceres), as quais foram aceitas pela autora no Item Objetivo Geral e no Formulário do Protocolo Experimental.

Diante do exposto, sou **favorável** à execução do projeto, conforme reunião de conselho do CEUA/UEFS do dia 26 Agosto de 2009.

  
 Prof. Dra. Ana Cerilza Santana Melo  
**Coordenadora do CEUA/UEFS**

**Port. 497/2008**

Prof.ª Dr.ª Ana Cerilza Santana Melo  
 Coordenadora do CEUA  
 Comitê de Ética no Uso de Animais  
 CEUA/UEFS  
 Port. 497/2008



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>