

Ana Emília Holanda Rolim

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



Estudo *in vivo* de materiais
biomiméticos, associados ou não à
administração enteral de estrôncio, para
o reparo de defeito ósseo

Salvador
2013



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

ANA EMÍLIA HOLANDA ROLIM

**ESTUDO *IN VIVO* DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS, ASSOCIADOS OU NÃO À
ADMINISTRAÇÃO ENTERAL DE ESTRÔNCIO, PARA O REPARO DE DEFEITO
ÓSSEO**

Salvador
2013

ANA EMÍLIA HOLANDA ROLIM

**ESTUDO *IN VIVO* DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS, ASSOCIADOS OU NÃO À
ADMINISTRAÇÃO ENTERAL DE ESTRÔNCIO, PARA O REPARO DE DEFEITO ÓSSEO**

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

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

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Malta Rossi

Salvador
2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

R748 Rolim, Ana Emília Holanda

Estudo *in vivo* de materiais biomiméticos, associados ou não à administração enteral de estrôncio, para o reparo de defeito ósseo. / Rolim, Ana Emília Holanda Rolim. – Salvador, 2013.

215 f.:Il. color.

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

Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Malta Rossi

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1. Biologia Celular. 2. Materiais Biocompatíveis. 3. Ossos
4. Hidroxiapatita. 5. Estrôncio. I. Rosa, Fabiana Paim. II. Rossi,
Alexandre Malta III. Universidade Federal da Bahia. Instituto
de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 577

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 dois dias do mês de dezembro de dois mil e treze, 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 Doutoranda **Ana Emília Holanda Rolim**, através da Comissão Julgadora composta pelos **Professores Fabiana Paim Rosa, Eudes da Silva Velozo e Márcio Luis Ferreira Nascimento, Luís Alberto dos Santos e Mônica Diuana Calasans Maia**. O título da Tese apresentada foi **Estudo *in vivo* de materiais biomiméticos, associados ou não à administração de estrôncio, para o reparo de defeitos ósseos**. Ao final dos trabalhos, os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa Aprovada
Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo APROVADA
Prof. Dr. Márcio Luis Ferreira Nascimento aprovada
Prof. Dr. Luís Alberto dos Santos APROVADO
Profa. Dra. Mônica Diuana Calasans Maia 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, 02 de dezembro de 2013

Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa Fabiana Paim Rosa
Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo Eudes da Silva Velozo
Prof. Dr. Márcio Luis Ferreira Nascimento Márcio Luis Ferreira Nascimento
Prof. Dr. Luís Alberto dos Santos Luís Alberto dos Santos
Profa. Dra. Mônica Diuana Calasans Maia Mônica Diuana Calasans Maia

Agradecimentos

A Deus, por nos dar o dom da vida e despertar em mim esperança e fortaleza.

Aos meus pais, pelo incentivo e dedicação e pelo amor incondicional.

Ao meu amado esposo Genildo Vasconcelos, pelo carinho e compreensão, meu porto seguro nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Prof^a Dra Fabiana Paim, pela dedicação, profissionalismo, compromisso com a pesquisa e pelos os anos de convivência e amizade que contribuíram para o meu crescimento científico e intelectual.

Ao Prof. Dr. Alexandre Rossi, pela co-orientação, os seus ensinamentos sobre os biomateriais foram valiosos para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Paulo Araújo, coordenador do Programa de Pós Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, pelo empenho e dedicação.

Aos professores da Pós-graduação, a quem tenho respeito e admiração, meus sinceros agradecimentos pelo convívio e por contribuírem na minha formação.

Ao Dr. Aryon Barbosa, pela disponibilidade nos laboratórios do IPAC e do ISS, como também, pela leitura das lâminas histológicas.

À Química, Sílvia Albuquerque, e aos demais colaboradores do CBPF, responsáveis pela confecção e caracterização dos biomateriais.

Ao Prof. Dr. Carlos Maurício Cardeal, pela paciência, auxílio nas análises estatísticas e pela linda homenagem em forma de poesia na qualificação da tese.

Aos professores da banca de qualificação e da defesa, sou grata pelas valiosas dicas e correções.

Ao médico veterinário Orestes Farias e à bióloga Verônica Santos responsáveis pelo biotério da UEMS, por viabilizar os animais e o espaço físico para o desenvolvimento da etapa experimental.

Aos meus queridos colegas e amigos da pós-graduação, pela honra de conhecê-los e compartilhar momentos importantes no decorrer do curso com os quais espero manter o vínculo de amizade.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais no ICS da UFBA, pela simpatia e apoio nos momentos de convívio compartilhados.

Ao prof. Antônio Menezes, pela disponibilidade de realizar parte do experimento no Laboratório de Toxicologia da UFBA e ao técnico Sergio Prates, pelo auxílio nas análises plasmáticas.

Ao Júnior, técnico do biotério, pela colaboração e dedicação no cuidado com os animais.

As técnicas em histologia, Cristina Vasconcelos e Elisângela Ribeiro, pela assistência na confecção das lâminas histológicas e nas etapas laboratoriais.

Aos membros do Comitê de Ética da UEMS, pela aprovação do projeto.

À FAPESB, à CAPES e ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado e auxílio financeiro ao projeto que viabilizou a realização da pesquisa.

Aos animais de laboratório, que com suas vidas, propiciam os experimentos e o progresso da ciência.

A Pedra

"O distraído nela tropeçou...

O bruto a usou como projétil.

O empreendedor, usando-a, construiu.

O camponês, cansado da lida, dela fez assento.

Para meninos, foi brinquedo.

Drummond a poetizou.

*Já, David matou Golias, e Michelangelo extraiu-lhe a mais bela
escultura...*

*E em todos esses casos, a diferença não esteve na pedra, mas no
Homem!*

*Não existe 'pedra' no seu caminho que você não possa aproveitá-
la para o seu próprio crescimento."*

(Fenelon Portilho)

ROLIM, Ana Emília Holanda. **Estudo *in vivo* de materiais biomiméticos, associados ou não à administração enteral de estrôncio, para o reparo de defeito ósseo**. 215 f. il. color. Tese (Doutorado em Processos interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

RESUMO

Os materiais biomiméticos e o fármaco ranelato de estrôncio (RanSr) são promissores ao reparo ósseo pelas suas características físico-químicas, composição e comportamento bioativo. Desse modo, a presente pesquisa se propôs analisar o comportamento biológico da implantação desses biomateriais em defeitos críticos, com ou sem a administração oral do RanSr na regeneração óssea. A amostra com 105 ratos machos, adultos jovens foi avaliada aos 15, 45 e 120 dias. Os sete grupos foram os seguintes: CSDC – Controle sem defeito crítico; CCDC – Controle com defeito crítico preenchido por coágulo. Nos grupos Gel, CH e HAAlg, o defeito ósseo foi preenchido pelos respectivos biomateriais: gelatina, colágeno hidrolisado e hidroxiapatita com alginato; RanSr – Defeito preenchido por coágulo e administração de RanSr; HAAlgRanSr – Defeito preenchido por HAAlg e administração de RanSr. O reparo do defeito ósseo foi analisado por histomorfometria e análise estatística descritiva. Nos grupos com administração de RanSr, realizou-se a análise estatística das concentrações de cálcio (Ca^{+2}) e estrôncio (Sr^{+2}) no plasma que foram determinadas por espectrometria de absorção atômica. No grupo CCDC, a concentração de Ca^{+2} foi aproximadamente 5000x maior do que a concentração de Sr, para todos os pontos avaliados. Essa concentração de Ca^{+2} foi maior, quando comparado com os grupos experimentais, com exceção aos 120 dias no grupo HAAlgRanSr em que houve maior nível de Ca^{+2} plasmático, período que coincide com a fragmentação local do biomaterial. No grupo RanSr, a concentração de Sr^{+2} aumentou enquanto a de Ca^{+2} diminuiu, para todos os pontos biológicos observados. Nesse grupo, os níveis de Sr^{+2} foram maiores, quando comparados aos demais grupos avaliados com a maior concentração de Sr^{+2} aos 15 dias que reduziu nos demais pontos biológicos. No grupo HAAlgRanSr, tanto a concentração de Sr^{+2} quanto a de Ca^{+2} aumentaram progressivamente nos pontos biológicos. Porém, nesse grupo, observou-se que a concentração de Sr^{+2} foi menor e, neste caso, a HAAlg pode ter atuado como um absorvedor do Sr^{+2} . Na histomorfometria, todos os materiais implantados e o fármaco apresentaram potencial osteogênico. Entretanto, as maiores médias das porcentagens de extensão linear óssea (%ELO) e de área óssea formada (%AO) foram para a Gel (%ELO= 63,88% e %AO=46,93%) e o CH (%ELO= 62,73% e %AO=41,30%). A Gel apresentou-se como um arcabouço mais biomimético e biocompatível. Os grupos com HAAlg apresentaram melhor preenchimento do defeito ósseo em espessura (C) [HAAlg: C=16722,76 μm e HAAlgRanSr: C=1868 μm], entretanto, houve uma reação inflamatória intensa nesses grupos, especialmente aos 15 dias. No grupo RanSr, o potencial osteogênico foi maior, quando comparado ao grupo CCDC e à associação no grupo HAAlgRanSr. O arcabouço HAAlg associado ao RanSr não favoreceu o reparo ósseo, possivelmente, devido à intensa reação inflamatória nos grupos com HAAlg. Conclui-se que todos os biomateriais implantados atuaram como arcabouços osteocondutores bioativos, sendo a Gel e o CH mais biomiméticos, e o fármaco RanSr também apresentou potencial osteogênico no reparo ósseo.

Palavras-chave: gelatina - colágeno - hidroxiapatita - alginato - ranelato de estrôncio.

ROLIM, Ana Emilia Holanda. *In vivo study of biomimetic materials, with or without enteral administration of strontium, for bone defect repair*. 215 f. il. color. Theses (Doctorate degree in Interactive processes of systems and organs) – Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2013.

ABSTRACT

Biomimetic materials and drug strontium ranelate (SrRan) are promising for bone repair, by their physico-chemical character, composition and bioactive behavior. Thus, this research aims to analyze the biological behavior of these biomaterials after implantation in critical defects, with or without oral administration of SrRan on bone regeneration. A sample of 105 male rats, young adults was assessed at 15, 45 and 120 days. The seven groups were as follows: CSCD - Control without critical defect; CCDC - Control with critical defect filled with blood clot; In Gel HC and HAAIg groups, the bone defect was filled by its biomaterial, gelatin, hydrolyzed collagen and hydroxyapatite with alginate. In group SrRan - Defect filled with blood clot was administered SrRan and HAAIgSrRan - Defect filled by HAAIg was administered SrRan. The repair of bone defect was analyzed by histomorphometry and descriptive statistics. In groups with administration SrRan we proceeded the statistical analysis of calcium (Ca^{+2}) and strontium (Sr^{+2}) in plasma were determined by atomic absorption spectrometry. CCDC group in the Ca^{+2} concentrations was approximately 5000x higher than the concentration of Sr^{+2} for all points measured. This Ca^{+2} concentration was higher when compared to the experimental groups, except at 120 days in the HAAIgSrRan group, where there was a higher level of plasma Ca^{+2} , a period that coincides with the fragmentation of biomaterial site. In SrRan group, the Sr^{+2} concentration increases while the Ca^{+2} concentration decreases, this was observed for all biological points. In this group Sr^{+2} levels were higher when compared with the other groups studied, with the highest concentration of Sr^{+2} observed at 15 days, reducing the remaining biological points. In HAAIgSrRan group both Sr^{+2} as Ca^{+2} concentrations gradually increased in biological points. However in this group showed that the Sr^{+2} concentrations were lower, and in this case, HAAIg maybe acted as a Sr^{+2} absorber. Histomorphometry, all materials implanted and the drug showed osteogenic potential. However higher percentages, bone linear extension (%LEB) and bone area formed (% BA), were to Gel (%LEB = 63.88% and % BA = 46.93%) and HC (%LEB =62.73% and %BA =41.30%). The Gel was presented as a scaffold more biomimetic and biocompatible. Groups with HAAIg showed better defect fill critical thickness (C) [HAAIg: C = 1868 μm and HAAIgSrRan: C = 16722.76 μm], however, there was an intense inflammatory reaction in these groups, especially at 15 days. In SrRan group, the osteogenic potential was higher when compared to the CCDC and in association for the HAAIgSrRan group. The scaffold HAAIg associated with SrRan was not favorable for bone repair, possibly due to intense inflammatory reaction in the groups with HAAIg. We concluded that all implanted biomaterials acted as osteoconductive bioactive scaffolds, being the more biomimetics Gel and HC, and the SrRan drug also showed osteogenic potential in bone repair.

Key-words: gelatin – collagen – hydroxyapatite – alginate – strontium ranelate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Organização estrutural do osso.....	27
Figura 2	Remodelação óssea.....	33
Figura 3	Obtenção do atelocolágeno por via de digestão enzimática.....	44
Figura 4	Organização tridimensional do colágeno no tecido ósseo.....	45
Figura 5	Representação esquemática da molécula de colágeno.....	46
Figura 6	Padrão estriado das fibras de colágeno.....	47
Figura 7	Ligações cruzadas entre as moléculas de tropocolágeno.....	47
Figura 8	Representação esquemática das microfibrilas.....	48
Figura 9	Colágeno.....	49
Figura 10	Estrutura química do colágeno do tipo I.....	50
Figura 11	Etapas da formação da fibrila de colágeno.....	50
Figura 12	Estrutura microfibrilar do colágeno.....	51
Figura 13	Perfil de aminoácidos da gelatina.....	55
Figura 14	Gelatina: desnaturação do colágeno.....	55
Figura 15	Gelatina e o efeito da temperatura na molécula.....	56
Figura 16	Representação esquemática do processo de renaturação parcial na gelatina.....	56
Figura 17	Arranjo tridimensional da hidroxiapatita.....	61
Figura 18	Célula unitária da hidroxiapatita.....	62
Figura 19	HAP com projeção no plano.....	63
Figura 20	Ácido algínico.....	70
Figura 21	Alginato.....	71
Figura 22	Resíduos do alginato.....	71
Figura 23	Gelificação ionotrópica.....	72
Figura 24	Modelo de caixa de ovos (<i>eggs - box</i>)	73
Figura 25	Produção do fator de necrose tumoral (TNF) de monócitos humanos como resposta aos alginatos com diferentes conteúdos de resíduos de ácido manurônico.....	75
Figura 26	Modelo proposto para a estrutura de rede em géis feitos a partir de alginato com blocos de ácido gulurônico de diferentes comprimentos... ..	79
Figura 27	Ranelato de estrôncio.....	81

Figura 28	Estrutura cristalina do ranelato de estrôncio.....	81
Figura 29	Ação farmacológica do RanSr na linhagem de células mesenquimais da medula óssea.....	87
Figura 30	Ação farmacológica do íon Sr no receptor de cálcio. Ativa as vias de sinalização em osteoblastos e em osteoclastos.....	88
Figura 31	Interação do estrôncio nas vias de sinalização biológica do Wnt, com promoção da osteoblastogênese.....	89
Figura 32	Ação do estrôncio no sistema RANK/RANKL/OPG com redução da osteoclastogênese.....	90
Figura 33	Gelatina.....	96
Figura 34	Micrografia do grânulo de gelatina. Tamanho da imagem; 512 x 384; magnificação 296.84x, 30kV, Barra 20 µm. Região selecionada para análise do EDS em amarelo.....	98
Figura 35	Micrografia dos grânulos de gelatina obtidas por mEV –EDS. Topografia de superfície para a magnificação de 100x, 500x, 1000x.....	99
Figura 36	Colágeno hidrolisado (CH)	102
Figura 37	Micrografia do pó de colágeno hidrolisado por MEV-EDS. Tamanho da imagem 512x384; magnificação 500x, 30 kV e análise química do material.....	103
Figura 38	Micrografia do pó de colágeno hidrolisado por MEV-EDS. Topografia de superfície para a magnificação de 100x, 500x, 1000x.....	104
Figura 39	Preparação das microesferas nanoestruturadas.....	107
Figura 40	Microesferas de hidroxiapatita e alginato.....	108
Figura 41	Micrografia de microesferas de hidroxiapatita por MEV-EDS com magnificação de 200x com 20kv Região selecionada para análise do EDS em verde.....	109
Figura 42	Micrografia de microesferas de hidroxiapatita por MEV. Topografia de superfície e a microporosidade para a magnificação de 250x em A, B C e D.....	109
Figura 43	Micrografia de microesferas de hidroxiapatita por MEV. Topografia de superfície e a microporosidade para a magnificação de 1000x em A, de 2500x em B, de 5000x em C, de 10000x em D, 20000x em E e de 50000x em F. Nestas magnificações é possível observar que a superfície das microesferas apresenta-se bastante irregular formada por um aglomerado de partículas menores. Em F é possível identificar os cristais de HA.....	110
Figura 44	Ranelato de estrôncio e dose administrada na dieta em dieta pastosa..	113
Figura 45	Anatomia da calvária de rato.....	116
Figura 46	Sequência cirúrgica e implantação dos biomateriais.....	117
Figura 47	Punção cardíaca para coleta de sangue.....	118
Figura 48	Desenho esquemático de defeito crítico em calvária de rato.....	122
Figura 49	Padronização das linhas de corte nos espécimes.....	122
Figura 50	Micrografia esquemática da morfometria das calvárias para variáveis: EL, AT, AO, C, B1 e B2.....	124

LISTA DE PRANCHAS

Prancha 1	Fotomicrografias do GSSDC - 15, 45 e 120 dias.....	131
Prancha 2	Fotomicrografias do GCCDC - 15, 45 e 120 dias.....	133
Prancha 3	Fotomicrografias do GGel - 15 dias.....	135
Prancha 4	Fotomicrografias do GGel - 15 e 45 dias	136
Prancha 5	Fotomicrografias do GGel - 120 dias.....	137
Prancha 6	Fotomicrografias do GCH - 15 dias.....	139
Prancha 7	Fotomicrografias do GCH - 15 e 45 dias.....	130
Prancha 8	Fotomicrografias do GCH - 45 e 120 dias.....	141
Prancha 9	Fotomicrografias do GHAAIg - 15 e 45 dias.....	144
Prancha 10	Fotomicrografias do GHAAIg - 120 dias.....	145
Prancha 11	Fotomicrografias do GRanSr - 15 e 45 dias.....	147
Prancha 12	Fotomicrografias do GRanSr - 45 e 120 dias.....	148
Prancha 13	Fotomicrografias do GHAAIgRanSr - 15 dias.....	151
Prancha 14	Fotomicrografias do GHAAIgRanSr - 15 e 45 dias.....	152
Prancha 15	Fotomicrografias do GHAAIgRanSr - 45 dias.....	153
Prancha 16	Fotomicrografias do GHAAIgRanSr - 45 e 120 dias.....	154
Prancha 17	Fotomicrografias do GHAAIgRanSr - 120 dias.....	155

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Espectro obtido por EDS do grânulo de gelatina.....	97
Gráfico 2	Difratograma da gelatina bovina.....	100
Gráfico 3	Espectro obtido por FTIR da gelatina bovina.....	101
Gráfico 4	Espectro obtido por EDS do pó de colágeno bovino hidrolisado.....	102
Gráfico 5	Difratograma do colágeno bovino hidrolisado.....	105
Gráfico 6	Espectro obtido por FTIR do colágeno bovino hidrolisado.....	106
Gráfico 7	Espectro obtido por EDS das microesferas de hidroxiapatitas.....	108
Gráfico 8	Difratograma das microesferas de HAAlg.....	111
Gráfico 9	Espectro obtido por FTIR das microesferas de HAAlg.....	112
Gráfico 10	Concentração plasmática de estrôncio: A) por grupo e B) por ponto biológico aos 15, 45 e 120 dias nos grupos avaliados.....	127
Gráfico 11	Concentração plasmática de cálcio: A) por grupo e B) por ponto biológico aos 15, 45 e 120 dias nos grupos avaliados.....	128
Gráfico 12	Interações entre os grupos com as variáveis analisadas.....	161
Gráfico 13	<i>Boxplots</i> dos grupos com as variáveis analisadas.....	164

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tipos, fórmula química e relação Ca/P das apatitas.....	61
Tabela 2	Número de animais segundo os grupos e pontos biológicos.....	114
Tabela 3	Análise plasmática de estrôncio e cálcio aos 15 dias.....	126
Tabela 4	Análise plasmática de estrôncio e cálcio aos 45 dias.....	126
Tabela 5	Análise plasmática de estrôncio e cálcio aos 120 dias.....	127
Tabela 6	Distribuição das médias e desvios padrão (Dp) de EL de acordo com os grupos no tempo.....	156
Tabela 7	Distribuição das médias e desvios padrão (Dp) de ELO de acordo com os grupos no tempo.....	157
Tabela 8	Distribuição das médias e desvios padrão (Dp) de AT de acordo com os grupos no tempo.....	157
Tabela 9	Distribuição das médias e desvios padrão (Dp) de AO de acordo com os grupos no tempo.....	158
Tabela 10	Distribuição das médias e desvios padrão (Dp) de %ELO de acordo com os grupos no tempo.....	158
Tabela 11	Distribuição das médias e desvios padrão (Dp) de %AO de acordo com os grupos no tempo.....	159
Tabela 12	Distribuição das médias e desvios padrão (Dp) de C de acordo com os grupos no tempo.....	159
Tabela 13	Análise do efeito da interação nas variáveis: EL, ELO, AT, AO e C	163

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%AO	Porcentagem de AO comparado à AT
%AORP	Porcentagem real de preenchimento com matriz osteoide comparado com a média de AO do grupo CSDC por ponto biológico
%EC	Porcentagem real da espessura no centro do defeito comparado com a média de c do grupo CSDC por ponto biológico
%ELO	Porcentagem de ELO comparado à EL
®	Marca registrada
µg/L	Micrograma por litro
µm	Micrometro
Aa	Aminoácidos
<i>ad libitum</i>	Expressão latina que significa “à vontade”
AKT	Proteína quinase B (PKB)
Alg	Alginato
AO	Área da seção transversal de osso neoformado
Asn	Asparagina
AT	Área da seção transversal total do defeito ósseo
B1	Borda óssea 1
B2	Borda óssea 2
BE	Fragmento do biomaterial englobado
BF	Biomaterial fragmentado
BM	Biomaterial
BMP	Proteína óssea morfogenética
BSP	Sialoproteína óssea
C	Espessura no centro do defeito sem incluir o seio sagital
CF	Cápsula fibrosa
C	Eixo c
Ca⁺²	Íon cálcio
CaSR	Receptor sensível ao cálcio extracelular
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CEBPα	Proteína alfa de ligação ao facilitador CCAAT- Atua na diferenciação de células mesenquimais em adipócitos e na adipogênese

CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CF	Cápsula fibrosa
CG	Célula gigante
CH	Colágeno hidrolisado
CI	Células da inflamação
CM	Canal medular
CME	Célula mesenquimal estromal
Col	Colágeno
COX-2	Ciclooxigenase-2
D	Periodicidade axial do colágeno
Di	Díploe
DMO	Densidade mineral óssea
Dp	Desvio padrão
DRESS	Erupção cutânea medicamentosa com eosinofilia e sintomas sistêmicos
DRX	Difração de raios X
E	Edema
EC	Espessura central do osso parietal
EDS	Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
EF	Exudato fibrino-leucocitário
EL	Extensão linear do defeito
ELO	Extensão linear de matriz osteoide
EM	Endóstio
F	Osso frontal
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
FB	Fibroblastos
FC	Fibras colágenas
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FTIR	Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier
G	Resíduos de ácido glucurônico

GCDC	Grupo controle com defeito crítico
GCH	Grupo com implantação de colágeno hidrolisado (Peptan B)
Gel	Gelatina
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
GGel	Grupo com implantação de gelatina
GHAAlg	Grupo com implantação de microesferas de hidroxiapatita e alginato
GHAAlgRanSr	Grupo com implantação de microesferas de hidroxiapatita e alginato e administração de ranelato de estrôncio na dieta
Gln	Glutamina
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GSDC	Grupo controle sem defeito crítico
GSK3	Quinase 3 da Glicogênio Sintase - atua na transcrição e translocação celular juntamente com a β -catenina
H	Hemácias
HÁ	Hidroxiapatita
HAP	Hidroxiapatita sintética pura
HAAAlg	Hidroxiapatita com alginato
HE	Hematoxilina e Eosina
Hip	Hidroxiprolina
HR-pQCT	Tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução
IA	Inflamação aguda
IC	Inflamação crônica granulomatosa
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon gama
IP	Oso interparietal
KDa	Quilodaltons
KGy	Quilogray
L	Lamelas com linhas de deposição cíclica de tecido mineralizado
LBTB	Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais
LEF/TCF	Fatores de transcrição de células T e fator estimulador de linfóides - Reguladores da transcrição nuclear

LPL	Lipoproteína lipase
LRP	Proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade – proteínas de membrana celular
LT	Linha temporal
M	Molar
M	Resíduo de ácido manurônico
Ma	Macrófago
mA	Miliampere
MAPK/ERK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos/ quinases reguladas pelo sinal extracelular
ME	Macrófago espumoso
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mmol/L	Milimol por litro
MMP-1	Metaloproteinase de matriz – 1
MO	Medula óssea
MT	Matriz osteoide
N	Normalidade – relação entre o número de equivalentes-grama do soluto e o volume da solução em litros
Ne	Neutrófilo
NFATc1	Fator nuclear citoplasmático 1 de células T ativadas
NFKB	Fator nuclear kappa B
NM	Núcleos de mineralização
nm	Nanômetros
∅	Diâmetro
OB	Osteoblasto
OC	Osteócito
OCN	Osteocalcina
OE	Osso medular
OH⁻	Hidroxila
OM	Medula óssea
ON	Osso neoformado reparacional
OP	Osteopontina

OPG	Osteoprotegerina
OR	Ossó remanescente da borda óssea
P	Periósteo
Pa	Ossó parietal
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase
PIFG	Pícosírius vermelho
PKCβII	Proteína quinase C beta II
PLL	Poli- L- lisina
PMN	Polimorfonucleares
PPARγ2	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama 2 - Atua na diferenciação de células mesenquimais em adipócitos e na adipogênese
Pro	Prolina
PTH	Paratormônio
q1	Primeiro quartil
q3	Terceiro quartil
RANK	Receptor ativador de fator nuclear kappa – B
RANKL	Ligante do receptor ativador de fator nuclear kappa - B
RanSr	Ranelato de estrôncio
RDM	Região da dura máter
RGD	Tripeptídeo de colágeno (Arginina-Glicina-Aspartato)
Rpm	Rotações por minuto
RRC	Região do retalho cutâneo
Ryk/RhoA	Receptor de tirosina quinase homólogo/família homóloga Ras membro A
S	Sutura
SC	Sutura coronal
SE	Sutura escamosa
SF	Septos fibrosos de tecido conjuntivo
Sf	Sutura frontal
SFM	Sistema fagocitário mononuclear

SI	Sutura interfrontal
SL	Sutura lambdoidea
SPARC	Proteína secretada ácida rica em cisteína ou osteonectina
Sr⁺²	Íon estrôncio
SS	Sutura sagital
T	Ossos temporais
TCD	Tecido conjuntivo fibroso
TCF	Tecido conjuntivo frouxo
TEV	Tromboembolismo venoso
TG	Tricrômico de Goldner
TGF-β1	Fator de crescimento transformante beta 1
TIMP-1	Inibidor tissular de metaloproteinase-1 .
TM	Tecido mineralizado
TOC	Tecido ósseo cortical
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VC	Seio sagital
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VS	Vaso sanguíneo
Wnt	Wingless-related MMTV - Proteína envolvida na sinalização celular - Via de sinalização complexa cujo nome é derivado do gene Wg de <i>Drosophila</i> que, quando mutado, resulta no fenótipo sem asa e do gene INT de vertebrados

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1	TECIDO ÓSSEO, REMODELAÇÃO E REPARO	27
2.2	COLÁGENO E GELATINA	43
2.3	APATITAS BIOLÓGICAS E HIDROXIAPATITA SINTÉTICA	58
2.4	ALGINATO	68
2.5	RANELATO DE ESTRÔNCIO	80
3	OBJETIVOS	93
3.1	OBJETIVO GERAL	94
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	94
4	MATERIAIS E MÉTODOS	95
4.1	BIOMATERIAIS	96
4.2	AMOSTRA	113
4.3	TÉCNICA CIRÚRGICA	114
4.4	ETAPA LABORATORIAL	118
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	123
5	RESULTADOS	125
5.1	RESULTADOS DA ANÁLISE PLASMÁTICA	126
5.2	ANÁLISE QUALITATIVA – DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA	129
5.3	ANÁLISE QUANTITATIVA – HISTOMORFOMETRIA	156
6	DISCUSSÃO	166
7	CONCLUSÕES	186
	REFERÊNCIAS	188
	ANEXOS	210



1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biomateriais que mimetizam o tecido ósseo traz novo enfoque nas perspectivas de tratamento e cura para acidentes com fratura óssea e perda de substância, ou ainda, doenças degenerativas e congênitas em que se constata sequelas deformantes funcionais e/ou estéticas.

O tecido ósseo é complexo no seu metabolismo, sendo hierarquicamente organizado e nanoestruturado (RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998; ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006). Os defeitos esqueléticos variam em tamanho e forma, e tem características específicas, dependendo do local da perda, portanto, requerem materiais biomiméticos, inteligentes para reconstituir os processos biológicos, tridimensionais, nanoestruturados, com características de superfície bioativa para que haja interação celular, com liberação de fatores de crescimento e quimiotáticos favoráveis ao reparo ósseo. Esses são pré-requisitos necessários para que os biomateriais ideais sejam satisfatórios no preenchimento ou reposição do tecido perdido (SHEKARAN; GARCIA, 2011). Ainda não existe nenhum biomaterial que atenda a todos estes pré-requisitos e seja versátil suficiente para ser empregado nas diversas situações clínicas, em especial nos defeitos ósseos críticos.

A bioengenharia tecidual óssea tem como um de seus objetivos superar as limitações dos tratamentos convencionais vigentes, sobretudo sendo capaz de produzir substitutos ósseos biomiméticos e que apresentem tolerância imunológica, o que possibilita sua implantação no paciente sem risco de rejeição pelo organismo (SACHLOS; CZERNUSZKA, 2003).

Os enxertos autógenos são materiais de referência na reparação tecidual por apresentarem propriedades osteogênicas de osteoindução, osteocondução e osteoestimulação e ainda por causarem menor rejeição imunológica, quando comparados aos xenoenxertos e aloenxertos. A composição, os fatores de crescimento, células e matriz extracelular são compatíveis com o local de implantação. No entanto, estes enxertos apresentam limitações como quantidade reduzida, necessidades de internação hospitalar do paciente, de dois tempos cirúrgicos e riscos de morbidade, defeito no sítio de doação e infecção (ZABEU; MERCADANTE, 2008).

Diante dessas limitações, têm-se pesquisado biomateriais miméticos ao tecido ósseo que atuem como arcabouços tridimensionais, sejam bioativos e com

potencial osteogênico. Nesse sentido, destacam-se os polímeros naturais, tais como a gelatina, o colágeno hidrolisado e o alginato. E, semelhante ao componente inorgânico do tecido ósseo, os fosfatos de cálcio, em especial as microesferas de hidroxiapatita sintética, podem ser verdadeiros arcabouços ao reparo ósseo. A constituição físico-química e forma de apresentação desses biomateriais podem favorecer a osteocondução e a regeneração tecidual, além de apresentarem propriedades bioativas (ANDERSON; BURDICK; LANGER, 2004; BURG; PORTER; KELAM, 2000; CHIARA et al., 2012). A gelatina e o colágeno hidrolisado apresentam em sua composição o colágeno semelhante ao da matriz extracelular do tecido ósseo. A deposição de cristais de hidroxiapatita nesse arcabouço provavelmente mimetiza a mineralização fisiológica que ocorre no tecido ósseo (ARAUJO; SANTO-FILHO, 2008). As características desses materiais possivelmente podem auxiliar na adesão, proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras (RODRIGUES, 2009; VARANI et al., 2006).

A gelatina e o colágeno hidrolisado são higroscópicos, hemostáticos e naturalmente apresentam cargas de superfície na molécula da proteína colágena que favorece uma resposta biológica compatível durante a implantação em meio biológico (AZAMI; MOHAMMAD; FATHOLLAH, 2010; LEE, C.; SIGLA; LEE, Y., 2001; VARANI et al., 2006).

A hidroxiapatita com alginato, nanoestruturada, é um biomaterial com composição que também mimetiza a apatita biológica do tecido ósseo. O alginato melhora as características de superfície da HA e a subsequente adesão celular, bem como a biodegradação das esferas (GRÉGOIRE; ORLY; MENTANTEAU, 1990; LAWSON; MOONEY, 2012; LIN; YEH, 2004). Essa forma de apresentação favorece a passagem de fatores de crescimento e a permeabilidade de células entre os interstícios formados entre as microesferas (FLECKENSTEIN et al., 2006; TEIXEIRA, 2009).

Esses biomateriais trazem perspectivas promissoras em relação à osteocondução, proliferação e recuperação do tecido ósseo, tanto na reconstituição da morfologia, quanto no restabelecimento funcional desse tecido. Entretanto, o uso sistêmico de fármacos com estrôncio, como o ranelato de estrôncio, tem demonstrado ser também promissor na terapia regenerativa óssea, tendo em vista que pode acelerar o processo de reparo tecidual. Devido aos mecanismos celulares duais, o estrôncio pode atuar diretamente na sinalização celular em osteoblastos,

com aceleração da formação óssea e ao mesmo tempo inibir a ação de osteoclasto e a reabsorção óssea.

Tendo em vista que o tecido ósseo é dinâmico e interage sistemicamente com o sistema endócrino e imunológico, o desenvolvimento de biomateriais inteligentes, biomiméticos, pode não ser suficiente na modulação do reparo ou da regeneração tecidual óssea. Dessa forma, é imprescindível pesquisas com fármacos que, ao atuarem sistemicamente no metabolismo ósseo, acelerem a reparação tecidual e, associados ou não à terapia local com a implantação de biomatrizes poliméricas ou arcabouços tridimensionais de hidroxiapatita, reconstituam as propriedades fisiológicas e morfológicas do tecido ósseo.



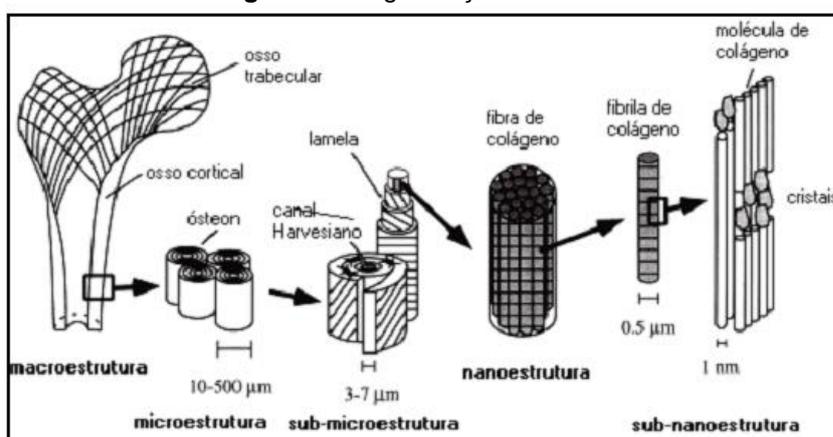
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO, REMODELAÇÃO E REPARO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, mineralizado, constituinte principal do esqueleto, capaz de suportar forças mecânicas e remodelar-se, acomoda os tecidos moles e protege órgãos vitais, participa na realização do movimento no sistema músculo-esquelético. Aloja e protege a medula óssea, formadora de células do sangue. Além disso, este tecido mineralizado contribui na regulação metabólica de íons cálcio, fosfato e magnésio. Os ossos no organismo humano podem ser classificados anatomicamente em: longos, curtos, planos e irregulares, sendo que estes aspectos morfológicos estão relacionados com suas funções fisiológicas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O osso é uma estrutura heterogênea e anisotrópica, hierarquicamente organizada (Figura 1) com um arranjo e orientação de seus componentes irregulares, contudo aperfeiçoados (RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998).

Figura 1 – Organização estrutural do osso



Fonte: RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998.

O conhecimento dos componentes do tecido ósseo e as relações estruturais nos vários níveis de organização são relevantes para entender as propriedades biológicas do osso. Esses níveis e estruturas são divididos em: macroestrutura (osso cortical e esponjoso); microestrutura (sistema Haversiano, ósteons, trabéculas individuais, canais de Volkmann, sistemas intermediários, sistemas circunferenciais interno e externo), sub-microestrutura (lamelas); nanoestrutura (colágeno fibrilar com

fase mineral) e sub-nanoestrutura (estrutura molecular dos elementos constituintes, tais como o mineral, o colágeno e as proteínas não-colágenas) (RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998).

Este tecido macroscopicamente pode se apresentar compacto na região mais periférica dos ossos, denominada cortical e esponjoso ou trabecular contendo espaços intercomunicantes que abrigam a medula óssea. O osso cortical corresponde a cerca de 85% da massa óssea e a um terço do volume do esqueleto. Possui baixa porosidade e baixa relação superfície/volume e, anualmente, remodela-se cerca de 2-3%. O osso trabecular corresponde a cerca de 15% da massa óssea e a dois terços do volume total do esqueleto. O tecido ósseo possui elevada porosidade e relação área/volume, o que acarreta uma maior atividade metabólica, e remodela-se cerca de 24% ao ano (SIMÕES et al., 1995).

As superfícies ósseas, internas e externas, são revestidas, respectivamente pelo endóstio e perióstio. E nos seus aspectos microscópicos, esse tecido pode ser classificado em primário (imaturo) que se apresenta com disposição irregular não organizada das fibras colágenas e menor quantidade de cristais de hidroxiapatita. Ou ainda, como secundário, forma osso esponjoso ou compacto (maduro, haversiano ou lamelar) com fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas ou concêntricas em torno dos canais de Havers (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

O osso imaturo, no período embrionário, é substituído por osso lamelar à medida que o esqueleto se desenvolve; forma o tecido inicial de reparação da fratura e é substituído por osso lamelar à medida que ocorre a remodelação óssea. Esse osso imaturo, quando comparado com o osso lamelar, tem uma velocidade mais rápida de deposição e reabsorção óssea. Há um padrão irregular na disposição das fibrilas colágenas na matriz com aproximadamente quatro vezes mais osteócitos por unidade de volume que o normal e um padrão irregular de mineralização da matriz. Isso distingue o osso imaturo encontrado no calo de fratura do osso lamelar. Em virtude da falta de orientação das suas fibrilas colágenas, da mineralização irregular e da concentração relativamente alta de células e água, o osso imaturo tem maior plasticidade, sendo mais facilmente deformado do que o osso lamelar (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O tecido ósseo é constituído por células, matriz extracelular (MEC) e substância fundamental. As células que compõem esse tecido são: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. A MEC apresenta 65%

de composição inorgânica, principalmente hidroxiapatita, com a presença de íons substituintes, tais como: CO_3^{2-} , Mg^{2+} , F^- , Sr^{2+} , entre outros. No tecido ósseo, 35% da composição é orgânica, principalmente colágeno (Col) tipo I (85-90%) e proteínas não-colágenas (10-15%), tais como osteocalcina, com grande afinidade pelo íon Ca^{+2} ; osteonectina, fibronectina, sialoproteínas, fatores de crescimento e proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs). A substância fundamental é representada pelas glicoproteínas, glicosaminoglicanas, proteoglicanas, fosfoproteínas e água (SIMÕES et al., 1995).

A MEC é uma mistura complexa de proteínas estruturais e funcionais, glicoproteínas e proteoglicanas arrançadas numa estrutura tridimensional única e específica. Essas proteínas atuam no fornecimento de suporte e resistência à tração, sítios de adesão para receptores de superfícies celulares e como reservatórios para sinalização de fatores que modulam processos, tais como, angiogênese, migração, proliferação e orientação celular e, no reparo tecidual (SHEKARAN; GARCIA, 2011).

Nos processos de formação, reabsorção, manutenção e remodelação óssea, participam tipos celulares distintos que derivam de duas linhagens (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008), ambas mesenquimais: célula osteoprogenitora e os hemocitoblastos ou células-tronco hematopoiéticas. A célula osteoprogenitora que origina os osteoblastos permanece como célula óssea de revestimento no perióstio e endóstio. Os hemocitoblastos formam o endotélio vascular e todos os elementos celulares do sangue, tais como os monócitos do sistema fagocitário mononuclear (SFM) e a fusão desses monócitos que atravessam os capilares sanguíneos, originam os osteoclastos (MOTA et al., 2008).

A ação de citocinas osteoprogenitoras participa de modo isolado ou em sinergismo com o estímulo para diferenciação das células mesenquimais em células osteoprogenitoras e dessas para osteoblastos ativos ou em repouso, ou para células ósseas de revestimento. Pode-se citar, por exemplo, a proteína morfogenética óssea - 7 (BMP-7) e fatores de crescimento como a leptina, o fator semelhante à insulina (IGF), o fator de transformação - β (TGF- β) e o fator derivado de plaquetas (PDGF) (DATTA, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os osteoblastos ativos produzem a matriz orgânica do osso, atuam na mineralização por meio da liberação da enzima fosfatase alcalina com o progressivo crescimento dos cristais de hidroxiapatita (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006), na

secreção de vários reguladores como IL-6, TGF- β que agem na proliferação, diferenciação e atividade osteoblástica e Interferon- γ (INF- γ) (RAISZ; RODAN, 1998; TAKAYANAGI, 2005). Os osteoblastos podem também fagocitar os corpos apoptóticos oriundos de outros osteoblastos e/ou células de revestimento ósseo, durante o início da formação óssea (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006). Os osteoblastos também funcionam como receptores e transmissores de sinais para remodelação, pois possuem receptores para hormônios como os da tireoide, da paratireoide (PTH), dos estrogênios, dos glicocorticoides, da insulina e da vitamina D (1,25 dihidroxivitamina D3) (MACKIE, 2003; CERRI, 2005). E, ainda, atuam na remodelação óssea por modificar a matriz adjacente, com a remoção ou a alteração das proteoglicanas ou glicoproteínas (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

Os fatores sistêmicos e locais controlam a proliferação, atividade e sobrevivência dos osteoblastos. Alguns estudos mostram que os osteoblastos e/ou osteócitos entram em apoptose, em consequência, por exemplo, de trauma mecânico (NOBLE, 2005) ou deficiência de estrogênio, e isso parece exercer um importante papel no controle do crescimento ósseo (GARCIA-MORENO et al., 2004).

Os osteoblastos que recobrem as superfícies ósseas são quiescentes, sendo conhecidos como células de revestimento ósseo. Estas células mantêm a homeostase, regulando a concentração plasmática de cálcio e fosfato por mecanismos parcialmente independentes dos relacionados ao sistema de remodelação óssea, sendo consideradas como sítio primário de troca de íons entre o sangue e o osso do adulto. A transição do osteoblasto ativo para células de revestimento ósseo envolve mudanças morfofuncionais graduais que culminam com a diminuição da secreção de proteínas. Essa transformação pode representar o fenótipo final da linhagem osteoblástica. No entanto, estas células que revestem a superfície óssea, com determinados estímulos, podem se diferenciar em osteoblastos ativos (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006). Além disso, acredita-se que sejam responsáveis pela produção de moléculas que ativam a complexa cascata molecular que culmina na remodelação óssea (MILLER; JEE, 1987).

Os osteócitos são células elípticas aprisionadas em lacunas no interior da matriz óssea que possuem diversos prolongamentos citoplasmáticos situados no interior de canaliculos ósseos. É o tipo celular mais abundante no tecido ósseo, indispensável para a manutenção da homeostase óssea, para a captação iônica sérica e remoção de catabólitos teciduais (MOTA et al., 2008).

Entre os prolongamentos dos osteócitos, há junções do tipo *gap*, estes constituem uma complexa rede que interconecta a superfície óssea às porções mais internas. Isso permite responder às modificações sistêmicas, bem como às modificações na superfície óssea; dessa forma, os osteócitos são responsáveis pela manutenção e vitalidade da matriz óssea (RAISZ; RODAN, 1998; KATCHBURIAN; CERRI, 2002).

Os osteócitos são essenciais para a remodelação óssea. A apoptose dessas células, bem como dos osteoblastos, pode atrair e estimular a atividade dos osteoclastos (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleadas da linhagem hematopoiética (KATCHBURIAN; CERRI, 2002). Apesar de a função principal do osteoclasto ser promover a desmineralização e a degradação da matriz óssea, há evidências de que essas células sejam capazes de internalizar e digerir outras células e/ou restos celulares (TANIWAKI; KATCHBURIAN, 1998). Após a reabsorção, os osteoclastos podem migrar para outros sítios onde o tecido ósseo deve ser reabsorvido, ou se deslocar da superfície óssea e permanecer como células inativas. (FUKUSHIMA; BEKKER; GAY, 1991).

O fator de crescimento tumoral (TGF- β) e o estrógeno parecem promover a apoptose de osteoclastos, enquanto o paratormônio (PTH) e a interleucina-1 (IL-1) podem agir como supressores da apoptose, prolongando a atividade osteoclástica (SODEK; MCKEE, 2000).

Além dos elementos celulares, o tecido ósseo é constituído por matriz orgânica. Esta tem, em sua composição, várias proteínas colágenas e não colágenas, tais como colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas, fosfoproteínas e citocinas. Estes componentes interagem entre si organizam-se, e fornecem um arcabouço que permite a deposição de sais minerais, além do fato de algumas dessas moléculas atuarem diretamente na mineralização óssea (RAISZ; RODAN, 1988).

As proteínas não colágenas típicas dos tecidos mineralizados, como a osteocalcina e a sialoproteína óssea e outras como a osteonectina/SPARC e osteopontina que têm uma distribuição mais generalizada, são liberadas do osso durante a sua desmineralização. Há ainda proteínas derivadas do sangue e fluidos teciduais que são concentrados no osso devido à sua afinidade com os cristais minerais como a albumina, α 2HS-glicoproteína e imunoglobulinas (SODEK; MCKEE,

2000).

Estas proteínas não colágenas, presentes no tecido ósseo, têm diversas funções. A osteonectina possibilita a junção dos osteoblastos à interface óssea. A osteocalcina é quimiotática para íons cálcio e fósforos séricos, com expressão controlada pela forma ativa da vitamina D. A sialoproteína e osteopontina ativam a mineralização e inibem o metabolismo proteico. A GM-CSF induz a diferenciação das células indiferenciadas na medula óssea em células comprometidas geneticamente com a linhagem granulocítica ou mielocítica, originando o SFM. O receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) e seu ligante (RANKL) possibilitam a ativação da osteoclastogênese a partir das células monocíticas, estimulam o amadurecimento osteoclástico bem como inibem a apoptose deste tipo celular. A osteoprotegerina (OPG) tem o controle antagônico de RANK. Acredita-se que estas proteínas direcionam o tamanho, a orientação e a forma particular de deposição dos cristais de HA (RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998) associados às fibrilas de colágeno.

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMP's) são um importante grupo de glicoproteínas classificadas como uma subfamília dentro da superfamília dos fatores de crescimento e transformação- β (TGF- β) (LAURENT et al., 2004). Essas proteínas são osteoindutoras (TAKAGI; URIST, 1982) e tem papel relevante, não apenas no desenvolvimento do esqueleto, mas também em outros processos fisiológicos durante a embriogênese (DIMITRIOU; GIONNOUDIS, 2005).

No adulto, as BMPs regulam a proliferação e diferenciação bem como a apoptose de vários tipos de células, tais como as células mesenquimais, os osteoblastos, os condroblastos, as células epiteliais e do tecido nervoso. O alvo final das BMPs é a alteração da expressão gênica no núcleo. Com isso, a atividade celular que inclui o crescimento, a diferenciação e a síntese de matriz extracelular é modificada (DIMITRIOU; GIONNOUDIS, 2005).

O tecido ósseo pode ser formado embriologicamente por dois tipos de ossificação: a endocondral e a intramembranosa. Na ossificação endocondral, observada em ossos longos, uma peça de cartilagem com formato do osso serve de molde para a formação do tecido ósseo. A ossificação intramembranosa ocorre em ossos chatos. No interior das membranas do tecido conjuntivo, denominado de centro de ossificação primária, as células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos. Esses osteoblastos, por sua vez, sintetizam a matriz osteoide (matriz

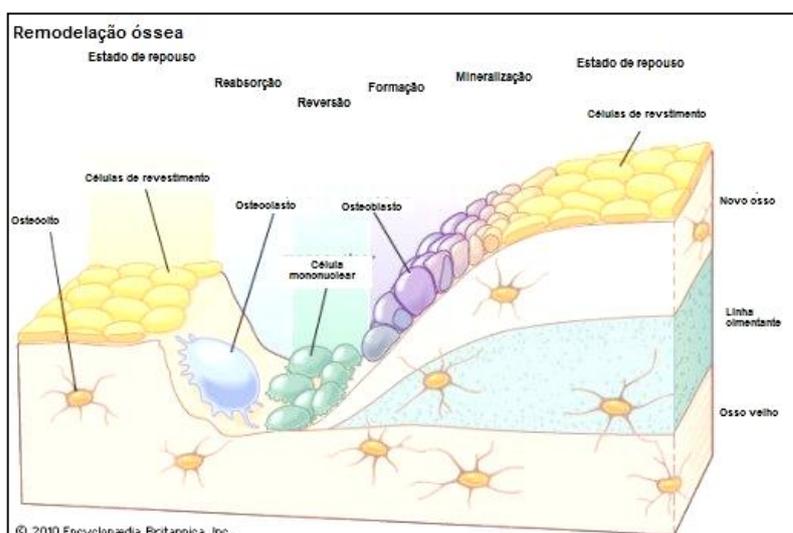
óssea recém-sintetizada) que posteriormente formará o tecido ósseo maduro, quando mineralizada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O modelamento é a atividade de deposição e reabsorção inicial que desencadeia bioquimicamente uma reação contínua, ou seja, ocorre primariamente no desenvolvimento do esqueleto. A ativação neste momento biológico é independente da formação/reabsorção prévia. Por outro lado, o remodelamento é a modificação e/ou reestruturação de osso já existente em um fenômeno combinado que possibilita a renovação do osso já formado (MOTA et al., 2008).

O tecido ósseo está em constante remodelação por meio da reabsorção e deposição de matriz óssea com modificação da sua forma ou estrutura (Figura 2). Seja quando um osso primário torna-se maduro, ou no crescimento ósseo, e ainda quando um osso esponjoso é remodelado e torna-se compacto ou ainda para adaptar-se às novas situações fisiológicas ou patológicas (ANDIA; CERRI, SPOLIDORIO, 2006).

A duração dos ciclos de renovação de remodelamento é chamada de sigma e em humanos tem a duração de 17 semanas. Esse ciclo envolve as seguintes fases: Repouso – mecanismos de síntese e reabsorção quase ausentes – 120 a 180 $\mu\text{m}/\text{dia}$; Ativação – período associado à reabsorção osteoclástica com formação de um cone cortante de 30 $\mu\text{m}/\text{dia}$ – 2h a alguns dias; Quiescência – período de maior atividade osteocítica para manutenção e troca iônica – 1 a 2 semanas; Formação – intensa atividade osteoblástica – 13 semanas (MISC, 2007).

Figura 2 - Remodelação óssea. Observam-se as fases de repouso, reabsorção, reversão, formação e mineralização



Fonte: Enciclopédia Britânica, 2010.

No entanto, apenas entre 5 a 20% das superfícies ósseas sofrem remodelamento num determinado momento, o restante permanece na fase quiescente. O processo de remodelamento demora em geral de 3 a 4 meses; começa pela ativação dos osteoclastos e finaliza-se com formação do novo osso pelos osteoblastos. Numa pessoa saudável, cerca de 4 a 10 % da substância óssea é substituída anualmente (HILL; ORTH, 1998; SIMÕES et al., 1995).

Vários fatores são responsáveis pelo controle da formação e manutenção óssea, estando entre esses: a genética, a dieta, a atividade física e o sistema hormonal (SIMÕES et al., 1995).

O desenvolvimento e a homeostase do sistema esquelético depende do equilíbrio dinâmico entre a atividade dos osteoblastos e osteoclastos na formação e reabsorção óssea, respectivamente. Os osteoblastos/células de revestimento ósseo produzem colagenase, e esta enzima remove a camada de osteoide, expondo a matriz mineralizada aos osteoclastos que se tornam ativos em contato direto com a matriz óssea mineralizada (MARKS, POPOFF, 1988).

A modulação dessa atividade osteoclástica ocorre por sinais gerados no microambiente com a liberação de citocinas. As citocinas são moléculas de regulação, solúveis, de baixa massa molecular, expressas como proteínas de membrana ou secretadas no meio biológico, que se acoplam a receptores específicos, em células alvo. Estas citocinas têm um papel vital tanto na regulação do tecido ósseo em condições fisiológicas quanto patológicas (SODEK, MCKEE, 2000).

A formação do osso envolve a proliferação e migração das células osteoprogenitoras e a diferenciação dos osteoblastos. Esse processo é controlado por uma cascata de eventos combinados a uma programação genética, com a regulação de genes por fatores sistêmicos e locais, entre eles os hormônios, citocinas e fatores de crescimento (SODEK; MCKEE, 2000)

A maioria dos fatores que controlam a reabsorção óssea age diretamente nos osteoblastos, tais como, o PTH, 1,25 dihidroxivitamina D3, os esteroides sexuais, as prostaglandinas (PGs), as citocinas (IL-1, IL-6 e IL-11) e o TGF- β . Portanto, esses fatores estimulam os osteoblastos a liberarem moléculas que estimulam a migração e a adesão à superfície óssea que deve ser reabsorvida. As citocinas e os fatores de crescimento, especialmente o TGF- β , liberados da matriz durante sua degradação, também desencadeiam a formação e ativação de osteoblastos para sintetizar e

depositar uma quantidade equivalente de osso novo na lacuna de reabsorção (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

No modelamento, os osteoblastos, após secretarem a primeira camada de matriz orgânica, por meio de vesículas que brotam de sua superfície, parecem assumir um importante papel na mineralização óssea (KATCHBURIAN; CERRI, 2002).

Estas vesículas contêm glicoproteínas e exibem forte marcação em sua membrana para a fosfatase alcalina. Esta enzima hidrolisa os íons fosfato, fornecendo-os para o interior das vesículas. Ocorre também um aumento da concentração de íons cálcio no interior dessas vesículas, provavelmente através dos fosfolípidios em suas membranas. Sendo assim, ocorre uma supersaturação e precipitação de fosfato e cálcio. Posteriormente, ocorre o rompimento da membrana das vesículas e a mineralização espalha-se pela matriz. Este processo é característico dos locais onde ocorre pela primeira vez a formação e mineralização do tecido ósseo (MARKS; POPOFF, 1988; KATCHBURIAN; CERRI, 2002).

Nos processos de mineralização, um maior ou menor controle exercido pela matriz está relacionado a um conjunto de propriedades envolvendo a sua topografia, geometria da rede, potenciais eletrostáticos, efeitos polares, estereoquímica e simetria espacial da fase cristalina, que provavelmente agem de modo cooperativo em função das modificações impostas pelo desenvolvimento da fase mineral (KATCHBURIAN; CERRI, 2002).

O tecido ósseo tem plasticidade, apesar da resistência a pressões e da sua dureza; é capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta às forças a que está submetido. Apresenta também uma capacidade reparativa, porém, limitada e regulada por fatores locais e sistêmicos (MOTA et al., 2008).

A interação morfofuncional entre as células ósseas possibilita a renovação tecidual e a manutenção da normocalcemia. Tal interação origina as atividades de modelamento e remodelamento controladas por fatores intracelulares (desencadeados por osteoblastos) por hormônios e por estímulos locais extrínsecos como aplicação de força mecânica fisiológica (MOTA et al., 2008).

O tecido ósseo é formado durante o crescimento e mantido durante a vida adulta pela renovação contínua da matriz, pelos mecanismos da remodelação óssea. Essa remodelação se modifica em diferentes fases da vida.

Durante o crescimento, a formação de osso excede a reabsorção óssea, e

isso resulta na expansão do osso. No adulto jovem, a reabsorção óssea é equilibrada pela formação óssea, que permite a manutenção da massa óssea. Na menopausa, um desequilíbrio da reabsorção óssea em relação à formação resulta em um saldo negativo do tecido ósseo (SOUZA, 2010; MARTIN; CORREA, 2010). Isto leva a um aumento do número de unidades de remodelação óssea, perfuração das trabéculas e erosão endocortical, que é responsável pela separação trabecular, alteração da microarquitetura trabecular e redução da resistência mecânica do osso (RAISZ, 2005).

O envelhecimento está, portanto, associado com a diminuição da formação óssea em relação à reabsorção óssea, que acentua assim a perda óssea. E isto pode induzir a osteoporose, uma doença comum no esqueleto, caracterizada por massa óssea reduzida, deterioração da microarquitetura óssea e aumento da susceptibilidade às fraturas (MARTIN; CORREA, 2010).

Vários mecanismos podem contribuir para o aumento da reabsorção óssea relacionada com a idade. O declínio dos hormônios sexuais biodisponíveis com a idade conduz a um aumento da expressão do ligante do receptor do fator ativador nuclear kappa B (RANKL) por células osteogênicas estromais. O RANKL liga-se ao RANK expresso em células precursoras de osteoclastos e, portanto, promove a sinalização que conduz a um aumento da diferenciação dos osteoclastos (LI et al., 2000). A deficiência de hormônios sexuais também resulta na redução da expressão de RANK pelas células estromais da medula óssea, osteoblastos e outras células. Estas alterações, além de aumentarem da expressão de citocinas locais, tais como IL-1, IL-6, IL-17 e TNF- α , resultam em mais osteoclastogênese e reabsorção óssea (RAISZ, 2005; MARTIN; CORREA, 2010).

Na remodelação 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 ligante RANKL em sua superfície. Os pré-osteoclastos expressam o receptor RANK, 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 em osteoblastos com capacidade de formar novo osso. A OPG, proteína secretada pelos osteoblastos, é capaz de ligar-se ao RANKL

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

O modelo de reparo ósseo que geralmente é ilustrado em ossos longos ocorre em cinco estágios: extravasamento sanguíneo, formação do coágulo e hematoma; proliferação subperiosteal e endosteal, formação do calo ósseo; consolidação e remodelação (CROCI, 1997).

Quando o perióstio é retirado, o hematoma pode extravasar para os tecidos moles adjacentes, sendo contido por músculos, fáscias e pele. É comum em crianças o calo exuberante, pois o perióstio é facilmente deslocado do osso pelo sangue extravasado, o que permite que novo osso se forme em sua parte interna (CROCI et al., 2003).

A reparação de um osso tubular difere muito daquela de um osso esponjoso, e o tipo de consolidação de um segmento é provavelmente influenciado por fatores como a fixação rígida dos fragmentos e na perfeição da osteossíntese, vascularização local, tamanho, localização e morfologia do defeito ósseo (CROCI et al., 2003).

Na formação da matriz osteoide, durante o reparo ósseo, alguns aspectos como a angiogênese são importantes no reparo ósseo, pois além de garantir o suprimento de oxigênio e nutrientes a essa matriz por meio da circulação sanguínea, a presença do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) estimula a diferenciação de células da linhagem osteogênica em osteoblastos e inibe a sua apoptose. Outros fatores também são importantes no reparo ósseo, tais como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento derivado de insulina (IGF) e o fator de crescimento do fibroblasto (FGF) (LAURENT et al., 2004).

Desse modo, a ação dos fatores de crescimento direciona a diferenciação de células-tronco para as vias condrogênica e osteogênica (BOROJEVIC, 2008; LOGEART-AVRAMOLOU et al., 2005).

A MEC possui ação importante no mecanismo de reparo ósseo por ser o arcabouço natural favorável à adesão celular, constituída pelo colágeno e pela fibronectina, proteínas que se aderem às integrinas, que são proteínas presentes na membrana das células (CROCI et al., 2003).

Nos meses que se seguem à consolidação, o osso é gradualmente reforçado ao longo das linhas de força à custa do excesso de osso por fora das linhas de força

que é lentamente removida. Este processo imperceptível de remodelação está em atividade constante em todos os ossos durante a vida toda, porém, se torna especialmente acentuado e evidente após uma fratura.

A consolidação de um osso esponjoso fraturado segue um padrão diferente daquela do osso cortical. Como o osso tem uma textura esponjosa uniforme e não tem canal medular, há uma área de contato mais ampla entre os fragmentos que é a trama de trabéculas, que permite uma penetração mais fácil do tecido ósseo e sua formação. A consolidação pode ocorrer diretamente entre as superfícies dos ossos e não precisa ocorrer através do calo externo ou do calo endosteal como em um osso cortical (CROCI et al., 2003).

O osso apresenta grande potencial regenerativo espontâneo, sendo este inclusive estimulado pela ação de forças mecânicas, entretanto, tal potencial reparativo apresenta limitações especialmente em defeitos ósseos críticos. Nesses defeitos e em situações em que haja quebra da homeostase, há danos funcionais ou estéticos que limitam a qualidade de vida do indivíduo. Tais situações ocorrem em regiões com extenso comprometimento da malha vascular, em anomalias de desenvolvimento, doenças sistêmicas degenerativas, em distúrbios metabólicos, como na osteoporose, em tumores ósseos, traumas ou infecções e nas lesões ósseas extensas em que o reparo da lesão leva à formação de tecido conjuntivo fibroso cicatricial (BOROJEVIC, 2008; LOGEART-AVRAMOULOU et al., 2005, BARRETO, 2011).

Os primeiros estudos do reparo ósseo em calvária de rato foram de Turnbull e Freeman em 1974, em osso parietal, com dimensões de 2 mm e que não se regeneraram após doze semanas.

A morfologia circular do defeito crítico em calvária de rato, com dimensões de aproximadamente 8 mm, foi primeiramente descrita por Takagi e Urist (1982), que em quatro semanas reduziu para cinco milímetros. Porém, esse defeito ósseo não regenerou após doze semanas de observação. Outros estudos em calvárias de rato com diâmetros menores, 4 mm (MULLIKEN; GLOWACKI, 1980), 5 mm (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; CACCIAFFESTA et al., 2001) e 6 mm (BRUNEL et al., 1996) também foram encontrados.

Há trabalhos com defeitos retangulares bilaterais em osso parietal com 5x8 mm (COSTA et al. 2010) e com envolvimento da sutura sagital 10x10 mm (ALBERIUS et al., 1990; COSTA et al., 2010). Nesses estudos, a padronização do

tamanho e a localização do defeito podem ficar comprometidas, diferentemente dos defeitos circulares com broca trefina. Em defeitos com 10x10 mm, há maior laceração do seio sagital, acarretando maior risco de sangramento, de infecção e morbidade do animal (ALBERIUS et al., 1990; COSTA et al., 2010).

A confecção de dois defeitos paralelos sem envolver a sutura sagital não parece ser adequada, visto que pode ocorrer fratura interligando as duas áreas, o que comprometeria o estudo do reparo no sítio do defeito. Além disso, a região da sutura preservada pode favorecer o reparo ósseo e, desse modo, reduzir a área a ser avaliada. Ao confeccionar dois defeitos ósseos em osso parietal em um mesmo animal, considerando um destes como o controle, pode-se incorrer em erro metodológico, visto que com a implantação, existe o risco de deslocamento do biomaterial. Além disso, o íntimo contato do fluido biológico, das citocinas, fatores de crescimento e inflamatórios locais provenientes de ambos defeitos podem influenciar no reparo em ambos os sítios. O próprio biomaterial implantado em um dos defeitos pode desencadear uma resposta imunológica sistêmica que também afetará o defeito tido como controle. Atualmente não se tem estudos claros com biomateriais nanométricos que avaliem o percurso dessas partículas em meio biológico após sua fragmentação e dissolução.

Algumas vantagens para as pesquisas de enxertos ósseos, com defeitos críticos de 8 mm na calvária de ratos, são: o custo baixo dos animais, a necessidade de um espaço físico pequeno na manutenção, pequena quantidade de material para realizar o estudo piloto e as partículas dos biomateriais que são inseridas com facilidade no defeito (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Nesses defeitos, a porção externa da dura máter é removida juntamente com o perióstio (MIGUEL, 2006, 2008; ROLIM, 2010; BARRETO, I., 2011). Esse perióstio é rico em vasos e células osteoprogenitoras que podem favorecer o reparo. Segundo Hobar e colaboradores (1996), a dura máter contém células mesenquimais capazes de se diferenciarem em qualquer tecido, inclusive tecido ósseo.

A calvária foi eleita para avaliar o comportamento de biomateriais por ser um osso chato formado pela díploe, que é escassa em medula óssea, quando comparada aos ossos longos como fêmur. Em ossos longos, há em geral extravasamento de biomaterial pelo canal medular e o íntimo contato com proteínas e células osteogênicas da medula óssea que favorecem o reparo ósseo. Isso não ocorre com os defeitos em calvária, embora haja o contato com o perióstio

remanescente das bordas ósseas e da parte perióstica da dura máter.

É imprescindível o desenvolvimento de novos biomateriais, inteligentes e/ou biomiméticos, capazes de restabelecer a forma e função do tecido ósseo perdido com a utilização de conceitos inspirados na natureza e a replicação do comportamento biológico. Desse modo, pesquisas em modelos animais são relevantes para avaliar alternativas de reparo ósseo. Um defeito ósseo crítico é definido como o menor tamanho de defeito, em uma espécie animal, que não se regenera espontaneamente por completo durante o seu período de vida (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Além disso, o uso de fármacos com a habilidade de acelerar o processo de reparação tecidual ou de técnicas regenerativas menos invasivas tem sido alvo por pesquisadores da área de bioengenharia tecidual. A medicina regenerativa tem como estratégia direcionar o reparo de tecidos lesionados, por meio da ampliação da capacidade natural de regeneração dos tecidos (ROLIM, 2010).

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 substâncias 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).

Nesse contexto, a utilização de biomateriais que atuem como arcabouços capazes de substituírem tecidos ou órgãos que perderam a sua estrutura ou função, é de grande relevância para a medicina regenerativa. As pesquisas nesta área buscam criar condições ideais para o reparo e a substituição de tecidos lesionados, com os elementos celulares requeridos, fatores de proliferação e diferenciação celular. E, ainda, em estruturas bi ou tri dimensionais que auxiliem a organização espacial e funcional de novos tecidos com a sua perfeita integração sistêmica (GREEN et al., 2002; STEVENS; GEORGE, 2005; BOROJEVIC, 2008).

Um arcabouço tridimensional ideal para engenharia de tecido ósseo deve assemelhar-se tanto quanto possível à morfologia do osso natural e, em particular, deve mimetizar a estrutura biológica do osso, a MEC, que é fundamental para a adesão, proliferação e diferenciação celular. O osso natural é um tecido híbrido, inorgânico-orgânico, composto por nanocristais de HA (4 nm) e nanofibras de

colágeno (com diâmetros variando de 50 a 500 ηm), que torna a estrutura altamente porosa com poros interligados (CHIARA et al., 2012). As propriedades físico-químicas importantes para a regeneração óssea incluem: poros interligados, a biodegradabilidade, a bioatividade, condutividade óssea, e osteoindutividade. O tamanho dos poros varia de 10 a 50 μm e 100 a 300 ηm em osso cortical e de 200 a 600 μm em osso trabecular. O tamanho e interligação da porosidade óssea são essenciais para a vascularização, a difusão de nutrientes e células, e crescimento de tecidos (LEGEROS, 2008). Os cristais de apatita do osso têm forma irregular com comprimentos e larguras variáveis (30-45 ηm) e espessura média de 5 ηm orientados com os seus eixos paralelos um ao outro e situa-se ao longo das fibrilas de colágeno (LEGEROS, 2008).

A arquitetura e a composição óssea permitem a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular que promove a formação, reparo e regeneração óssea (LEGEROS, 2008). Geralmente, os ossos naturais são constituídos por 60% de conteúdo mineral, 30% de colágeno e 10% de água com a proporção que depende da localização e do tipo de osso. As fibras de colágeno têm a função de proporcionar força em tensão e resistência à flexão, enquanto que os cristais de apatita, entre as nanofibras de colágeno, proporcionam resistência à força de compressão (CHIARA et al., 2012).

Uma vez que o osso é naturalmente nanoestruturado, os materiais com estrutura nanométrica parecem ser a melhor escolha para a criação de substitutos ósseos. A nanotecnologia lida com a produção de materiais nanométricos, ou seja, com dimensões inferiores a 100 ηm e esta emerge como uma das abordagens mais promissoras da bioengenharia tecidual. As vantagens de biomateriais nanoestruturados residem no seu tamanho pequeno, de alta porosidade, sendo muito relevante a relação entre a área de superfície elevada em um menor volume (CHIARA et al., 2012).

De fato, a grande área de superfície de tais nanomateriais aumenta a adsorção de proteínas adesivas (ou seja, fibronectina, vitronectina, laminina e colágeno) que proporcionam as interações da superfície celular por meio das integrinas e dos receptores da membrana celular (CHIARA et al., 2012).

Os materiais biomiméticos, quando implantados em lesões ósseas, devem funcionar como um arcabouço que possibilite a migração, adesão e proliferação de células da linhagem osteogênica com subsequente deposição de matriz osteoide.

Nesse sentido, o potencial osteogênico desses biomateriais está condicionado às suas características físico-químicas, como cristalinidade, topografia, rugosidade, energia de superfície, bem como à presença de espaços que possibilitem a proliferação vascular e a passagem de moléculas sinalizadoras, resistência mecânica adequada para restituir a forma e a função da área em questão, com velocidade de absorção proporcional à de regeneração tecidual óssea (ANSELME, 2000; BOYCE et al., 1999; BURG; PORTER; KELAM, 2000; CARANO; FILVAROFF, 2003).

O reparo e a neoformação óssea, promovida tanto pelos materiais biógenos quanto pelos sintéticos, ocorrem de acordo com três mecanismos: osteocondução, osteoestimulação e osteoindução (ROLIM, 2010). No primeiro mecanismo, o substituto ósseo funciona como um arcabouço bi ou tridimensional que possibilita a angiogênese, a adesão e diferenciação de células mesenquimais em células da linhagem osteogênica para que ocorra a formação de tecido ósseo no leito receptor (SACHLOS; CZERNUSZKA, 2003). A osteoestimulação ocorre quando células osteogênicas transplantadas viáveis produzem novo osso no sítio do defeito ou quando as células mesenquimais pluripotentes, presentes no leito do defeito, são estimuladas a se diferenciarem em osteoblastos e a se proliferarem após a implantação do enxerto ou do biomaterial. No terceiro mecanismo, a osteoindução, os agentes indutores, tais como os fatores de crescimento, atuam na diferenciação e proliferação de osteoblastos, de osteoclastos, e na angiogênese, e estes são fatores importantes para o reparo e a remodelação óssea (DIMITRIOU; GIONNOUDIS, 2005; GAROFALO, 2007; INTINI et al., 2008).

Os primeiros enxertos ósseos autógenos, alógenos e xenógenos viáveis para a aplicação clínica surgiram na década de 1990. (BAUM; MOONEY, 2000). Atualmente, o aperfeiçoamento nas novas gerações de biomateriais envolve a manipulação de amostras de origem celular (do osso ou da medula óssea) bem como de elementos MEC (ácido poliglicólico, colágenos, fibrina), componentes inorgânicos do osso (fosfato de cálcio) e agentes mitógenos (fatores de crescimento artificiais ou isolados, como a BMP-7). Dentre os diversos materiais desenvolvidos com o intuito de aprimorar as suas propriedades biológicas se destacam os híbridos e os compósitos. A manipulação das características do biomaterial tem como objetivos torná-lo bioativo, biocompatível e osteogênico. A disponibilidade desses biomateriais permitirá a reposição ou aumento do volume ósseo local bem como

ganho de massa óssea total, inclusive com atuação no controle endócrino e na manipulação genética (BAUM; MOONEY, 2000; KAJIMA; IMAI, 2012; LIU; LEI; YANG, 2012).

Atualmente, existem biomateriais sendo desenvolvidos nas mais diversas formas de apresentação, tais como: em pó, pasta, gel, membrana, bloco, disco, grânulo, microesfera, dentre outras – para atender às mais distintas aplicações na reconstrução de órgãos e tecidos (ROLIM, 2010). Esses materiais têm composição química, características físico-químicas e de superfície aprimoradas que favorecem a regeneração tecidual. Dentre esses biomateriais, destacam-se a hidroxiapatita sintética nanoestruturada, similar à apatita biológica, que comporá a fase inorgânica do novo osso. Alguns componentes bioativos poderão constituir a matriz orgânica desse osso neoformado ou atuar como arcabouço, por favorecer a adesão celular e a angiogênese. Estes componentes são polímeros naturais, tais como a gelatina, o colágeno, o alginato e a quitosana, que atuam como arcabouços biológicos para a deposição desses cristais minerais de hidroxiapatita.

2.2 COLÁGENO E GELATINA

2.2.1 Colágeno

O colágeno forma o principal tipo de fibra extracelular, é a proteína mais abundante no organismo animal, representando cerca de 20 a 25% do total de proteínas em mamíferos. É uma proteína fibrosa caracterizada por grande diversidade biológica e ampla força de resistência à tensão. Essa diversidade, na sua estrutura e função, pode ser observada nas diferentes formas de ocorrência do colágeno, como por exemplo: na presença de fibras colágenas nos tendões, fibras entrelaçadas formando camadas flexíveis na pele, películas transparentes de fibras finas na córnea, estrutura de membrana amorfa presente na cápsula e nos glomérulos renais, na lubrificação de cartilagem das articulações, no osso mineralizado, na dentina e em filamentos finos que circundam e suportam as células. O colágeno promove elasticidade e resistência à pele, aos músculos, tendões, ligamentos, e isso permite distribuir os fluidos nos vasos sanguíneos e linfáticos (JUNQUEIRA, 2008; SHIMOKOMAKI, 1991).

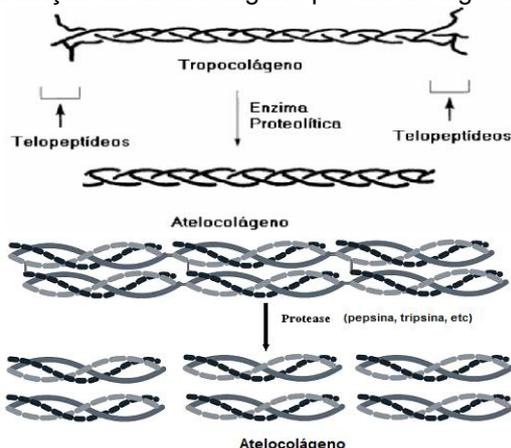
O termo colágeno deriva do termo grego *Kolla* = cola e *geno* = produção, ou

seja, a produção de cola a partir de diferentes matérias-primas. Classificada como a mais antiga cola do mundo, o colágeno era obtido pelo aquecimento da pele e tendões de cavalos, bovinos e outros animais, já sendo utilizado como adesivo pelos egípcios há cerca de 4.000 anos atrás e por outros povos como revestimento protetor sobre tecidos bordados, cestas de corda e confecção de instrumentos musicais (SHIMOKOMAKI, 1991).

Em meados de 1930, apresentou-se a primeira evidência de que esta proteína possuía uma estrutura regular em nível molecular, mas apenas em 1983 surgiu sua primeira definição no dicionário como sendo o constituinte dos tecidos, que por aquecimento, dá origem à gelatina (JUNQUEIRA, 2008).

Existem dois procedimentos típicos para isolamento de colágeno: digestão enzimática e extração ácida. A digestão enzimática cliva ligações cruzadas usando proteases (por exemplo, pepsina ou tripsina) que são enzimas que quebram as ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno. Isso resulta em produtos solúveis conhecidos como triplas hélices de atelocolágeno (Figura 3) que possuem propriedades físicas semelhantes ao colágeno não tratado (LÓPEZ GARCÍA, 2012).

Figura 3 – Obtenção do atelocolágeno por via de digestão enzimática



Fonte: Adaptado de Benthán, 2012; López García, 2012.

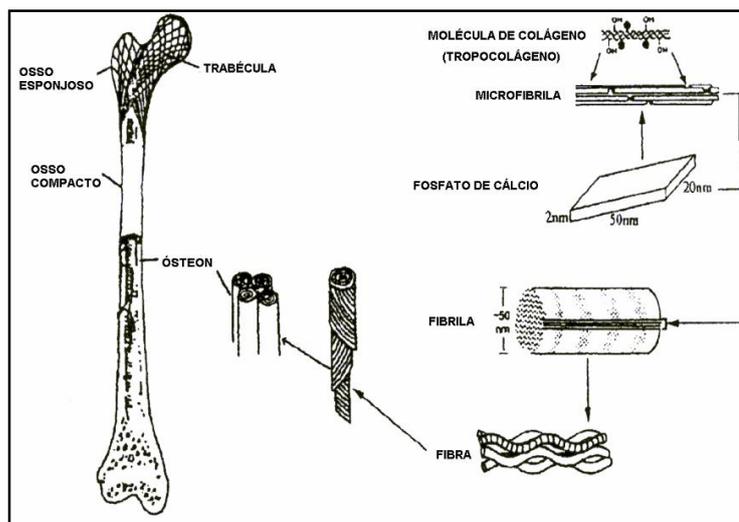
O atelocolágeno é solúvel em pH ácido, e a sua forma líquida pode ser moldada em diferentes formas físicas, tais como filmes por fundição, estruturas semelhantes a esponjas por secagem e congelamento, fio por extrusão, pós, géis, blocos, tubos, esferas, entre outras configurações. Este produto colagênico tem sido empregado em misturas de polímeros, na liberação controlada de drogas (SANO et al., 2003) e como enxerto polimérico na engenharia de tecidos, especialmente na

recuperação de tecido nervoso da parede abdominal, tendão, ligamento, reparação de feridas crônicas e isquêmicas (SHIN et al., 2005) em tratamentos cosméticos e também no reparo ósseo (BRUNEL et al., 1996; GÓES et al. 2002; MIGUEL, 2006, 2008; OLIVEIRA; SOARES; ROCHA, 2010; SANO et al., 2003).

O colágeno é um material extracelular produzido por células como os fibroblastos. Quando a hélice tripla é secretada por estas células, suas terminações são clivadas, o que resulta em um arranjo de moléculas insolúveis, as fibras de colágeno (LAWSON; CZERNUSKA, 1998).

Quando as fibras de colágeno são distribuídas num arranjo planar, tem-se uma lamela (3-7 μm de espessura). Em alguns casos, essas lamelas de fibras de colágeno mineralizadas formam camadas concêntricas (3-8 lamelas) ao redor de um osteon ou canal haversiano (RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998). Um esquema mais detalhado de sua localização no osso é mostrado na figura 4.

Figura 4 – Organização tridimensional do colágeno no tecido ósseo



Fonte: Lawson, Czernuska, 1998.

Os cristais crescem numa orientação cristalina específica, com o eixo *c* dos cristais aproximadamente paralelos ao eixo de comprimento das fibrilas de colágeno. O colágeno tem um papel fundamental na arquitetura tecidual, especialmente no tecido ósseo, em uma ampla variedade de interações célula-célula e célula-matriz, pois possui grande resistência mecânica conferida pela sua organização macromolecular que resulta na formação de fibras (RODRIGUES, 2009).

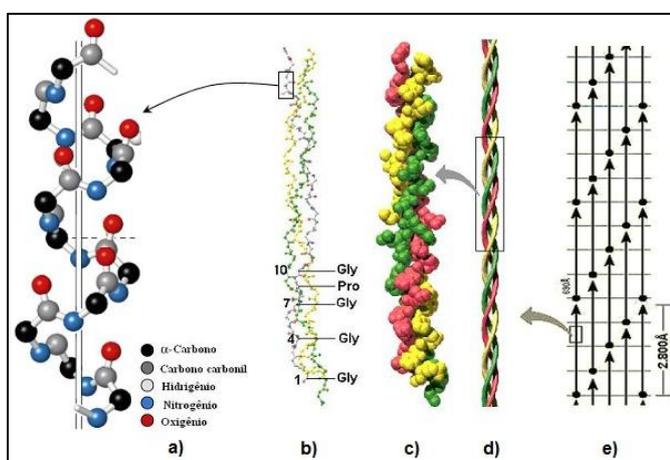
A molécula de colágeno é uma glicoproteína composta por três cadeias polipeptídicas helicoidais, cada uma com aproximadamente 1000 aminoácidos (aa),

denominada cadeia α . Existem pelo menos 27 tipos diferentes de colágeno que são classificados de acordo com as características da estrutura primária das cadeias α que formam a tripla hélice (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

A tripla hélice tem rotação óptica negativa (no sentido horário), as cadeias apresentam uma sequência estrutural básica contendo grandes quantidades, aproximadamente um terço do aminoácido glicina, além de prolina, lisina e outros dois aa: hidroxiprolina e hidroxilisina. Esses aa são derivados da prolina e lisina por meio de processos enzimáticos dependentes de vitamina C (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

As cadeias se enovelam formando uma tripla hélice estável e de tamanho variado (Figura 5). Estas moléculas de tripla hélice que apresentam domínios globulares terminais são denominadas de pró-colágeno. Essas regiões globulares são clivadas em graus variados antes da agregação extracelular para dar origem a uma estrutura polimerizada, o tropocolágeno (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Figura 5 – Representação esquemática da molécula de colágeno: a) arranjo molecular; b) forma de tripla hélice presente nas matrizes colagênicas; c) e d) tropocolágeno em tripla hélice; e) modelo do quarto alternado pentafibrilar



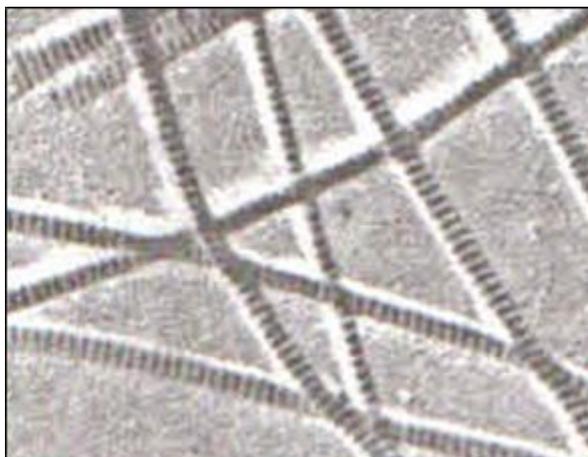
Fonte: Adaptado de Smith; Hollinger, 1968.

De acordo com Gómez-Guillén e colaboradores (2002) o colágeno é caracterizado por ser uma das poucas proteínas constituídas com elevada quantidade de hidroxiprolina (13-14%). Esse importante aminoácido possui a capacidade de estabelecer pontes de hidrogênio por meio de seus grupamentos OH^- que ajudam na estabilidade da molécula. Assim, a temperatura de desnaturação e a quantidade de hidroxiprolina e prolina presentes nesta proteína são consideradas como fatores responsáveis pelo possível desdobramento e fácil solubilidade da

hélice de colágeno.

A configuração estriada nas fibras de colágeno ocorre devido à presença de interações de grupos apolares e polares (Figura 6).

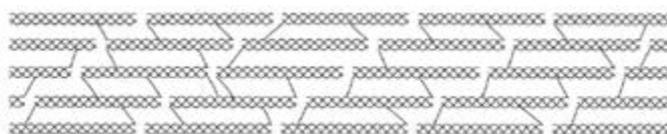
Figura 6 – Padrão estriado das fibras de colágeno



Fonte: Lehninger; Nelson; Cox, 2002.

Segundo Lawson e Czernuszka (1998), tais forças são suficientes para agrupar as microfibrilas, entretanto, não conferem estabilidade mecânica suficiente ao colágeno que só é alcançado pela formação de ligações cruzadas (Figura 7), covalentes intra (entre a mesma unidade de tropocolágeno) ou intermoleculares (entre unidades de tropocolágenos). A quantidade e tipo de ligações cruzadas no colágeno natural variam com a função e a idade do tecido.

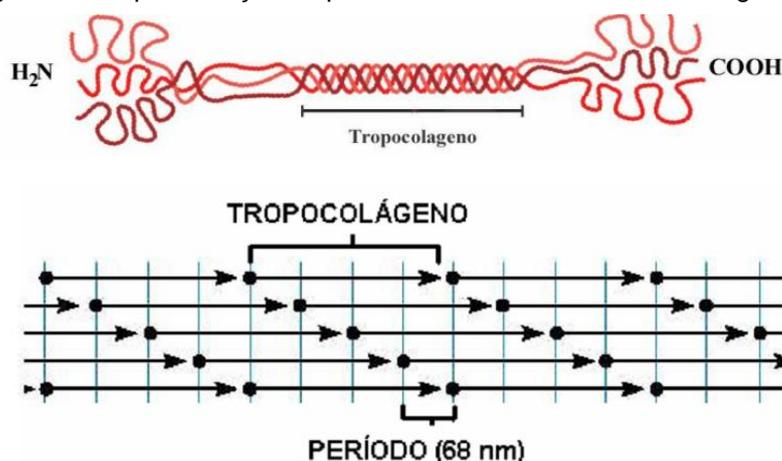
Figura 7 - Ligações cruzadas entre moléculas de tropocolágeno



Fonte: Gross; Fetto; Rosen, 2005.

O empacotamento ordenado das moléculas de tropocolágeno para formação das microfibrilas ocorre de forma regular e específica, onde a quinta molécula coincide com a primeira (Figura 8), sendo cada segmento corresponde a uma molécula de tropocolágeno. Esta configuração é alcançada principalmente devido à presença de interações de grupos hidrofóbicos e polares (LAWSON; CZERNUSZKA, 1998).

Figura 8 – Representação esquemática das microfibrilas de colágeno



Fonte: Adaptado de Lawson; Czernuszka, 1998.

O colágeno pode ser considerado um material anisotrópico por conter regiões com diferentes graus de cristalinidade. Logo, os tipos de colágeno variam em diâmetro, composição aminoacídica, comprimento, estrutura molecular e localização nos diversos tecidos. Nem todos os tipos de colágenos são capazes de constituir fibrilas e, portanto, podem ser agrupados em três grupos diferentes: fibrilar, não fibroso e microfibrilar (RAMOS; GOMIDE, 2009).

A molécula de colágeno ocorre em várias formas polimórficas de acordo com a natureza dos três constituintes da cadeia polipeptídica onde três tipos de cadeia α se diferem quanto ao conteúdo de aa, sendo referidas como α_1 , α_2 e α_3 . A distribuição dessas cadeias na molécula de colágeno tem variações genéticas específicas (RAMOS; GOMIDE, 2009).

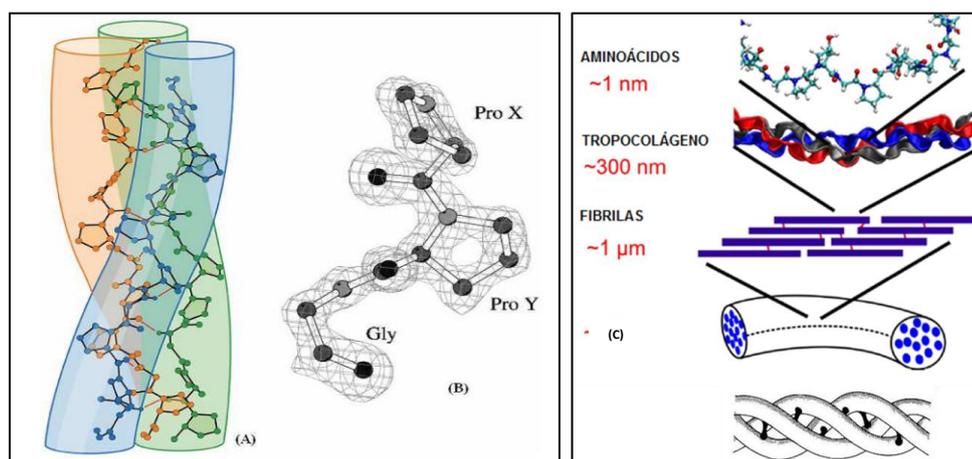
O colágeno tipo I é constituído por três cadeias polipeptídicas, sendo que duas destas cadeias são idênticas, denominadas α_1 , e uma é homóloga, mas quimicamente distinta, denominada α_2 . Nos tecidos, esse tipo de colágeno é encontrado na forma de fibras com diâmetros ente 80 e 160 ηm , e de fibrilas com dimensões de aproximadamente 1 μm (Figura 9) que forma a estrutura do sistema vascular, córnea, tendões, tecido cutâneo, tecido ósseo e muscular (RODRIGUES, 2009; SIVAKUMAR; RAO, 2002). Cada cadeia α apresenta uma massa molecular de aproximadamente 100.000 mol/g e, para cada caso no colágeno tipo I, a cadeia α_1 contém 1056 resíduos de aa e a cadeia α_2 com 1038 resíduos, dando origem a uma tripla hélice (SILVA, 2005).

O colágeno tipo I é formado por três cadeias polipeptídicas caracterizadas pela repetição de um tripla hélice Gly-X-Y (Figura 9). O X é geralmente uma prolina

(Pro) e Y é uma hidroxiprolina (Hip). Essas posições X e Y podem ser ocupadas por outros *aa*. Essa estrutura corresponde à sua unidade monomérica, o tropocolágeno (SILVA, 2005).

No colágeno tipo I, as fibrilas são organizadas em fibras que se associam com outros tipos de fibras ou com as próprias fibrilas de colágeno. O tamanho dessas fibrilas é um fator importante para determinar a natureza física do tecido. Portanto, este tamanho depende do tipo de tecido e das condições fisiológicas (Figura 9). As taxas de síntese e de degradação do colágeno também podem determinar o tamanho das fibrilas de colágeno responsáveis por conferir força e resistência, especialmente no tecido ósseo (RODRIGUES, 2009).

Figura 9 – Colágeno: a) Trípla hélice; b) A sequência (Pro - Pro - Gly)_n da molécula de colágeno; c) organização hierárquica e tridimensional do colágeno e suas dimensões



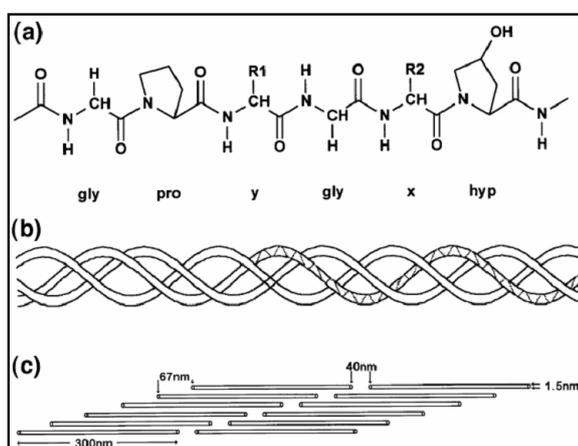
Fontes: Adaptado de Holme e Peck, 1998; Peschel, Dashe, Kanrad, 2007.

Analisando a composição química, os *aa* mais significativos no colágeno tipo I consistem em: 33% de glicina, 12% prolina e 11% hidroxiprolina, 0,7% de hidroxilisina. Caracterizam-se ainda por não possuir triptofano (Trp) e os resíduos de tirosina encontram-se exclusivamente na região dos telopeptídeos, que correspondem às regiões não helicoidais do tropocolágeno. Os *aa* polares correspondem a quase 40% da molécula, 11% são básicos e 9% ácidos, os demais 17% correspondem a aminoácidos hidroxilados. Aproximadamente 4% dos resíduos correspondem a amidas de aspartato e glutamato. Uma característica que diferencia o colágeno de outras proteínas é a presença de alta concentração de glicina seguida de prolina e hidroxiprolina (Figura 10). O prolina e o hidroxiprolina se originam da hidroxilação residual de lisina e prolina, após ações de tradução (GOISSIS, 2007).

O colágeno tipo I representa 90% do total de colágeno existente, que no homem adulto é aproximadamente de 1021 unidades monoméricas de tropocolágeno. Sendo assim, o colágeno tipo I é a molécula biológica com maior número de domínios funcionais existente no reino animal (GOISSIS, 2007).

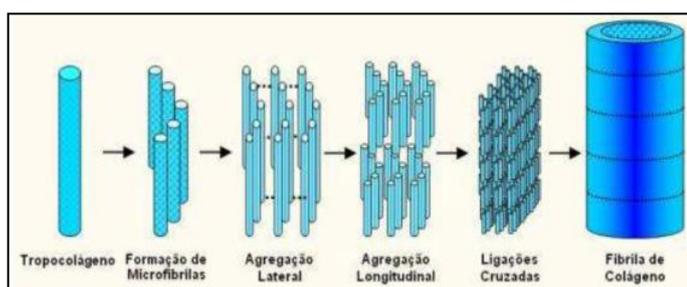
No colágeno, as estruturas fibrilares são estabilizadas por ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Esta organização fibrilar tem início com a agregação de microfibrilas. As interações entre cinco moléculas de tropocolágeno formam as microfibrilas (Figuras 11 e 12).

Figura 10 – Estrutura química do colágeno do tipo I: (a) Cadeia peptídica; x e y podem ser respectivamente prolina e hidroxiprolina, ou outros aa; R1 e R2 são resíduos que podem ser H ou OH; (b) Enovelamento em tripla hélice; (c) Microfibrilas



Fonte: Friess, 1998.

Figura 11 – Etapas da formação da fibrila de colágeno



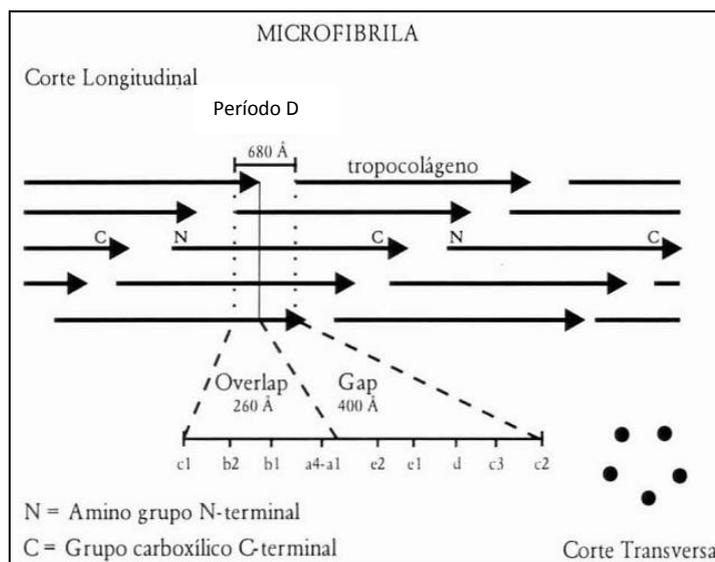
Fonte: Batista, 2008.

Colágeno tipo I é primeiramente sintetizado pelos fibroblastos como um precursor solúvel, pró-colágeno tipo I, o qual é secretado pelos fibroblastos e sofre ação proteolítica para formar as fibras insolúveis de colágeno. O TGF- β , expresso em queratinócitos e fibroblastos, é responsável pela transformação de pró-colágeno em fibra de colágeno (RODRIGUES, 2009). É sabido que o TGF- β estimula a

síntese de colágeno por diminuir a expressão das metaloproteinase-1 (MMP-1) e aumenta a expressão do inibidor de metalopeptidase 1 (TIMP-1) (SHIN et al., 2005).

O colágeno tipo I apresenta uma unidade física conhecida como “período D” (Figura 12) a qual tem participação no controle de eventos biológicos que dependem da adesão celular sobre a MEC para desencadear a expressão da atividade (RODRIGUES, 2009).

Figura 12 – Estrutura microfibrilar do colágeno



Fonte: Martins, Goissis, 1996.

Este “período D” (região com 680Å) é caracterizado por apresentar uma distribuição ordenada de aa que tem origem na interação particular das moléculas de tropocolágeno para a formação das estruturas fibrilares que compõem a tripla hélice. Essas interações são dependentes das alterações bioquímicas, assim como da ação mecânica sobre os tecidos. Estes processos são afetados pela simples presença da sequência de aa RGD (arginina, glicina e aspartato) na estrutura primária do colágeno I, ou em outra proteína da MEC como a fibronectina (RODRIGUES, 2009).

Esta sequência de aa RGD é um dos determinantes mais importantes para adesão celular na MEC (GOISSIS, 2007).

A alteração da estrutura do colágeno do tipo I pela oxidação ou pela degradação proteolítica modifica sua atividade de crescimento e indução da proliferação celular (VARANI et al., 2006).

Apesar do mecanismo de formação óssea não ser totalmente conhecido,

sabe-se que o colágeno tem uma participação ativa como arcabouço na mineralização. Os primeiros depósitos cristalinos de sais de fosfato de cálcio ocorrem na zona chamada "*Gap*" (Figura 12) e se espalha progressivamente para a zona do "*Overlap*" por um processo mediado por moléculas nucleadoras. Na fase inorgânica, encontrada no tecido ósseo, cerca de 80% desta está distribuída dentro dos espaços internos da organização microfibrilar e não nos espaços intercelulares (MARTINS; GOISSIS, 1996).

As fibrilas de colágeno não se formam em meio ácido, isso porque as forças de interação entre as hélices triplas não possuem componente de atração em qualquer distância inter-helicoidal. Entretanto, em condições de pH e força iônica próximos ao fisiológico, o processo de mudança da hélice tripla é acompanhado pela formação de fibrilas, processo chamando de fibrilogênese (ZANABONI et al., 2000).

A caracterização da estrutura molecular do colágeno por meio da determinação da composição de aa, Difração de Raios-X (DRX), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e análise físico-química das soluções é importante para entender suas características e propriedades bioquímicas.

O colágeno, enquanto biomaterial, apresenta como vantagens: estar disponível abundantemente e ser facilmente purificado de organismos vivos; não tem efeito alergênico; é biodegradável e bioreabsorvível; tem baixa antigenicidade; é atóxico e biocompatível; é sinérgico com componentes bioativos; é considerado um plástico biológico devido à alta resistência mecânica; tem boa compatibilidade com células (adesão, crescimento e migração); tem propriedades hemostáticas; sua biodegradabilidade pode ser regulada por ligações cruzadas. Este biomaterial pode ser preparado em diferentes formas, tais como tiras, placa, esponjas, partículas, além de ser compatível com polímeros sintéticos (LEE, C.; SINGLA; LEE, Y., 2001).

Porém, algumas desvantagens podem ser apresentadas: existe uma grande variabilidade do colágeno isolado, por exemplo, com diferentes densidades de ligações cruzadas, tamanhos da fibra, traços de impureza, entre outros aspectos. O colágeno é hidrofílico, o que leva ao intumescimento e mais rápida liberação (no caso do uso em dispositivos de liberação controlada) tem variabilidade na taxa de degradação, quando comparado com a degradação hidrolítica; apresenta propriedades de manuseio complexas; pode trazer efeitos secundários, tais como a possibilidade de transmissão de encefalopatia bovina (LEE, C.; SINGLA; LEE, 2001).

Em padrões de DRX e micrografias de transmissão de elétrons, a fibrila de colágeno, no tendão, revela uma periodicidade axial (D) de aproximadamente 68 nm como esquematizado na figura 12. Essa periodicidade é perdida quando as fibras de colágeno são colocadas em meio de ácido acético diluído, ocorrendo a dissolução das fibras e restando a unidade que as constitui, o tropocolágeno. Ao se neutralizar, esse meio com um álcali pode-se reconstituir a periodicidade característica das fibras de colágeno (LAWSON; CZERNUSZKA, 1998).

Estudos sugerem que modificações no arranjo do colágeno podem levar a significativas variações na integridade mecânica do osso. Foi mostrado que a diminuição da concentração de ligações cruzadas está associada com o decréscimo no enrijecimento ósseo e na sua capacidade de absorver energia numa fratura (WANG et al., 2001).

Martins e Goissis (1996) desenvolveram o colágeno aniônico, onde o colágeno natural é modificado quimicamente por hidrólise seletiva dos grupos carboxiamida de resíduos de asparagina (Asn) e glutamina (Gln) presentes nas cadeias polipeptídicas. Esses grupos são os únicos, exceto pela ligação peptídica, susceptíveis de alteração química, nas condições de formação de fosfato de cálcio. Como resultado, tem-se um aumento da densidade de carga dentro do período D.

Outro fator importante no colágeno aniônico é o efeito piezoelétrico presente, provavelmente devido ao aumento do número dos sítios com carga negativa. Essas cargas tornam esse efeito piezoelétrico superior, quando comparado ao colágeno não tratado (GOES et al., 2002). Sabe-se que para se promover a formação de osso saudável é essencial a presença de uma estimulação mecânica que seja capaz de impulsionar a modelagem, remodelagem e a mineralização de forma eficiente. Alguns grupos vêm estudando a capacidade piezoelétrica do colágeno aniônico e de seu composto com a hidroxiapatita (ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002; RODRIGUES, 2009).

2.2.2 Gelatina

A gelatina é uma proteína purificada de origem animal, derivada da hidrólise parcial do colágeno animal, principalmente de suínos e bovinos (GOMÉZ-GUILLÉN et al., 2002). É uma mistura heterogênea de polipeptídeos, derivado da desnaturação do colágeno. Todo processo produtivo de gelatina consiste de três grandes etapas: o

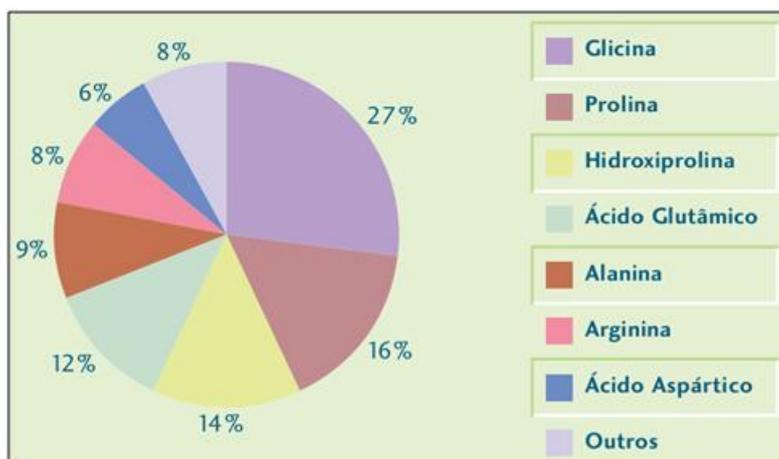
pré-tratamento da matéria-prima, extração e purificação. A conversão do colágeno em gelatina solúvel pode ser obtida através do aquecimento deste, em meio ácido ou alcalino. A solubilização térmica do colágeno é devido à clivagem de uma série de ligações covalentes intra e intermoleculares nele presentes. (KARIN; BHAT, 2009).

A gelatina é essencialmente o colágeno desnaturado e pode ser obtida por processos químicos, enzimáticos ou térmicos (SENA, 2004). A desnaturação é a perda da estrutura tridimensional do colágeno. Os principais agentes de desnaturação são: pH (altera as interações eletrostáticas entre aa carregados), concentração do sal – força iônica (devido à mesma razão) e temperatura (altas temperaturas reduzem a força das ligações de hidrogênio). Em alguns casos é possível a renaturação do colágeno, ou seja, a recuperação de sua estrutura em tripla hélice (SENA, 2004).

A gelatina possui uma grande habilidade de ligação de água e suas cadeias de configuração helicoidal são importantes para a formação do gel. Por ser um hidrocoloide de origem proteica possui caráter anfótero, associado à presença de grupos amina e carboxílicos nos aa (SAGMA, 2004).

A gelatina é um alimento puro, constituído por cerca de 84% de proteínas, 2% de sais minerais e água, contém em sua composição 18 aa, sendo 9 destes essenciais (Figura 13). No entanto, tem como característica peculiar o alto conteúdo de glicina, hidroxiprolina e prolina e deficiência em aa sulfurados. Portanto, do ponto de vista nutricional é considerado uma proteína incompleta devido à ausência do triptofano e de outros aa essenciais (OESSER et al., 1999). Esta proteína tem peso molecular médio entre 20.000 a 250.000 Da, dependendo do grau de hidrólise do colágeno (SAGMA, 2004).

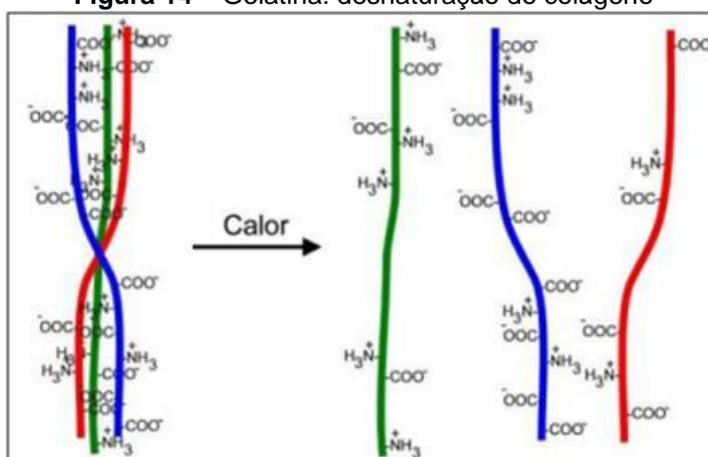
As gelatinas são classificadas de acordo com a natureza da matéria-prima (pele, tendões e ossos) e do tipo de hidrólise (ácida, alcalina ou enzimática) aplicada à esta. Após a degradação enzimática da gelatina, obtém-se um colágeno hidrolisado o qual contém peptídeos com uma massa molecular média de 3 a 6 kDa. Este colágeno hidrolisado não possui capacidade de formar gel, tem baixa viscosidade, retém até dez vezes mais água quando comparado à gelatina e ainda é solúvel em temperatura ambiente. Isso permite a sua utilização para enriquecer com uma carga extra de proteína produtos na indústria alimentícia, sem modificar suas características originais, além de ser possível utilizá-lo como aglutinante, emulsionante, agentes adesivo e coesivo (ROUSSELOT, 2013).

Figura 13 – Perfil de aminoácidos da gelatina

Fonte: Rousselot, 2013.

A mais importante propriedade da gelatina é sua capacidade de formar um gel termorreversível, a partir de soluções com diferentes concentrações, além de possuir um ponto de fusão por volta de 25-35°C, que faz seus géis fundirem a uma temperatura próxima à do corpo humano (SAGMA, 2004). Por esta razão, é um agente de ligação ideal e encontra usos em variadas aplicações (BATISTA, 2008).

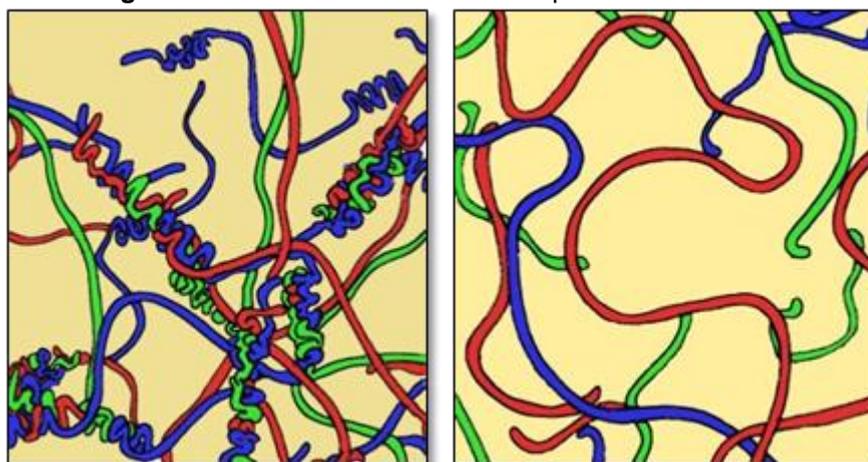
Uma propriedade importante da gelatina é sua capacidade de formar géis termorreversíveis. Em altas temperaturas, as ligações intermoleculares do colágeno são quebradas (Figura 14) e a estrutura cristalina altamente organizada da proteína passa a um estado amorfo, denominado de gel (BATISTA, 2008). Nesse processo, há a ruptura de ligações de hidrogênio entre as três cadeias polipeptídicas do tropocolágeno e, em seguida, ocorre a ruptura intramolecular da ligação de hidrogênio da cadeia α (BERNAL; STANLEY, 1987).

Figura 14 – Gelatina: desnaturação do colágeno

Fonte: Batista, 2008.

As moléculas de gelatina não voltam a enrolar-se em torno umas das outras, no entanto, estabelecem ligações entre elas (zonas de junção) formando uma rede tridimensional (ROUSSENOVA et al., 2012), conforme observado nas figuras 15 e 16.

Figura 15 – Gelatina e o efeito da temperatura na molécula

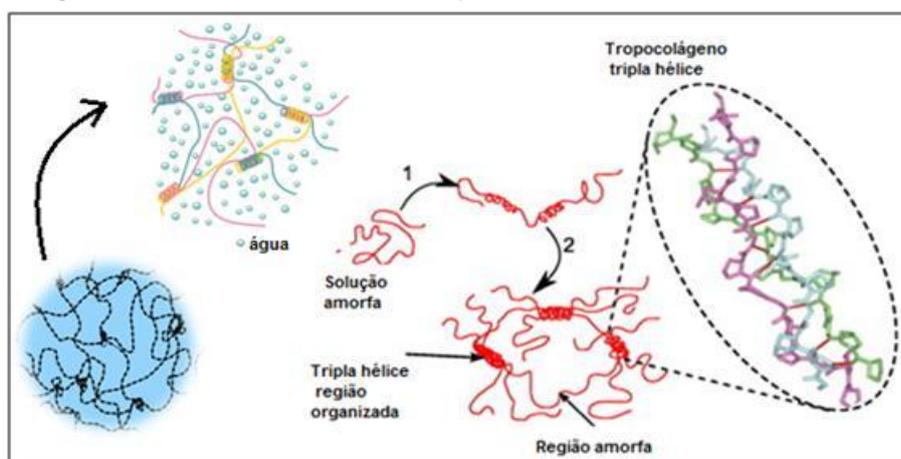


Gelatina quente

Gelatina fria

Fonte: Ciência com buen gusto, 2011.

Figura 16 – Representação esquemática do processo de renaturação parcial na gelatina. (1) Quando uma solução aquosa de gelatina (com a concentração de proteína > 5 mg/mL) é resfriada, as cadeias polipeptídicas simples começam a reorganizar-se em conformações que são semelhantes às da estrutura de colágeno. (2) Em seguida, estas cadeias, apresentam uma conformação tridimensional, estabilizada por pontes de hidrogênio intercadeia lateral, no interior das regiões helicoidais. Observa-se a tripla hélice em maior aumento

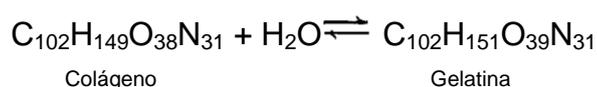


Fontes: Adaptado de Roussenova et al. 2012.

A absorção de água pela gelatina é muito maior do que pelo colágeno natural (SHEPPARD; HOUCK, 1930). A insolubilização de gelatina, ou seja, a perda da capacidade de dissolver-se completamente em água a 40 °C e acima, parece ter

sido observado pela primeira vez por Hofmeister em 1878. Segundo Hofmeister, a gelatina que tinha sido aquecida a 130°C não era facilmente solúvel em água, na verdade, só podia ser colocada em solução em ebulição por várias horas. Bogue descobriu que a cola aquecida a 110°C durante 15 horas tornou-se insolúvel (SHEPPARD; HOUCK, 1930).

A mudança foi atribuída por Hofmeister a uma inversão da conversão do colágeno em gelatina que ele expressa pela equação (SHEPPARD; HOUCK, 1930):



As gelatinas são comercializadas de acordo com sua habilidade de formar gel e graduadas conforme o *Bloom* ou força de gelificação que é uma medida padrão da força aplicada para provocar uma depressão em um gel com concentração e temperatura padronizadas. É possível produzir qualquer firmeza necessária no gel, ou seja, com qualquer tipo de *Bloom*, apenas com a variação na concentração da gelatina (SAGMA, 2004).

A maior utilização dessa proteína polimérica é na indústria alimentícia. É aplicada também na área farmacêutica, seja na manufatura de cápsulas duras e moles, para comprimidos e drágeas; na área industrial é aplicada em cosméticos, filmes e papéis fotográficos; na eletrodeposição de metais, em papéis, e em fósforos (SAGMA, 2004).

Na área da biomédica, a gelatina tem sido um biomaterial promissor para a regeneração óssea. O colágeno presente nesse material é um componente biomimético para a substituição da matriz extracelular, uma vez que contém vários grupos funcionais que biologicamente melhoram a adesão dos osteoblastos, a migração, e a mineralização no tecido ósseo (AZAMI; MOHAMMAD; FATHOLLAH, 2010).

A gelatina é biocompatível, com menor antigenicidade do que o colágeno puro, e biodegradável, o qual pode atuar como um substituto temporário no reparo ósseo. É facilmente absorvível *in vivo*, sendo necessário o uso de agentes de ligação cruzada para prolongar o tempo de implantação e reduzir a absorção para que o material permaneça o tempo necessário para que ocorra a neoformação óssea. Vários reagentes de ligação cruzada têm sido utilizados para reticular a gelatina, tais como: o formaldeído, os compostos de glutaraldeído, poliepoxi, ácido

tânico, dimetil suberimidato, carbodiimidas, e azida de acilo (CHEN; KUO; YAO, 2009).

A gelatina é um biomaterial promissor, e a sua modificação *in vitro* com citocinas osteogênicas como TGF- β e as BMPs acrescenta ao biomaterial propriedades que favorecem a regeneração tecidual óssea *in vivo* (RIPAMONTI; FERRETTI; HELIOTIS, 2006). Essa e outras modificações na molécula podem desempenhar um papel importante na engenharia de tecidos (FASSINA et al., 2010).

Noah e colaboradores (2002) mostraram o impacto do processo de esterilização sobre a matriz do colágeno preparado para a engenharia de tecido. A esterilização com raios gama demonstrou ser mais simples e efetiva para esterilizar materiais sem produzir substâncias tóxicas, entretanto, esse processo propicia a quebra de ligações químicas em materiais como a matriz de colágeno.

2.3 APATITAS BIOLÓGICAS E HIDROXIAPATITA SINTÉTICA

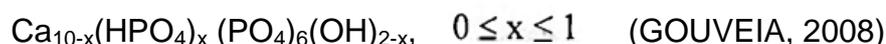
Os materiais biomiméticos com propriedades similares ao tecido ósseo apresentam grande interesse, não apenas em função de suas propriedades mecânicas e elásticas, mas também devido à ampla utilização que poderiam alcançar, especialmente na reconstrução do tecido ósseo. A expectativa é que esses materiais tenham performances superiores, principalmente em trabalhos de reconstrução tridimensional em defeitos críticos.

Os biomateriais similares ao osso, nos seus estágios iniciais de desenvolvimento, que sejam capazes de estimular os sistemas celulares e bioquímicos, devem restabelecer de modo mais eficiente o tecido ósseo nos casos de sua reconstrução. Do ponto de vista da aproximação sintética, dois fatores principais devem ser levados em consideração para estudo da mineralização orientada de sais de fosfato de cálcio sobre matrizes colagênicas, obtendo-se assim materiais ósseos miméticos: o primeiro está associado ao fato de que na sua fase inicial de biomineralização *in vivo*, os depósitos da fase mineral que dão início à formação do tecido ósseo não correspondem à hidroxiapatita (HA) e sim ao que se denomina de pró-HA, cuja razão molar Ca/P é igual a 1,50 e não 1,67; o segundo está associado a prováveis alterações na matriz colagênica, principalmente na topografia da distribuição de carga da sua estrutura periódica em função das condições de obtenção *in vitro* da HA, que é favorecida não apenas pela

estequiometria da reação, mas também pelo pH, normalmente por volta de 12 (MARTINS; GOISSIS, 1996).

As apatitas biológicas diferem da HA pura em composição, tamanho do cristal, morfologia e estequiometria. A HA estequiométrica tem a estrutura do cristal hexagonal, grupo espacial P63/m e a razão Ca/P é de 1,67, mas em geral, as apatitas biológicas não são estequiométricas (1,63 e 1,61 para o esmalte e a dentina e 1,71 para o osso) (LEGEROS, 1994).

A HA encontrada nos ossos é carbonatada e tem uma deficiência de até 10% de cálcio (COSTA et al., 2009; GOUVEIA, 2008). Sua composição química pode ser expressa pela fórmula geral (Reação 1):



No osso, podemos encontrar fosfatos de cálcio tanto na forma cristalina quanto na forma amorfa. A presença da fase amorfa causa um aumento na taxa de dissolução em razão de sua maior solubilidade (DOROZHKIN; EPPLE, 2002).

A primeira cerâmica utilizada como substituto de parte do osso foi o gesso em 1894. O primeiro reparo do defeito ósseo com fosfato de cálcio feito com sucesso foi noticiado em 1920 por Albee (MENDES-FILHO, 2006). Atualmente, as apatitas sintéticas, dentre estas a HA, tem se destacado como um substituto ósseo que mimetiza o componente inorgânico do tecido ósseo.

A propriedade desejável para materiais aloplásticos ou sintéticos depende do local de implantação. O material deve ser biodegradável, sendo substituído pelo tecido que se deseja reparar, interagir com moléculas, ser bioativo, biocompatível, não tóxico e não carcinogênico. Algumas características são relevantes para a reparação óssea, tais como idade, sexo, saúde geral e doenças concomitantes do hospedeiro (ROLIM, 2010).

A HA é um dos materiais mais biocompatíveis devido à similaridade química da HA sintetizada com a matriz inorgânica dos tecidos ósseos, e esta biocompatibilidade favorece o crescimento ósseo. A biocompatibilidade se refere à capacidade de um biomaterial realizar sua função na terapia regenerativa sem efeitos indesejáveis locais ou sistêmicos com apropriada resposta celular para situações específicas.

Embora os fosfatos de cálcio, como a HA, não demonstrem osteoindução, elas certamente possuem habilidades osteocondutoras, e uma notável habilidade de

se ligar diretamente ao osso (BURG et al., 2000).

A HA em formato de microesferas permite a sua aplicação por meio de sistemas injetáveis com a utilização de técnicas cirúrgicas pouco invasivas. A partir da utilização desse formato, podem se moldar no leito receptor, auxiliar na promoção da angiogênese e da adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, com posterior formação de matriz osteoide em nível local (BARRIAS et al., 2005, 2006; MARCACCI et al., 2007; ROLIM, 2010).

Além disso, a HA é bioativa, estabelece ligações de natureza química entre o biomaterial e o tecido ósseo, induz reação biológica, resultando em osteointegração com formação óssea entre o tecido e o implante (DUCHEYNE; QIU, 1999).

Os biomateriais à base de fosfato de cálcio são considerados materiais bioativos devido à sua capacidade de participar ativamente no processo de cicatrização e/ou regeneração do tecido ósseo (MURUGAN; HAMAKRISHNA, 2005) e permitir a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas as quais não a distinguem da superfície óssea, o que indica a grande similaridade química superficial desses materiais (SANTOS, 2002). A formação de tecido ósseo e sua adesão ao biomaterial são o resultado das múltiplas reações que ocorrem nessa interface.

A reatividade superficial é uma característica essencial nos substitutos ósseos bioativos e consiste na habilidade de integração ao osso por meio da adesão, proliferação e diferenciação das células ósseas. Esta característica também favorece a mineralização (TEIXEIRA, 2009).

Uma das vantagens das biocerâmicas à base de fosfato de cálcio, utilizadas como enxertos ósseos, é que tanto os íons cálcio quanto os íons fosfato não interferem na função celular e fisiológica dos tecidos adjacentes, que proporcionam uma resposta tecidual favorável ao tratamento. A liberação de cálcio e fosfato podem ser estimuladores da formação óssea, bem como na reprecipitação de uma camada de apatita carbonatada sobre a superfície do biomaterial, sendo possível estabelecer uma ligação química com o osso neoformado (LEGEROS, 2002).

As apatitas são definidas pela fórmula química $M_{10}(Y_6)Z_2$. As espécies M são tipicamente cátions metálicos divalentes como Ca^{+2} , Sr^{+2} , Ba^{+2} , Pb^{+2} ou Cd^{+2} . As espécies Y são os ânions trivalentes: PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , VO_4^{3-} , CrO_4^{3-} ou MnO_4^{3-} . Os ânions monovalentes Z são geralmente F^- , OH^- , Br^- ou Cl^- . Os diferentes grupos das apatitas são referenciados com base nos seus ânions predominantes, ou seja,

fluorapatita (F), hidroxiapatita (OH), cloroapatita (Cl) entre outros (LEGEROS, 1991; ELLIOT, 1994).

Segundo Aparecida e colaboradores (2007), as possíveis relações Ca/P das apatitas, seus nomes e fórmulas estão apresentados na Tabela 1.

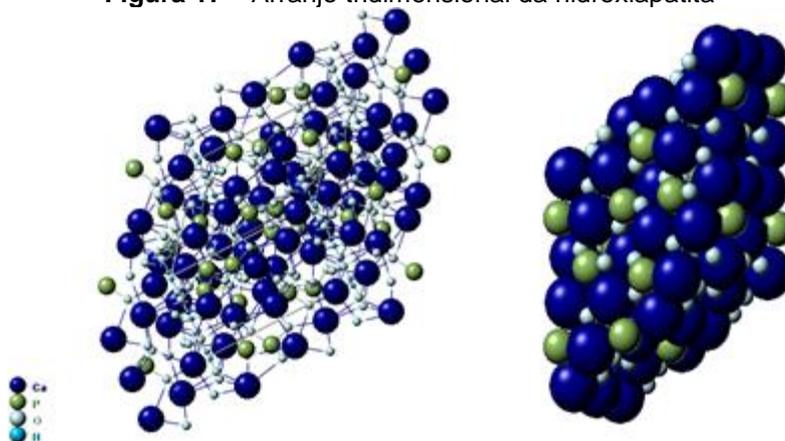
Tabela 1 – Tipos, fórmula química e relação Ca/P das apatias

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	Ca/P
Fosfato Tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato tricálcico (α , α' , β , γ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio diidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	CaHPO_4	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio diidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato Heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato Monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio (α , β , γ) (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Fonte: Aparecida et al., 2007.

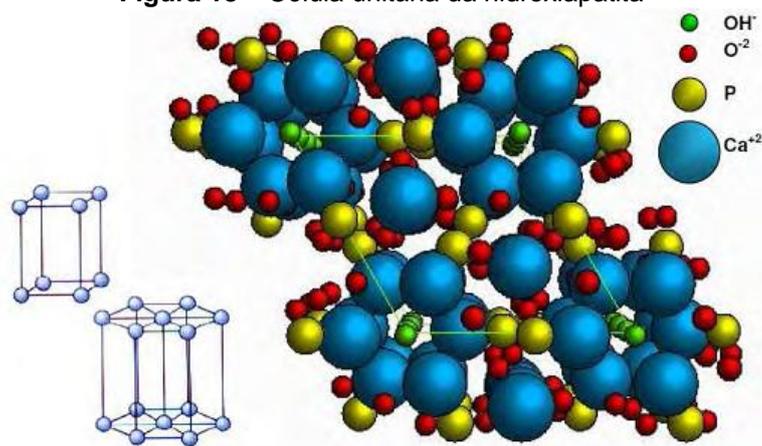
A HA estequiométrica, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – cuja razão molar Ca/P é igual a 1,67 – é constituída a partir de uma rede tridimensional de óxido de cálcio e poliedros de fosfato. A sua célula unitária contém uma representação completa do cristal de apatita, que consiste em grupos de Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- empacotados juntos em um arranjo como visto nas figuras 17 e 18.

Figura 17 – Arranjo tridimensional da hidroxiapatita

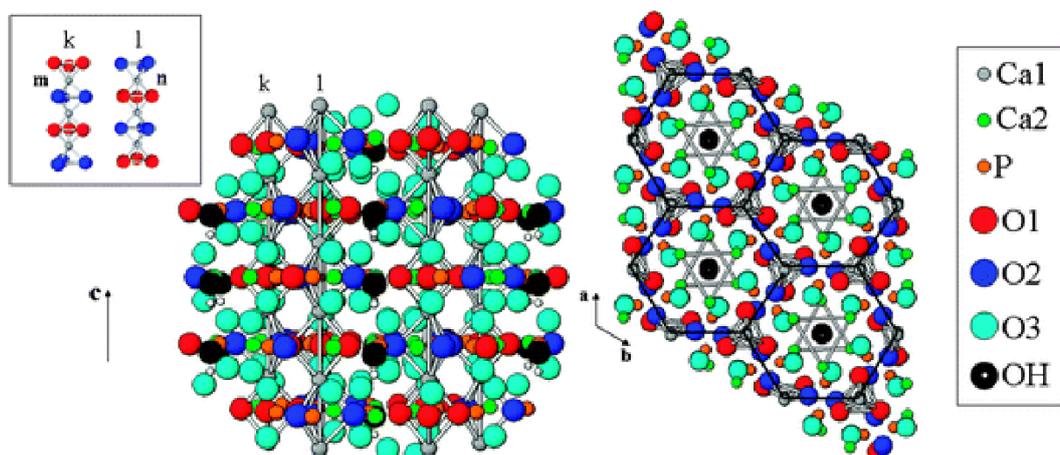


Fonte: Hughes, Cameron, Crowley, 1989.

Figura 18 – Célula unitária da hidroxiapatita



Fonte: Elliott, 1994.

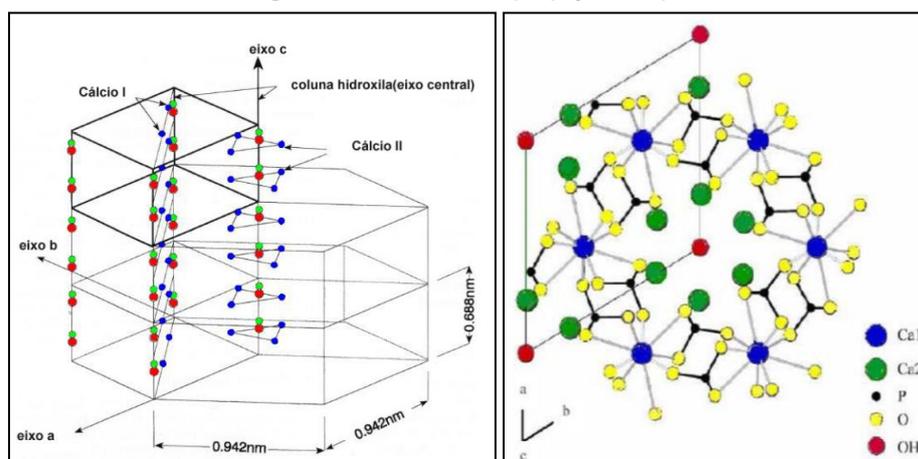


Fonte: Terra et al., 2009.

A célula unitária hexagonal da HA contém 10 íons cálcio localizados em sítios não equivalentes, quatro no sítio I (Ca_I), alinhados em triângulos equiláteros perpendiculares à direção c , e seis no sítio II (Ca_{II}), alinhados em coluna (Figuras 18 e 19). A existência de dois sítios de íons cálcio traz consequências importantes para as HAs que contêm impurezas catiônicas, pois suas propriedades estruturais podem ser afetadas dependendo do sítio ocupado pelo cátion da impureza (ELLIOTT, 1994).

Os triângulos equiláteros de íons O^{2-} e de íons Ca^{2+} estão ligados entre si por dois íons fosfato situados em planos perpendiculares à direção c (Figura 19) e outros dois paralelos a esta direção (ELLIOTT, 1994).

Figura 19 – HAP com projeção no plano



Fontes: Adaptado de Ivanova, 2001; Sant'Anna, 2009.

No esqueleto e nos dentes, 90% do cálcio é encontrado na forma de HA. Além deste, outros fosfatos de cálcio estão presentes durante as diferentes etapas do desenvolvimento ósseo, como por exemplo, o fosfato octacálcico, a monetita, a brushita, o fosfato de cálcio amorfo e o pirofosfato de cálcio (ARAÚJO; SANTOS-FILHO, 2008).

A HA estequiométrica apresenta 39,9% da sua massa de cálcio, 18,5% de fosfato e 3,38% de hidroxila. Entretanto, a HA presente nos ossos naturais tem sítios de fosfato substituídos, carbonatos (traços de CO_3^{2-}) e isso a torna biologicamente mais reativa (ARAÚJO; SANTOS-FILHO, 2008).

Os cristais de HA pura depositados nos tecidos humanos são similares a HA do osso. A deposição ocorre em duas etapas: iniciação (ou nucleação) e proliferação (ou crescimento). A nucleação que ocorre em duas fases consiste na acomodação de hexágonos de HA na molécula de colágeno ou osteonectina. A fase intracelular da nucleação ocorre nas mitocôndrias das células mortas ou lesadas. A fase extracelular ocorre nas vesículas da matriz (organelas extracelulares que têm composição e atividade enzimática distintas das membranas plasmáticas que lhes deram origem). Estas vesículas possuem diâmetro entre 25 a 250 μm que são originadas de células degeneradas ou necróticas próximo à área de mineralização (ARAÚJO; SANTOS-FILHO, 2008).

Os fosfolipídios ácidos presentes nessas vesículas, principalmente fosfatidilserina, agem como captadores e precipitadores de cálcio. Além disso, fosfatases também presentes nessas vesículas parecem inibir os mecanismos inibitórios da precipitação dos sais representados pelos pirofosfatos e

proteoglicanos. A proteólise destes aumenta a formação de HA por permitir maior mobilidade de íons, facilitando a saturação dos fluidos extracelulares (ARAÚJO; SANTOS-FILHO, 2008).

A etapa de proliferação do núcleo é a progressão autocatalítica da deposição dos sais. Esta etapa é influenciada por múltiplos fatores extracelulares: cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, análogos da osteocalcina, osteopontina, pH do tecido, vitamina D, balanço hormonal, suprimento sanguíneo e solução de continuidade de tecidos moles (ARAÚJO; SANTOS-FILHO, 2008).

As apatitas e seus derivados, em particular a HA, têm sido amplamente investigados. O desempenho de um material sintético depende de parâmetros fundamentais, tais como a composição química, a morfologia e a biodegradabilidade. E, se o tamanho do cristal da HA for pequeno e/ou se existirem incorporações de carbonatos, a biodegradação aumentará mais, devido à alta solubilidade (TADIC; EPPLE, 2004).

As propriedades físicas dos biomateriais de fosfato de cálcio estão correlacionadas com a área de superfície ou ainda formato (bloco, partícula, pó, esfera, membrana, esponja), a porosidade (denso, macro ou microporoso) e a cristalinidade (cristalino ou amorfo) (TEIXEIRA, 2009).

Há dois tipos de HAs: as sintetizadas em altas temperaturas e que apresentam boa cristalinidade e cristais grandes; e as HAs sintetizadas em baixas temperaturas que apresentam baixa cristalinidade e cristais pequenos (COSTA et al., 2009). A HA precipitada por via úmida possui características similares ao tecido ósseo e dentário. Nos métodos convencionais de precipitação alguns, fatores devem ser controlados: relação Ca/P dos reagentes, pH, temperatura, tempo de reação e tempo de maturação. Esses fatores podem conduzir a diferenças na estequiometria, cristalinidade e morfologia do material (ARAÚJO; SANTOS-FILHO, 2008).

A precipitação de HA estequiométrica (HAP), com relação Ca/P de 1,67 em solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ é obtida em pH próximo de 10,4 e, com o aumento do tempo da reação, há um aumento na relação Ca/P, que resulta na deficiência de cálcio e aumento do tamanho dos cristalitos. A elevação da temperatura aumenta o tamanho das partículas e influencia na sua morfologia (RIGO et al., 2007). As temperaturas entre 25 a 37°C são necessárias para a obtenção de partículas de HA similares às do osso humano (ARAÚJO; SANTOS-FILHO, 2008).

Um biomaterial cristalino possui uma organização atômica bem definida, ao contrário de um material amorfo, em que os cristais passam a apresentar um formato irregular. A cristalinidade é uma propriedade que altera o índice de dissolução do biomaterial e é dependente da temperatura de sinterização (RIGO et al., 2007). O uso de altas temperaturas (acima de 1000°C) por um período de no mínimo 6 horas, seguido de um resfriamento lento durante o processo de síntese, resulta na formação de cristais e com menor grau de degradação (TEIXEIRA, 2009). A temperatura na qual a precipitação se processa tem grande importância na fase obtida e na conversão das fases (RIGO et al., 2007).

A degradação dos fosfatos de cálcio ocorre em diferentes níveis. Essa reabsorção é importante que ocorra na medida em que o biomaterial vai sendo substituído pelo novo osso formado. Esta reabsorção é causada pela dissolução físico-química do biomaterial em pH local no meio fisiológico. Há uma redução do pH local e as partículas são degradadas em tamanhos menores, sendo então fagocitadas. A velocidade de reabsorção aumenta proporcionalmente ao aumento da área de superfície (pó > sólido poroso > sólido denso) com o decréscimo da cristalinidade, com a diminuição do tamanho dos grânulos e pela substituição de CO_3^{2-} nos sítios de fosfato ou por outros íons metálicos nos sítios do cálcio (ARAÚJO; SANTOS-FILHO, 2008; KAWASHI, 1997; RATNER et al., 1996).

O tamanho da partícula do biomaterial impacta diretamente no tamanho da área da superfície disponível para reagir com células e no fluido biológico. Quanto maior o tamanho das partículas, maior será o tempo de reabsorção do biomaterial (TEIXEIRA, 2009).

O tamanho das partículas de um biomaterial osteocondutor é uma fator relevante no processo de fagocitose. As partículas com 50 μm ou menos podem ser mais facilmente fagocitadas pelos osteoclastos e macrófagos. Além disso, as partículas com tamanho nanométrico exibem melhor bioatividade e melhor adesão de células ósseas. Após a fagocitose dessas partículas, há um aumento na transcrição gênica e biosíntese proteica que é caracterizada por uma maior atividade metabólica (GRÉGOIRE; ORLY; MENTANTEAU, 1990).

No caso da precipitação em solução aquosa, onde a temperatura não excede 100°C, podem-se preparar cristais de tamanho nanométricos. Conforme descrito por Rodríguez-Lorenzo e Vallet-Regi (2000), a 90°C, os cristalitos variaram de 20 a 80 nm. Sua cristalinidade e razão molar Ca/P dependem fortemente das condições de

preparação. A taxa na qual os reagentes são adicionados influencia na taxa de nucleação dos cristais. A velocidade de gotejamento dos reagentes está diretamente relacionada à cinética da reação. A adição lenta de íons fosfato proporciona menor taxa de nucleação e maior taxa de crescimento, o que implica na obtenção de partículas maiores. Pelo contrário, altas taxas de adição de reagentes permitem a formação de maiores números de núcleos de cristalinização, mas sem que haja tempo suficiente para o crescimento de grãos (RIGO et al., 2007).

A composição química, a razão molar cálcio/fosfato, o grau de impureza elementar e substituição iônica na estrutura atômica são propriedades químicas que somadas ao ambiente mecânico influenciam o índice de dissolução do biomaterial, assim como na indicação ou restrição da sua aplicação clínica (MAVROPOULOS, 1999).

A existência de dois sítios de íons cálcio traz consequências importantes para as hidroxiapatitas que contêm impurezas catiônicas, pois suas propriedades estruturais e biológicas podem ser afetadas a depender do sítio ocupado pelo cátion da impureza (MAVROPOULOS, 1999).

Uma reabsorção acelerada dos biomateriais ocorre quando impurezas são observadas em sua estrutura (ex. carbonato de cálcio), e quando o pH do leito receptor diminui. É de suma importância entender que as propriedades dos biomateriais dependem primariamente da natureza e do processo de fabricação. Além disso, deve ser destacada a importância da caracterização, levando-se em consideração as propriedades físico-químicas relacionadas à composição química, morfologia, cristalinidade, área superficial específica e expectativa de degradação (BURG et al., 2000; HORNEZ et al., 2007).

A porosidade melhora a conexão mecânica entre o biomaterial e o osso, além de promover melhor estabilidade mecânica na interface. A formação de poros sub-micrométricos favorecem a circulação do fluido fisiológico na superfície de um biomaterial (LEGEROS, 1991). Dimensões adequadas de poros favorecem o entrelaçamento do tecido com o biomaterial (TEIXEIRA, 2009). Os biomateriais que apresentam macroporosos ($> 50 \mu\text{m}$) e microporosos ($< 50 \mu\text{m}$) possuem uma área de superfície maior para a solução e a reabsorção mediada pelas células. Além disso, ocorre uma redução significativa na resistência à compressão e tensão (TEIXEIRA, 2009). Os macroporos medindo entre 150 e 500 μm promovem o espaço necessário para a invasão vascular e, subsequente, maior neoformação

óssea através do biomaterial (FLECKENSTEIN et al., 2006).

O material poroso, com poros interconectados, também oferece regiões adicionais para o crescimento interno e a integração do tecido, promovendo uma estabilização mecânica e, portanto, a minimização do movimento e da deterioração dinâmica associada ao desgaste na interface. O tamanho ideal do poro para permitir a neoformação óssea ainda é discutido na literatura. Alguns autores afirmam que poros com diâmetro de 100 μm (SCHLIEPHAKIE; NEUKAM; KLOSA, 1991; VAN BLITTERSWIJK et al., 1986) são necessários para a migração e o transporte celular, entretanto, poros maiores que 300 μm permitem o desenvolvimento de um sistema de capilares, favorecendo a neoformação óssea (TEIXEIRA, 2009).

Uchida e colaboradores (1984) encontraram melhor penetração de tecido ósseo em biomateriais com poros entre 210 e 300 μm do que naqueles com poros entre 150 e 200 μm . Hulbert e colaboradores (1970) mostraram que os poros menores que 10 μm impedem o crescimento de células, e poros entre 15 e 50 μm estimulam o crescimento fibrocelular, enquanto que os poros de 50 a 150 μm resultam em formação de osteoide, e poros maiores que 150 μm facilitam o crescimento de osso mineralizado.

Dalculsi e Passuti (1990) concluíram, ao comparar poros entre 100 a 600 μm , que a invasão tecidual se dá mais rapidamente em estruturas com porosidades maiores do que 100 μm , e a dimensão de 100 μm só permite o crescimento ósseo. A interconexão dos poros é também necessária para facilitar a invasão de células e vasos sanguíneos, especialmente na região central do arcabouço (SHIMAZAKI; MOONEY, 1985).

Entretanto, o sistema de Havers, presente no osso cortical possui uma faixa de diâmetro de poro de 190 a 230 μm , enquanto que o diâmetro de poro de um osso esponjoso está entre 500 e 600 μm (HULBERT et al., 1970).

A desvantagem do material poroso é a sua fácil desintegração e, conseqüentemente, a perda de função, além da dificuldade adicional de seu preparo para se obter a uniformidade dos poros (SARTORIS, et al., 1986).

O controle da macro e microporosidade é um fator de suma importância para a eficiência do material enxertado no paciente. A colonização celular dos substitutos ósseos depende das características de porosidade do biomaterial, em particular ao tamanho e a distribuição dos poros e ao número e tamanho das interconexões entre os macroporos. Essas interconexões formam uma espécie de sistemas de túneis os

quais permitem o acesso e o retorno dos fluidos biológicos e a entrada de células ósseas que subseqüentemente irão facilitar a neoformação óssea no interior do biomaterial (TEIXEIRA, 2009).

Por outro lado, os poros também aumentam a área de superfície do material, porém, quanto maior a porosidade, mais rápida será a dissolução do enxerto.

Durante a sinterização, ocorrem mudanças, devido à decomposição ou às transformações de fases. Comumente, podem-se destacar, segundo Kingery (1976), citado por Mendes-Filho (2006) três grandes mudanças na microestrutura: aumento do tamanho de grão na forma dos poros, no tamanho e número de poros e, conseqüentemente, diminuição da porosidade.

A HA pode ser sintetizada e ser submetida ou não a tratamento térmico. A faixa de temperatura até 900°C é considerada como temperatura de calcinação. A HA sinterizada, ou seja, tratada termicamente acima de 1000°C, tem sua estrutura cada vez mais cristalina, formada por cristais que tendem a coalescer conforme ocorre o aumento da temperatura (MENDES-FILHO, 2006).

Na HA sinterizada, durante o tratamento térmico, ocorre uma série de transformações em função dos componentes da massa, tais como: perda de massa, desenvolvimento de novas fases cristalinas, transformações de fases, fusão de fase vítrea e a formação dos grãos (BALASUNDARAM et al., 2006). Estas características não são observadas em HA não sinterizadas e influenciam nas propriedades biológicas dos biomateriais.

A HA não sinterizada (PAULA, 2008; ROLIM 2010) apresentou melhor regeneração de defeitos ósseos críticos, quando comparada com a HA sinterizada (BARRETO, E., 2006; BARRETO, I., 2008, 2011).

Os biomateriais são objetos de estudo pela bioengenharia tecidual e, dentre os diversos existentes, tem-se os biomiméticos que utilizam conceitos inspirados na natureza capazes de acelerar de forma eficiente os processos regenerativos, especialmente em defeitos críticos. Dessa modo, o biomaterial, quando implantado, deve funcionar como um arcabouço bioativo, biocompatível com características osteogênicas que possibilitem a migração, adesão e proliferação de células da linhagem osteogênica com subseqüente deposição de matriz osteoide. É importante salientar que este potencial biológico osteogênico dos biomateriais está condicionado às suas características físico-químicas e morfológicas, 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 (BOYCE et al., 1999).

Os biomateriais desenvolvidos pela 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 nessa escala podem permitir o aprimoramento de novos arcabouços regenerativos.

A HA, enquanto biomaterial, tem diversas formas de apresentação, como pó, pasta, gel, membrana, bloco, disco, grânulo, microesfera, dentre outras a depender da aplicabilidade desejada. Além da forma que permite diversos tipos de arcabouço há as modificações de superfície em associação ou não com outros biomateriais ou ainda é possível alterar a microestrutura molecular da hidroxiapatita. Dentre os biomateriais empregados em associação com a HA, os biopolímeros, tais como o colágeno, a gelatina, o alginato, e a quitosana têm sido atualmente os mais investigados.

Na literatura, há trabalhos com diversos tipos de HA enquanto arcabouço osteocondutor ou no preenchimento de defeitos ósseos (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2011; BOSCH; MELSEN; VARGEVIC, 1998; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2011).

A HA é amplamente utilizada como biomaterial de preenchimento em arcabouços densos ou porosos, 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; HIRATA; YOSHINAKA, 2003).

A HA é um biomaterial de fácil preparo e apresenta baixo custo de produção (LONG, 2008; ZHANG et al., 2007), sendo indicado também em casos em que há limitações na aquisição de enxerto autógeno.

A associação de enxertos aloplásticos (HA) com o enxerto autógeno também tem ampla aplicabilidade clínica (EL-ADL et al., 2009).

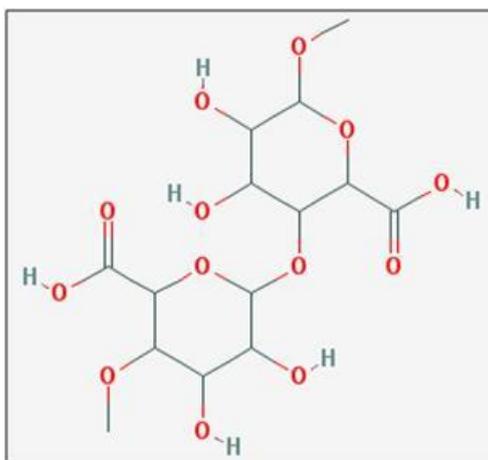
A esterilização da HA, enquanto biomaterial, é crítica, por ser um material higroscópico com capacidade de absorver impurezas. A HA é uma das substâncias mais importantes para a datação arqueológica com a retrospectiva pela dosimetria.

Além disso, a radiação ionizante por raios gama a depender da dose, tempo de esterilização, tipo do biomaterial, tamanho e morfologia da partícula e tipo de síntese, pode favorecer a incorporação ou a ligação de radicais, como ânions de carbonato (CO_2^-), à superfície dos cristais (HAJILOO; ZIAIE; MEHTIEVA, 2011).

2.4 ALGINATO

Os alginatos são polissacarídeos naturais, hidrofílicos, extraídos de algas pardas ou de algas marrons (Phaeophyceae); são biodegradáveis, biocompatíveis e atóxicos. O alginato de sódio, de fórmula molecular $(\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6)_n$, é o sal de sódio do ácido algínico, conforme mostrado na figura 20 (DRAGET; SMIDSRÖD; SKJAK-BRAEK, 2005; LEE, K.; MOONEY, 2012).

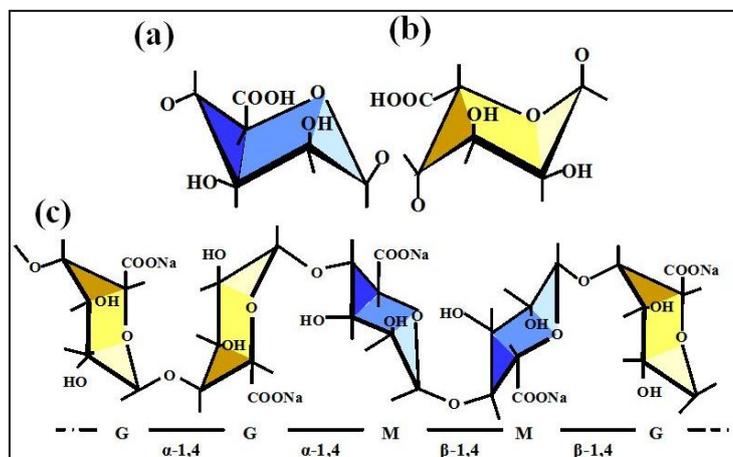
Figura 20 - Ácido algínico: fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_{13}$ massa molecular: 398.31668[g/mol]



Fonte: Pubchem, 2012a.

Estes polissacarídeos são polímeros lineares do ácido (1,4) β -D-Manurônico (unidades *M*) e de ácido α -L-Glucurônico (unidades *G*) que apresentam variação na proporção e distribuição sequencial ao longo da cadeia polimérica (Figuras 21 e 22). As propriedades físicas destes polímeros são determinadas por sua composição, extensão das sequências lineares e por sua massa molecular (LEE, K; MOONEY, 2012).

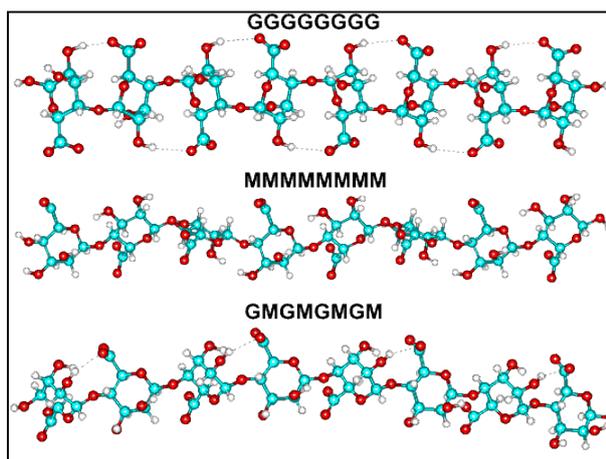
Figura 21 – Alginato: (a) ácido β -D-Manurônico (unidades *M*); (b) ácido α -L-Glucurônico (unidades *G*); (c) cadeia homopolimérica com ligações α -1,4 e β -1,4



Fonte: Kajima, Imai, 2012.

Alginatos não são copolímeros aleatórios, mas, de acordo com a fonte de algas, consistem em blocos de resíduos semelhantes e rigorosamente alternados (isto é, *MMMMMM*, *GGGGGG* e *GMGMGMGM*), cada um dos quais tem diferentes preferências conformacionais e de comportamento (Figura 22). Os alginatos podem ser preparados com uma vasta gama de pesos moleculares médios (50-100000 resíduos) para se adequar à aplicação (CHAPLIN, 2012).

Figura 22 – Resíduos do alginato



Fonte: Chaplin, 2012.

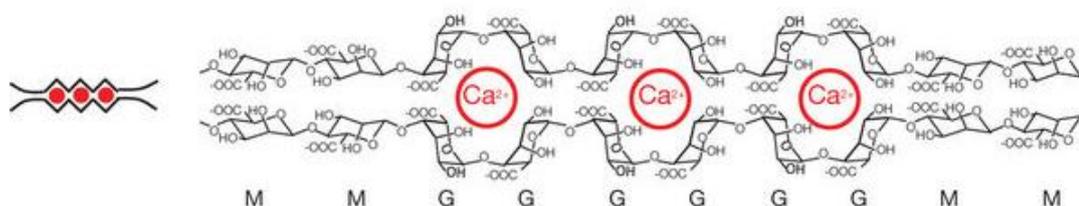
As propriedades físicas (por exemplo, viscosidade e massa molecular média) de alginato de sódio são muito sensíveis aos fatores físico-químicos (por exemplo, pH e força iônica total). No pH próximo ao neutro, a carga negativa elevada de

alginatos de sódio, devido aos grupos funcionais carboxílicos desprotonados, induz forças eletrostáticas repulsivas inter- e intra-moleculares. A mudança da força iônica de uma solução aquosa de alginato de sódio tem um efeito significativo, especialmente sobre a extensão da cadeia de polímero (KAJIMA; IMAI, 2012).

Uma cadeia molecular de alginato pode ser construída com três tipos de blocos poliméricos: blocos homopoliméricos de ácido manurônico (*M*), ácido glucurônico (*G*) e blocos com uma sequência alternada em proporções variáveis (*MG*). Entretanto, uma estabilidade muito mais elevada do gel está diretamente correlacionada com de longas sequências alternadas (KAJIMA; IMAI, 2012).

Os polímeros iônicos podem ser reticulados pela adição de íons di- ou tri-valentes. Isto fundamenta o princípio do método de gelificação de uma solução de polieletrólito (por exemplo, alginato de Na^+) com um íon multivalente de cargas opostas (por exemplo, $\text{Ca}^{2+} + 2\text{Cl}^-$) (SUN et al., 2012). A reticulação com o cálcio, com a introdução de cargas positivas na molécula (Figura 23) ocorre na formação de microesferas de HA.

Figura 23 – Gelificação ionotrópica. Interação entre os grupos aniônicos do alginato (COO^-) com íons metálicos divalentes (Ca^{2+})

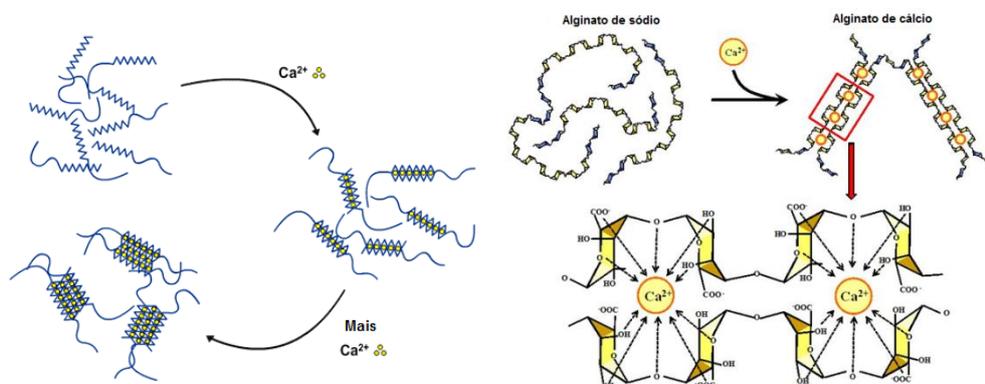


Fonte: Sun et al., 2012.

Os íons, cátions bivalentes, como o Ca^{2+} ligam-se entre o bloco *G* das cadeias de alginato adjacentes com criação de pontes iônicas intercadeias que causam gelificação de soluções de alginato aquoso. No entanto, o alginato e outros hidrogéis são capazes de limitar a adsorção de proteína, devido à natureza hidrofílica do polímero (ROWLEY et al., 1999).

O alginato de sódio rapidamente forma uma estrutura de gel com a presença de cátions divalentes, tais como o Ca^{2+} , e isto resulta em uma rede de gel altamente compactada, conforme observado no modelo a seguir da figura 24 (KAJIMA; IMAI, 2012).

Figura 24 - Modelo de caixa de ovos (“eggs - box”). Neste modelo nota-se a ligação de cátions divalentes às moléculas de alginato de sódio. A gelificação dos blocos homopoliméricos de ácido α -L-glucurônico com íons cálcio



Fonte: Adaptado de Kajima, Imai, 2012.

As partículas esféricas de gel de alginato de cálcio são frequentemente investigadas e aplicadas como um transportador de enzimas imobilizadas (KONSOULA; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2006), no encapsulamento de fármacos (ALMEIDA, P.; ALMEIDA, A., 2004), no microencapsulamento celular (MILOVANOVIC; BOZIC; VUJIC, 2007), em suplementos alimentares (DEMBCZYNSKI; JANKOWSKI, 2000) e na confecção de esferas de biomateriais para o reparo ósseo (PAULA, 2008; ROLIM, 2010). O alginato também pode ser empregado na confecção de membranas poliméricas artificiais para uso biomédico na indústria alimentícia ou para a purificação de água (KAJIMA; IMAI, 2012).

Os alginatos são empregados pela engenharia de tecidos como agentes encorpantes, sistemas de liberação de droga, arcabouço celular, e em modelos de matriz extracelular (ALEXANDER; HYUN; DAVID, 2006; LEE; MOONEY, 2012).

Embora a biocompatibilidade do alginato tenha sido extensivamente avaliada *in vitro*, bem como *in vivo*, ainda há debate quanto ao impacto biológico da composição desse biomaterial. Dentre os aspectos avaliados, está o nível de pureza (LEE; MOONEY, 2012). Tem sido relatado pela literatura que quando apresentam elevado teor de resíduos M, foram imunogênicos e aproximadamente 10 vezes mais potentes na indução da produção de citocinas em comparação com alginatos com teor de resíduos G elevado (OTTERLEI et al., 1991), mas outros autores encontraram pouca ou nenhuma resposta imune em torno dos implantes de alginato (ZIMMERMANN et al., 1992). A resposta imunogênica à implantação local de alginatos pode ser atribuída às impurezas que permanecem. Uma vez que o alginato

é obtido a partir de fontes naturais, várias impurezas, tais como metais pesados, endotoxinas, proteínas e compostos polifenólicos podem estar presentes. Entretanto, quando o mesmo é purificado, passa por um processo de extração de múltiplos passos até obter-se uma pureza muito elevada, e este não induz qualquer reação significativa de corpo estranho, quando implantadas em animais (ORIVE et al., 2002). De forma geral, não há uma resposta inflamatória significativa com o uso de géis formados a partir do alginato comercialmente disponível (LEE; MOONEY, 2012).

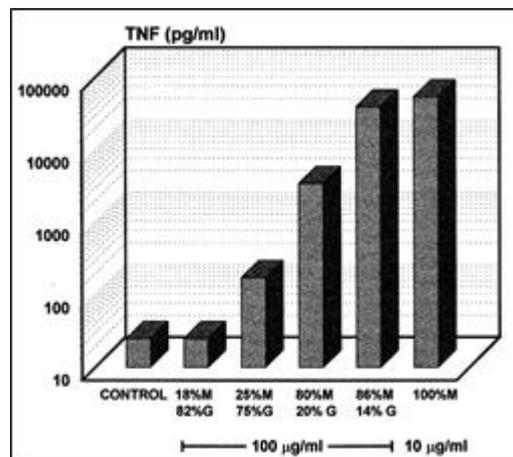
O alginato, quando encapsulado por fibroblastos ou por fagócitos, pode produzir reação de corpo estranho com liberação de citocinas TNF e IL1. Esta resposta imune pode estar relacionada às ligações glicosídicas (1→4) (DRAGET; SMIDSRØD; SKJÅK-BRÆK).

Entretanto, quando existe uma reação inflamatória intensa, os macrófagos passam a secretar uma ampla variedade de citocinas, produtos biologicamente ativos que são importantes mediadores da destruição tecidual e do reparo ósseo da proliferação vascular e da fibrose, características de inflamação crônica. (YANG; JONES, 2009)

Além disso, estas células do sistema imunológico produzem substâncias tóxicas para as células teciduais (metabólitos do oxigênio) ou para a matriz extracelular (proteases). Algumas geram o ingresso de outros tipos celulares (citocinas e fatores quimiotáticos) e outras induzem a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno. Com a formação de exsudato fibrinoleucocitário, os macrófagos podem transformar-se em células espumosas (macrófagos com citoplasma volumoso, claro) e, caso o volume desse líquido seja muito abundante, pode permanecer e ser encapsulado por um tecido conjuntivo fibroso; eventualmente, nesses casos pode tornar-se calcificado (ROBBINS; COTRAN, 2012).

A indução da TNF e da IL-1, duas citocinas produzidas pelos macrófagos e que possuem atividades pró-inflamatórias em bioensaios, mostraram que a indutibilidade dependia do teor de manuronato no alginato (Figura 25). Quanto maior este teor *M*, maior a resposta imune, identificada pelo aumento destas citocinas (DRAGET; SMIDSRØD; SKJÅK-BRÆK).

Figura 25 – Produção do fator de necrose tumoral (TNF) de monócitos humanos como resposta a alginatos com diferentes conteúdos de resíduos de ácido manurônico



Fonte: Draget; Smidsrød; Skjåk-Bræk, 1997.

O alginato puro é inerentemente não degradável no trato gastrointestinal em humanos, uma vez que não possui a enzima (ou seja, alginase) que pode clivar as cadeias desse polímero. Entretanto, os géis de alginato, reticulados com íons divalentes por meio de ligações cruzadas, podem ser dissolvidos com libertação desses íons para o meio circundante devido às reações de troca com cátions monovalentes, tais como os íons sódio (DRAGET; SMIDSRØD; SKJÅK-BRÆK, 2005).

Os pesos moleculares médios de vários alginatos disponíveis comercialmente são maiores do que o limiar de eliminação renal. Todavia, os alginatos com pesos moleculares menores, que são degradáveis em condições fisiológicas, podem ser obtidos por oxidação parcial de suas cadeias moleculares. A taxa de degradação dos géis de alginato é fortemente dependente do grau de oxidação, do pH e da temperatura do meio (LEE; MOONEY, 2012). O alginato pode agir contra infecções letais bacterianas, não aumentando a imunidade inespecífica (DRAGET; SMIDSRØD; SKJÅK-BRÆK).

Acredita-se que o encapsulamento de células pelo alginato permite utilizá-lo no futuro no transplante celular. Esse gel pode atuar como uma barreira entre o órgão ou tecido transplantado e o sistema imune do hospedeiro. Diferentes linhagens de células têm sido sugeridas na imobilização por esse gel de alginato, tais como: células da paratireoide no tratamento da hipocalcemia, células da adrenal para a produção de dopamina, células (de reação “cromafim”) para a cura da doença de Parkinson, células do pâncreas para a cura do diabetes (DRAGET; SMIDSRØD;

SKJÅK-BRÆK)

O alginato ainda pode favorecer o transplante de populações de células que participam diretamente na formação do osso. O transplante de osteoblastos primários de calvária de rato com géis de alginato-RGD melhoram *in vivo* a formação do osso em relação ao controle. Além disso, a co-transplantação de condrócitos e osteoblastos primários em ratos com o uso desses géis permitiram a formação da placa de crescimento de estruturas semelhantes que podem ser potencialmente utilizados para substituir epífises disfuncionais (LEE; MOONEY, 2012).

As pesquisas com células-tronco em hidrogéis de alginato têm sido investigadas pela engenharia de tecidos no reparo de defeitos ósseos. Estes géis também são empregados em pesquisas na liberação de proteínas e regeneração dos vasos sanguíneos e músculo (LEE; MOONEY, 2012). A ligação de vários fatores de crescimento ao alginato proporciona a entrega sequencial de fatores implicados nas fases precoce e tardia da angiogênese, a fim de promover a maturação das novas redes de vasos e maior funcionalidade. A entrega sequencial de VEGF seguido pelo fator de crescimento derivado de plaquetas - BB (PDGF-BB) resultaram em melhoria da função vascular com angiogênese e maturação de vasos sanguíneos, quando injetadas em ratos com feridas isquêmicas de membros posteriores e em sítios de infarto do miocárdio (HAO et al., 2007).

Apesar dos recentes progressos, o tratamento de lesões ósseas é ainda muitas vezes limitado devido à má reparação. Nesse sentido, os géis de alginato têm potencial na regeneração óssea por atuar no carreamento de fatores angiogênicos, osteoindutores, células osteoprogenitoras, ou a combinação destes. O gel de alginato tem vantagens na regeneração de osso e cartilagem em comparação com outros materiais, devido à sua capacidade de ser introduzida no corpo de uma forma minimamente invasiva. A sua capacidade para preencher defeitos de forma irregular, bem como a facilidade de modificação química com ligantes de adesão (por exemplo, RGD) e a liberação controlada de fatores de crescimento de tecidos (por exemplo, BMP e TGF- β) (LEE; MOONEY, 2012). No entanto, o gel de alginato não tem propriedades mecânicas suficientes para permitir a regeneração nos estágios iniciais sem a fixação do enxerto. O alginato também não é inerentemente degradável em condições fisiológicas, evidenciando a necessidade de controlar a sua degradação, a fim de que os géis residuais não interfiram com a regeneração. A utilização de gel de alginato-RGD permite a regeneração completa de defeitos

femorais com dimensões críticas em roedores com uma baixa dose de BMP (KOLAMBKAR et al., 2011).

O alginato, ao ser carreador de DNA, que codifica as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), favorece a osteogênese. A entrega de múltiplos fatores quer em combinação ou sequência, também poderá ser explorada de uma maneira semelhante à descrita para a angiogênese (LEE; MOONEY, 2012).

O alginato também pode ser associado com materiais inorgânicos para melhorar a formação de tecido ósseo. Compósitos de alginato/ hidroxiapatita (HAP) na forma de arcabouços porosos com poros interconectados foram preparados por um método de separação de fases, o que aumentou a adesão de células de osteossarcoma (LIN; YEH, 2004). Além disso, os géis de alginato contendo colágeno tipo I e β -fosfato tricálcico promoveram melhor adesão e proliferação de células estromais de medula óssea humana quando comparado ao meio contendo apenas géis de alginato puro (LAWSON et al., 2004).

O alginato tem grande potencial como um biomaterial para muitas aplicações biomédicas, particularmente nas áreas de cicatrização de feridas, na liberação e biodisponibilidade da droga em cultura celular e na engenharia de tecidos (LEE; MOONEY, 2012). As vantagens desse biomaterial para essas aplicações incluem biocompatibilidade, condições de gelificação e modificações simples para preparar derivados de alginato com novas propriedades. O alginato é seguro para uso clínico, sendo já empregado na cicatrização de feridas em curativos, como componente farmacêutico e já foi implantado de forma segura numa variedade de aplicações, que incluem, por exemplo, o transplante de ilhotas para o tratamento da diabetes do tipo 1 e transplante de condrócitos para o tratamento da incontinência urinária e refluxo vesicoureteral (LEE, K.; MOONEY, 2012) e pode também atuar como um carreador para promover a regeneração periodontal (SCULEAN et al., 2001).

Assim como outros hidrogéis, os géis de alginato têm limitações em suas propriedades físicas, tais como na rigidez mecânica. Um desafio constante é combinar essas propriedades físicas com a necessidade de uma aplicação particular. Há diferentes estratégias disponíveis de reticulação, como o uso de moléculas com estruturas químicas diferentes, os pesos moleculares, e a funcionalidade de reticulação, que muitas vezes produzem géis apropriados para cada aplicação (LEE, K.; MOONEY, 2012).

Os materiais à base de alginato poderão evoluir consideravelmente para que

tenham ampla aplicabilidade na medicina. Estes géis com características que mantenham a concentração local de fatores biológicos, tais como proteínas durante períodos de tempo prolongados são interessantes ao reparo tecidual. A concepção e criação de novos polímeros de alginato com melhores propriedades e novas funções podem ser alcançadas por meio de técnicas da engenharia genética para controlar a síntese bacteriana desse polímero (LEE, K.; MOONEY, 2012).

O controle dinâmico sobre a liberação de fármacos pode, potencialmente, melhorar a segurança e eficácia dos medicamentos e proporcionar novas terapias. A liberação do fármaco, a partir de géis de alginato em resposta a estímulos externos, tais como os sinais mecânicos e os campos magnéticos, pode ser mecanismo eficaz na reparação tecidual (LEE, K.; MOONEY, 2012).

A introdução de recursos como células-interativas no alginato também será crucial em muitas aplicações de engenharia de tecido. O tipo de ligante de adesão e a sua organização espacial em géis são variáveis importantes, uma vez que podem regular o fenótipo da célula e a função resultante de tecidos regenerados. Embora os peptídeos RGD tenham sido amplamente explorados como um ligante de adesão celular, múltiplos ligantes ou uma combinação de ligantes e fatores solúveis podem ser necessários para produzir tecidos e órgãos de substituição adequados (LEE, K.; MOONEY, 2012).

O alginato de cálcio apresenta propriedades intrínsecas que podem contribuir para a regeneração tecidual. Dentre estas propriedades, destacam-se a mucoadesão, biocompatibilidade, porosidade e a facilidade de manipulação do biomaterial (COVIELLO et al., 2007).

A maioria dos recentes estudos está centrada em melhorar a estabilidade mecânica e a resistência à erosão em diferentes fluidos orgânicos para tornar o gel de alginato mais adequado para as diversas aplicações (COVIELLO et al., 2007).

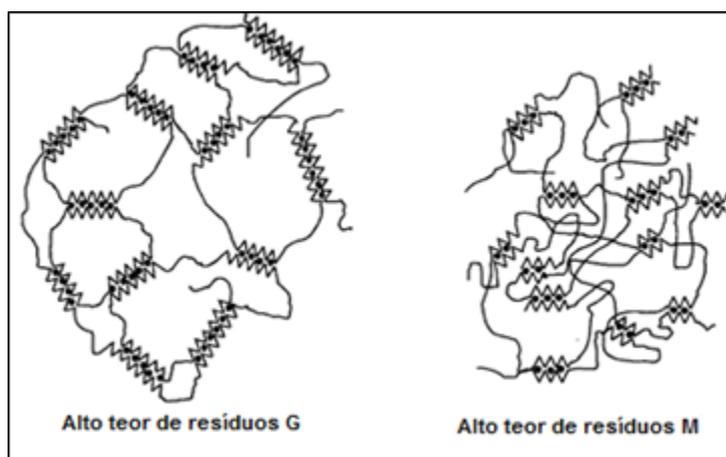
Outra abordagem para a modificação da superfície dos grânulos de gel de alginato de cálcio e de microesferas tem sido a interligação química do revestimento em torno do núcleo de alginato. Por exemplo, os grânulos com um invólucro de camadas múltiplas de quitosana reticuladas com fosfato melhoram a resistência mecânica. A abordagem com base na técnica de revestimento de microesferas com gel de alginato de cálcio também tem sido utilizada para produzir microcápsulas. Estas microcápsulas mostraram um comportamento peculiar de "atração" de macromoléculas com carga positiva dentro da sua estrutura. Esta técnica é

potencialmente muito promissora em aplicações biomédicas e biotecnológicas (COVIELLO et al., 2007).

Outra abordagem interessante relacionada com as propriedades do gel de alginato *in situ* é representada pela sua possível aplicação em compressas para feridas, devido a íons de cálcio nos exsudados (COVIELLO et al., 2007).

A porosidade das cápsulas de alginato pode ser modificada com alto teor de resíduos G (Figura 26). Esta propriedade mecânica é desejada de forma que pequenas moléculas possam difundir, quase sem restrições, dentro da cápsula e ao mesmo tempo mantenham os anticorpos do hospedeiro fora da cápsula. A porosidade pode ser modificada por meio de uma complexa ligação entre um polímero polianiônico – por exemplo, poli-L-lisina (PLL) – na superfície do alginato (DRAGET; SMIDSRØD; SKJÅK-BRÆK)

Figura 26 - Modelo proposto para a estrutura de rede em géis feitos a partir de alginatos com blocos de ácido glucurônico de diferentes comprimentos



Fonte: Draget; Smidsrød; Skjåk-bræk, 1997.

Na esterilização de soluções e géis de alginato, é importante compreender as limitações desses sistemas. Este polímero de cadeia simples é sensível a uma variedade de processos de despolimerização: as ligações glicosídicas são clivadas por mecanismos de degradação ácido e alcalina e por oxidação com radicais livres. Em função do pH, a degradação do alginato está em torno da neutralidade e aumenta em ambas as direções. É solúvel em água à temperatura ambiente e, para fins de imobilização, recomenda-se a filtração estéril, em vez de autoclave para manter as propriedades mecânicas do gel final (DRAGET; SMIDSRØD; SKJÅK-BRÆK, 1997). A esterilização dos pós secos de alginato não é simples e direta.

Quando realizada por irradiação gama, acredita-se geralmente que nessas condições O_2 é rapidamente esgotado com a correspondente formação de radical livre OH^\cdot muito reativo. Um curto tempo exposição aos raios gama em um acelerador de elétrons é uma alternativa ao invés do longo tempo da exposição convencional com fonte de ^{60}Co . Apesar de uma decomposição substancial do polímero ocorrer, a capacidade de gelificação é preservada. Esta diferença pode ser atribuída ao período muito curto de exposição aos raios gama, necessário para a esterilização no acelerador de elétrons (aproximadamente 1 minuto) em comparação de 1,5 horas em uma fonte tradicional, produzindo menos radicais livres a partir de O_2 no acelerador de elétrons (DRAGET; SMIDSRØD; SKJÅK-BRÆK, 1997).

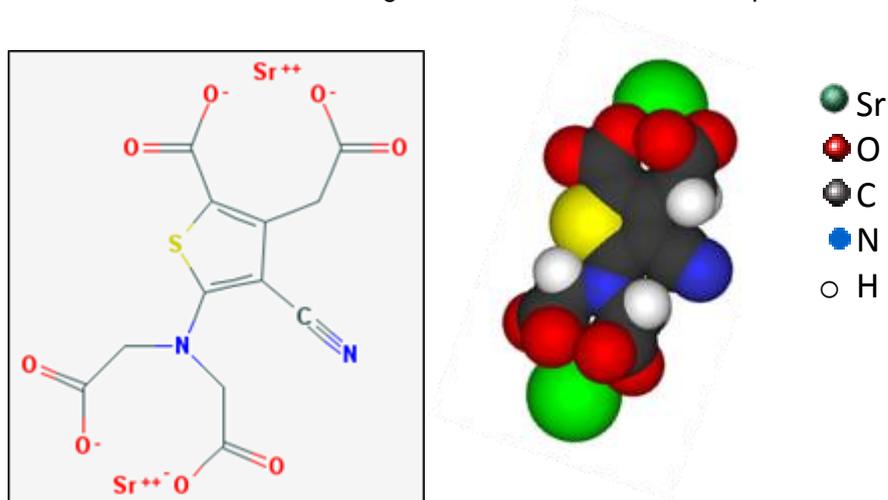
A esterilização com altas doses de irradiação com ^{60}Co reduz a massa molecular na medida em que a capacidade gelificante é quase completamente perdida (LEO; MCLOUGHLIN; MALONE, 1990). Com doses a partir de 10kGy já ocorrem alterações nas propriedades físico-químicas da molécula, tais como: alteração de cor, viscosidade, menor grau de gelificação, quebra de ligações glicosídicas, alteração na proporção dos radicais G/M (LEE, D. et al., 2003; NAGASAWA et al., 2000; RATNER et al., 2004; SEM et al., 2010).

2.5 RANELATO DE ESTRÔNCIO

O estrôncio foi descoberto na cidade escocesa Strontian em rochas de apatitas naturais em 1790 e isolado em forma impura em 1808 por Sir Humphrey Davy (CABRERA et al., 1999). O seu uso na medicina foi primeiramente descrito pela *Squire's Companion to the British Pharmacopoeia* em 1884. Em 1950, Shorr & Carter e McCaslin & Janes relataram os efeitos benéficos do estrôncio estável no tratamento da perda óssea por osteoporose pós-menopausa (NASCIMENTO, 2010).

O ranelato de estrôncio (RanSr) é um molécula composta por dois átomos estáveis de estrôncio (Sr^{+2}). A parte inativa do composto é uma molécula orgânica sintética, o ácido ranélico, (Figura 27) quimicamente apresentada como 5-(bis [carboximetil] amino)-2-carboxi-4-ciano-3- tiofenacético (RIZZOLI et al., 2012).

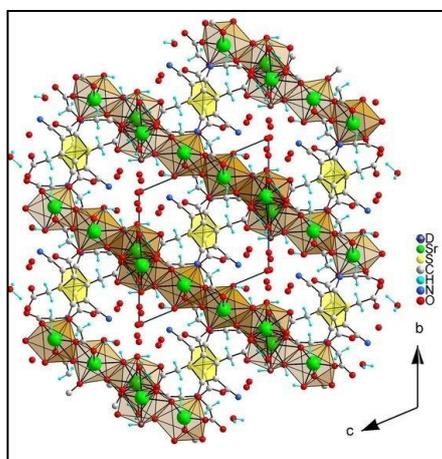
Figura 27 – Ranelato de estrôncio; S-sal; fórmula molecular: $C_{12}H_6N_2O_8SSr_2$; massa molecular: 513.48964g/mol e à direita, a estrutura espacial



Fonte: Pubchem, 2012b.

O íons simétricos Sr (1), e Sr (2) que correspondem à parte biologicamente ativa na molécula são complexados por 7 e 9 oxigênios, respectivamente, e 8 moléculas de água (Figura 28) na estrutura cristalina. (KORCZAK et al., 2008).

Figura 28 - Estrutura cristalina do ranelato de estrôncio



Fonte: Korczak et al., 2008.

O ácido ranélico, parte orgânica do fármaco, é farmacologicamente inativo, pois, devido à alta polaridade, apresenta baixa absorção, distribuição e ligação às proteínas plasmáticas, não sendo metabolizado no fígado e rapidamente é eliminado após a absorção. Este ácido permite a biodisponibilidade dos átomos de Sr. Esse íon também não é metabolizado no fígado e não inibe o sistema citocromo p.450 (BONNELYE et al., 2008; SOUZA, 2010).

O Sr é um metal alcalino terroso e o 15º elemento químico em abundância na

crosta terrestre. É um dos constituintes de apatitas naturais, sendo encontrado também no ar, na água e em certos alimentos (CABRERA et al., 1999). Na natureza esse metal é encontrado em sua forma impura, pois o íon (Sr^{+2}) reage rapidamente com água e oxigênio formando óxido de estrôncio. Na sua forma natural, não é radioativo e existe em quatro formas isotópicas estáveis: Sr^{84} (0,56%), Sr^{86} (9,86%), Sr^{87} (7,02%) e Sr^{88} (82,56%). Além disso, há vinte e dois isótopos radioativos conhecidos. Os mais importantes são Sr^{89} e Sr^{90} , os quais são formados durante operações de reatores e explosões nucleares (WHO, 2010). Os radioisótopos do Sr são excelentes ferramentas para estudos cinéticos com substituição do Ca em investigações cinéticas, porque os dois metais se comportam de forma similar no corpo humano (NIELSEN et al., 2004). Este metal é considerado um elemento-traço no corpo humano no plasma, no fluido extracelular, nos tecidos moles e duros.

O teor do elemento na dieta humana varia de acordo com a área geográfica e o tipo de alimento consumido. Uma dieta normal em média pode conter de 2 a 3 mgSr/dia, na grande maioria presente nos vegetais (CABRERA et al., 1999). A ingestão de quantidades elevadas de Sr na dieta pode induzir alterações ósseas, semelhante a lesões raquíticas em estudos experimentais com animais, especialmente se a ingestão de Ca é baixa. Isto parece ser causado pela absorção intestinal deficiente de Ca associada a uma produção renal reduzida de 1,25-dihidroxicolecalciferol. Demonstrou-se que a proteína de ligação ao Ca liga-se também ao Sr em menor grau, e que o Sr inibe no rim a enzima 1-hidroxilase e isso compromete a produção da 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ (MARIE, 2010).

A alta concentração de Ca na dieta, bem como a alta concentração de Sr na dieta em ratas prenhas reduziu o teor de proteína de ligação do cálcio no intestino materno e na placenta. Eventualmente, isso levaria a hipomineralização do esqueleto fetal. Os estudos em animais jovens sugerem que estes são mais sensíveis ao excesso de Sr do que animais mais velhos e que o consumo inadequado de Ca e de vitamina D aumentam os efeitos prejudiciais sobre o osso. Essa absorção intestinal do Sr é favorecida pela presença da vitamina D e inibida pelo cálcio. (NIELSEN et al., 2004; WHO, 2010).

As vias de transporte comuns para Ca e Sr já foram descritas para muitos órgãos nos quais o Sr compete com Ca na absorção intestinal e na reabsorção renal e assim por diante. Geralmente, o íon Sr^{+2} é fracamente absorvido no trato gastrointestinal e essa absorção intestinal diminui em ratos quanto maior a idade dos

animais, porém em seres humanos se desconhece essa correlação com a idade. A lactose e outros hidratos de carbono podem promover maior a absorção de Ca e Sr. Em estudos experimentais com animais, a maior parte do Sr é absorvido no jejuno, ou seja, 62% em dieta líquida e 88% em dieta sólida (NIELSEN et al., 2004).

O Sr^{+2} pode ser absorvido completamente por difusão passiva. Além da via gastrointestinal, a absorção do elemento pode também acontecer pela via pulmonar e tegumentar (WHO, 2010).

Uma absorção preferencial de Ca pode ser atribuída ao tamanho relativamente menor do átomo de Ca, quando comparado ao átomo de estrôncio. Enquanto íon Ca pode ser transportado da mucosa para a serosa contra um gradiente de concentração, isso parece não ocorrer com o íon Sr (NIELSEN et al., 2004). No entanto, em estudos com animais, verificou-se que o Sr pode ser transportado contra um gradiente de concentração, da serosa para a mucosa, mas talvez a absorção do Sr a partir do lúmen intestinal para o sangue seja inteiramente passiva. Entretanto, o transporte do íon no lúmen intestinal pode ser ativo, quando há níveis sanguíneos elevados de Sr, o que sugere algum tipo de regulação homeostática no sangue (NIELSEN et al., 2004).

No corpo humano, o plasma sanguíneo é o segundo local com maior concentração de Sr (CABRERA et al., 1999). Nos fluidos biológicos, o Sr e o Ca apresentam diversos graus de ligação a proteínas plasmáticas e séricas, porém, essa ligação é fraca (MARIE, 2003). Estima-se que a concentração desse elemento no sangue humano varia de 27 a 53 $\mu\text{g/L}$ (WHO, 2010), sendo em média de 30 $\mu\text{g/L}$ (NIELSEN et al., 2004). A biodisponibilidade do Sr administrado como 2,632 g de RnSr hidratado (2g de anidro) é de 27%. As concentrações plasmáticas máximas são alcançadas após 3 a 5 horas e atingem um ponto de equilíbrio em duas semanas. (MARIE, 2003).

O Sr, em alguns estudos farmacológicos com órgãos ou células isoladas, frequentemente, tem ações similares ao Ca, embora a resposta à estimulação seja mais fraca. Em concentrações não fisiológicas, esse íon Sr^{+2} pode atuar nos níveis de insulina e no PTH, na secreção de calcitonina (BROWN, 2003). Outro estudo em ratos comprovou que a administração de calcitonina ou glucagon reduziu simultaneamente as concentrações de Ca e Sr no soro (ESCANERO; CORDOVA, 1991). Ao contrário do Ca, o Sr não está sob controle homeostático no sentido em que o montante total no corpo e seu nível em fluidos biológicos, por exemplo, no

sangue é mantida estritamente constante por um mecanismo de regulação preciso. No entanto, isso não exclui a possibilidade de que os níveis de Sr possam ser influenciados pelo Ca e por hormônios (NIELSEN et al., 2004).

O íon Sr^{+2} após ser carregado por meio das proteínas similares as do cálcio por difusão, passa através das paredes dos capilares dos canais de Havers para alcançar o fluido extracelular do tecido ósseo. Portanto, após administrado, o Sr é quase exclusivamente depositado no osso, e após a incorporação nesse tecido, tanto o cálcio quanto o estrôncio atuam quase identicamente (NIELSEN et al., 2004).

A maior concentração deste elemento no corpo humano é encontrada nos ossos, onde é rapidamente transferindo para a superfície dos cristais (hidroxiapatita) em curto prazo. Em longo prazo, o Sr^{+2} permuta com o Ca^{+2} no mineral ósseo e permanece ligado ao esqueleto (BLAKE; FOGELMAN, 2005). A incorporação de Sr^{+2} nos ossos é diretamente relacionada à dose administrada, aos níveis plasmáticos, ao tempo de exposição e a remodelação óssea (DAHL et al., 2001).

Uma pequena fração do íon Sr^{+2} também parece estar depositada no osso recém-formado e substitui os átomos de cálcio na composição do cristal de HA, nas áreas em que há maior metabolismo, especialmente no osso esponjoso e em animais jovens, com efeito, dose-dependente (BONNELYE et al., 2008).

As concentrações exatas de Sr dentro do microambiente ósseo não são ainda plenamente conhecidas. No entanto, a quantidade de Sr no esqueleto é apenas de 0,035x da concentração de Ca (NIELSEN et al., 2004). Durante os tratamentos com o RanSr, foi observado que concentrações de estrôncio apresentadas nos ossos podem exceder substancialmente os níveis plasmáticos em aproximadamente 0,1 mmol (BROWN, 2003). Após a administração desse fármaco, o metal Sr tem meia vida no osso em torno de 10 semanas, e a parte não adsorvida à hidroxiapatita desse tecido é excretada por via renal (57%) e intestinal (SOUZA, 2010).

A interação do íon Sr^{+2} com o osso ocorre por meio de trocas iônicas com o cristal de HA, pela sua adsorção na superfície ou pela substituição de íons Ca^{+2} no interior da rede cristalina. Como o raio iônico do Sr^{+2} (1,13Å) é maior do que o do Ca^{+2} (0,99Å), isso também influenciará nessa substituição. Conseqüentemente, os íons Ca^{+2} serão preferidos em relação aos íons Sr^{+2} , portanto, a quantidade de substituições nos cristais de HA do tecido ósseo é relativamente baixa. No tratamento com o RanSr, a incorporação do Sr no cristal de apatita é feita pela troca de aproximadamente um íon Sr^{+2} a cada 10 íons Ca^{+2} , 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 (AMMANN et al., 2004; REGINSTER et al., 2005; ROSCHGER et al., 2010).

O RanSr estimula a replicação do pré-osteoblasto, com aumento do número de osteoblastos e de colágeno favorece a formação óssea. Por outro lado, este fármaco reduz a diferenciação e a atividade dos osteoclastos, com isso, inibe a reabsorção óssea. Os marcadores de formação óssea, fosfatase alcalina e pró-peptídeo C aumentam e os de reabsorção óssea C-telopeptídeo sérico e N-telopeptídeo urinário diminuem já no terceiro mês de uso do fármaco. Isso confirma sua dupla ação no tecido ósseo (ARLOT et al., 2008; FARLAY et al., 2005).

Em biópsias ósseas da crista ilíaca obtidas após 60 meses de tratamento com 2 g/dia de RanSr, em estudos de fase III, não se observaram efeitos nocivos na qualidade óssea ou na mineralização. Secundariamente aos efeitos farmacológicos do RanSr foram observadas ligeiras reduções do nível sérico do Ca e do hormônio da paratireoide (PTH), aumento das concentrações sanguíneas do fósforo e da atividade da fosfatase alcalina total (DOUBILIER et al., 2011).

O programa de estudos antifratura do RanSr foi constituído por dois estudos de fase III: *Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention* (SOTI) e o *Treatment Of Peripheral Osteoporosis* (TROPOS). O SOTI envolveu 1.649 mulheres caucasianas pós-menopáusicas com osteoporose estabelecida (com DMO lombar reduzida e fraturas vertebrais prévias) e com uma média de idade de 70 anos. O TROPOS envolveu 5.091 mulheres caucasianas pós-menopáusicas com osteoporose (DMO do colo do fêmur reduzida e fraturas prévias em mais de metade delas) e com uma idade média de 77 anos (REGINSTER et al., 2005). Estes dois grandes estudos comprovaram a eficácia do RanSr na prevenção de fraturas e, em três anos de avaliação, houve uma diminuição de 41% nas novas fraturas vertebrais e de 16% a 19% das fraturas não vertebrais.

A prevenção de 39% dos pacientes com alto risco de fratura de fêmur (mulheres com idade de 74 anos ou mais e densidade óssea mineral (DMO) no colo de fêmur com T score de -2.0) se tornou mais evidente após três anos de uso do fármaco. E um resultado semelhante foi evidenciado em um grupo de homens com osteoporose (REGINSTER et al., 2005).

Em longo prazo, após oito anos de tratamento o RanSr mostrou eficácia na prevenção de fraturas vertebrais, não vertebrais ou qualquer fratura osteoporótica,

semelhante àquela vista nos primeiros anos de tratamento com aumento progressivo da densidade óssea mineral (KAUFMAN et al., 2013; REGINSTER et al., 2009).

O Sr proveniente do RanSr atua na estimulação óssea com aumento do número, espessura e volume trabecular, sem prejudicar a qualidade óssea e a mineralização, por isso não deixa defeito no conteúdo mineral. Além da formação de osso endosteal, este fármaco estimula a produção de osso periosteal, o que melhora a macroarquitetura e a resistência do osso (ARLOT et al., 2008).

A preservação da arquitetura óssea e aumento da resistência mecânica óssea após 6 ou 12 meses de tratamento com RanSr foi demonstrada em estudos com biópsias ósseas por meio das técnicas de histomorfometria e microtomografia óssea (CHAVASSIEUX et al., 2011; REGINSTER et al., 2009). Em estudos mais recentes, com a tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução (HR-pQCT), foi observado que o RanSr foi mais eficaz na formação de osso novo cortical e trabecular do que o alendronato (RIZZOLI, 2010).

A administração de Sr em doses baixas (4 η mol/Kg.dia) reduz a perda óssea em modelos animais com osteopenia, porém, em doses acima desse valor podem prejudicar o metabolismo ósseo, e os efeitos prejudiciais do Sr na mineralização óssea podem ser devido à redução na absorção intestinal do Ca (WHO, 2010).

O RanSr administrado por via oral, com doses de 70, 210 e 630 mg/Kg, apresentou ação antiinflamatória e antireabsortiva em modelos de peritonite e edema de pata para avaliar periodontite em ratos (LIMA, 2010).

Entretanto, a Agência Europeia de Medicamentos observou que o uso de RanSr tem como efeito colateral, notificado em alguns pacientes, o tromboembolismo venoso (TEV), e seu uso deve ser evitado por pacientes imobilizados, temporariamente ou permanentemente. A reação alérgica grave ao RanSr, denominada de Síndrome DRESS (*Drug Rash With Eosinophilia and Systemic Symptoms*) é caracterizada por erupção cutânea de dermatite, eczema e sintomas sistêmicos (EMA, 2012). Como o estrôncio diminui a atividade da vitamina D3 hidroxilase, seu excesso pode levar o osso à osteomalácia (SOUZA, 2010).

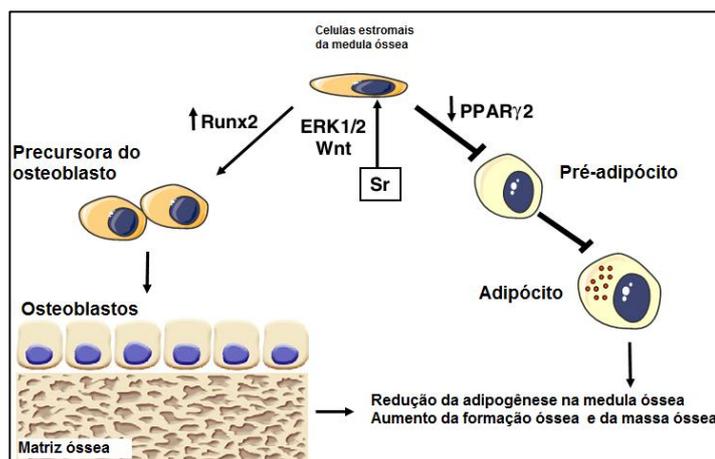
Ainda existe uma necessidade de informações sobre a relação entre o Sr e o metabolismo ósseo, bem como sobre a renovação do Sr nos ossos em diferentes fases da vida. Há uma relação entre as variações nos níveis sanguíneos deste metal e as alterações no metabolismo ósseo em populações não expostas ou tratadas (WHO, 2010). Estudos prévios *in vivo* já foram documentados com RanSr em

defeitos críticos (BARRETO, I., 2011; FIALLOS et al., 2012), com cloreto de estrôncio (FARIA et al., 2010) no entanto, não há dados na literatura para a associação entre uma hidroxiapatita não sinterizada HAAlg e RanSr para o reparo ósseo crítico

O mecanismo de ação do RanSr no tecido ósseo não está completamente elucidado, e é possível que existam cinco mecanismos com regulação extra e intracelular. Os estudos farmacológicos mostraram que o Sr ativa múltiplas vias de sinalização nas células ósseas para atingir a sua ação dual com a estimulação da osteogênese e inibição da osteoclastogênese.

No primeiro mecanismo o Sr altera a expressão genética da célula mesenquimal estromal (CME), (Figura 29) dos genes responsáveis pela adipogênese (PPAR γ 2, CEBP α e LPL) e, assim, há a inibição da diferenciação adipogênica (FOURNIER et al., 2012; LI et al., 2012; SAIDAK et al., 2012). Em ratos normais, ovariectomizadas, bem como nos ratos senescentes, os sais de Sr reduziram a expressão gênica da adipogênese na medula óssea e, concomitantemente, promoveram a diferenciação das CMEs em osteoblastos. Em ratos senescentes, esse efeito anti-adipogênico da administração de RanSr foi relacionada à ativação das vias de sinalização celular NFATc/Maf, ERK-MAPK e da via Wnt que resultou no aumento de massa óssea (SAIDAK et al., 2012).

Figura 29 – Ação farmacológica do RanSr na linhagem de células mesenquimais da medula óssea



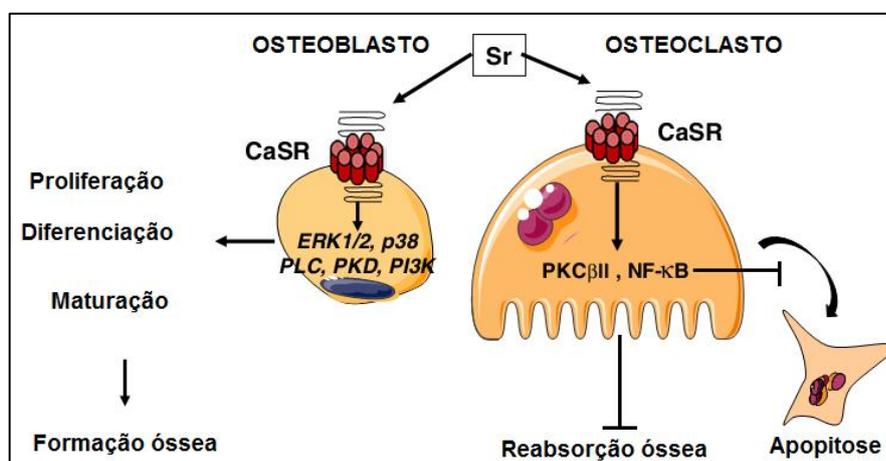
Fonte : Saidak, Marie, 2012.

O segundo mecanismo envolve alvos moleculares precisos do íon Sr em células ósseas e ainda está sendo investigado. Este íon é um cátion bivalente com estrutura semelhante ao Ca²⁺, que pode agir em receptores celulares sensíveis ao

Ca (CaSR) (Figura 30) ou na via NFATc (Figura 31), e isso induz efeitos importantes para as células ósseas, com a sinalização de RANK/RANKL/OPG e de sistema de sinalização do FGF/FGF receptor. Esse receptor CaSR pertence à família dos receptores acoplados à proteína G, possui sete hélices transmembrana, um terminal extracelular N e um intracelular C (BROWN; MACLEOD, 2001). A sua ativação extracelular pelo Sr desencadeia de eventos intracelulares que direcionam os eventos de diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, proliferação e maturação destas células e apoptose de osteoclastos (SAIDAK; MARIE, 2012).

O receptor CaSR está presente em osteoclastos e a ativação do CaSR inibe a diferenciação de osteoclastos e induz a sua apoptose (MENTAVERRI et al., 2006). O CaSR está também presente em osteoblastos que, quando ativados, aumentam a proliferação destas células e, conseqüentemente, promovem o aumento da formação óssea e da mineralização (CHANG et al., 2008). Desse modo, o RanSr aumenta a replicação de células pré-osteoblásticas e a atividade de osteoblastos funcionais, com aumento na síntese da matriz osteoide (BRENNAN et al., 2009).

Figura 30 – Ação farmacológica do íon Sr no receptor de cálcio ativando as vias de sinalização em osteoblasto e em osteoclasto



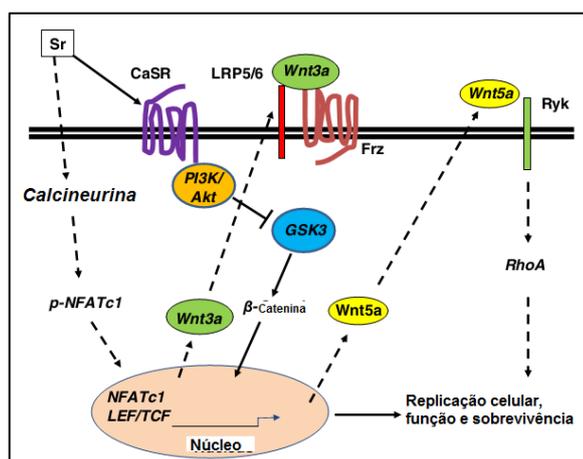
Fonte: Saidak, Marie, 2012.

Este receptor CaSR é fisiologicamente expresso em altos níveis nas células principais da paratireoide e essas células detectam as alterações de níveis Ca extracelular, sendo que isto atua como um estímulo para a liberação de PTH (BROWN; MACLEOD, 2001). Em altas concentrações séricas de Ca^{2+} , há ativação do CaSR, que conduz a uma inibição da liberação de PTH, da expressão da proliferação, da expressão genética de células da paratireoide (BROWN et al., 1999).

A diminuição da concentração de Ca^{2+} promove uma menor ativação CaSR, e, com isso, remove a inibição da liberação de PTH. Os níveis aumentados de PTH normalizam os níveis de Ca no soro por meio de suas ações sobre os rins, ossos e, indiretamente, no intestino (BROWN et al., 1999).

O terceiro mecanismo envolve as interações do Sr na via de sinalização intracelular Wnt em osteoblastos com promoção da osteoblastogênese. A via de sinalização Wnt desempenha um papel particularmente importante na formação óssea. Essas interações entre o Sr e as via de sinalização do Wnt resultam, além da maior expressão genética de replicação osteoblástica, na sobrevivência celular (Figura 31).

Figura 31 – Interação do Sr nas vias de sinalização biológica do Wnt na osteoblastogênese



Fonte: Saidak, Marie, 2012.

As proteínas Wnt se ligam a um complexo formado por um receptor acoplado à proteína G e pelo correceptor 5/6 da lipoproteína de baixa densidade (LRP5/6). A ativação da via Wnt induz uma cascata de eventos intracelulares que estabilizam a β -catenina que, dessa forma, é transferida para o núcleo em que se liga a fatores de transcrição e modula a expressão de genes que promovem a diferenciação, ativação e recrutamento dos osteoblastos. O aumento de Ca intracelular ativa a calcineurina que fosforila o fator de transcrição nuclear ativado por células T (NFATc1) e este, quando fosforilado, liga-se ao promotor de genes alvo - isso resulta em replicação celular. Esse efeito também induz a expressão de Wnt3a, que ativa a transcrição e a translocação nuclear de β -catenina - isso induz a expressão da molécula Wnt5a que ativa a via de sinalização Ryk/RhoA. Por outro lado, Sr ativa a via de sinalização

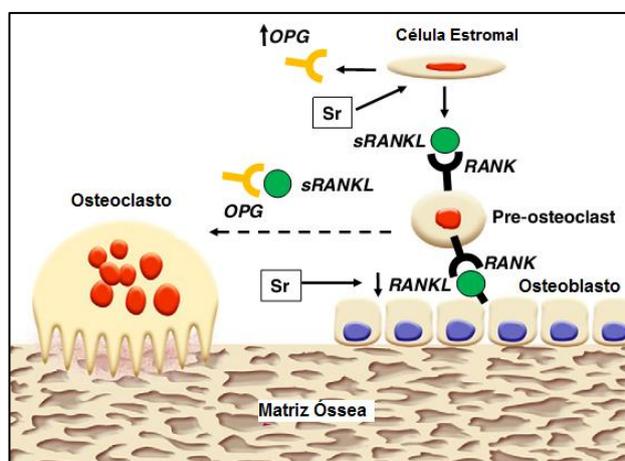
CaSR/PI3K/Akt que resulta na inibição da quinase GSK3 e de β -catenina (SAIDAK; MARIE, 2012).

Notavelmente, a ativação do CaSR em osteoclastos ou osteoblastos leva à ativação de fosfolipase C β , inositol 1,4,5-trifosfato, com liberação de Ca⁺² intracelular e ativação de sinalizadores MAPK ERK1/2 e Wnt/NFATc. O Sr media a ativação desses percursos e isso resulta na modulação de moléculas essenciais como RANKL e OPG que controlam a reabsorção óssea, e a regulação de genes que promovem a replicação celular osteoblástica, diferenciação e sobrevivência celular (MARIE et al., 2001; MARIE, 2006; SAIDAK; MARIE, 2012).

No quarto mecanismo, o Sr⁺² pode agir na osteoblastogênese e na formação óssea, também por meio da indução da expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2) (CHOUDHARY et al., 2007) e produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) com ativação extracelular mediada por quinases (MARIE, 2006).

Por fim, no quinto mecanismo o Sr interfere na osteoclastogênese, na diferenciação dos osteoclastos (Figura 32), diretamente no RANKL que se liga ao RANK expresso em células precursoras de osteoclastos e, por conseguinte, promove a sinalização que conduz a um aumento na diferenciação dos osteoclastos. Desse modo, o Sr reduz a expressão de RANKL e aumenta a expressão de osteoprotegerina (OPG) por osteoblastos/células estromais que resulta em menor diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos.

Figura 32 - Ação do estrôncio no sistema RANK/RANKL/OPG com redução da osteoclastogênese



Fonte: Marie, 2008; Saidak, Marie, 2012.

Em estudo *in vitro*, o RanSr reduziu a adesão dos osteoclastos aos ossos ao

interromper a zona de selagem contendo actina (BONNELYE et al., 2008). O Sr diminuiu a diferenciação de osteoclastos por meio da modulação da via de sinalização de NFkB (CAUDRILLIER et al., 2010), bem como o número e a atividade de osteoclastos cultivados (BONNELYE et al., 2008). Além disso, com níveis mais elevados na dosagem do RanSr, houve aumento da apoptose em osteoclastos por meio da via da proteína quinase PKC β II (HURTEL-LEMAIRE et al., 2009). Nas doses elevadas de RanSr, o Sr é adsorvido na superfície óssea, sendo eficaz na inibição da atividade, diferenciação, e no tempo de vida dos osteoclastos com redução da reabsorção óssea (DAHL et al., 2001).

Com estes mecanismos, o Sr proveniente do RanSr é capaz de aumentar a proliferação celular em pré-osteoblastos, a diferenciação e a maturação de osteoblastos, observado pelo aumento da fosfatase alcalina, um marcador de diferenciação de osteoblastos, e pela síntese de colágeno tipo I, um marcador da função dos osteoblastos. Além disso, com a ativação dessas vias dependentes de cálcio, torna-se possível a mineralização da matriz osteoide. Em paralelo, ocorre também a inibição da diferenciação e da atividade dos osteoclastos, com aumento da apoptose, mediada por um aumento da OPG e redução da RANKL e por mecanismos regulados por CaSR (MARIE et al., 2001; MARIE, 2006).

Outro efeito de Sr é também o de aumentar a expressão de outros marcadores, tais como sialoproteína óssea (BSP) e osteocalcina (OCN) que resultam no aumento da osteogênese *in vitro* (BONNELYE et al., 2008; CHOUDHARY et al., 2007; ZHU et al., 2007) e favorece a mineralização óssea (MARIE, 2010).

A partir de estudos em animais observou-se que é possível substituir o Sr pelo Ca em diversos processos fisiológicos que incluem, por exemplo, a contração muscular, a coagulação do sangue, e o reparo ósseo. Estes processos são promovidos tanto pelo Ca quanto pelo Sr, sendo neste último, em menor grau. O íon Ca é carregado mais facilmente do que o íon Sr, quando há a necessidade de um transportador nas membranas biológicas, ou seja, na absorção gastrointestinal, excreção renal, lactação e passagem pela placenta (LI et al., 2009; NIELSEN et al., 2004).

Devido à sua lenta absorção, deve-se evitar a ingestão de cálcio antes e durante a administração do estrôncio (LI et al., 2009).

A depuração renal do íon Sr, principal via de excreção, é cerca de três vezes

maior do que a do íon Ca, talvez devido à menor reabsorção tubular, provavelmente também, devido ao maior raio atômico do Sr, quando comparado ao Ca. Em concentrações até 10 mM, o Sr inibe células renais dos túbulos proximais PTH-dependente (NIELSEN et al., 2004).



3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o comportamento biológico *in vivo* de materiais biomiméticos, com ou sem a administração enteral de ranelato de estrôncio no reparo ósseo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Avaliar, por análises histomorfológicas, o efeito local do reparo tecidual e o potencial osteogênico após a implantação em defeito ósseo crítico dos seguintes biomateriais poliméricos:

- grânulos de gelatina
- pó de colágeno hidrolisado;

B) Avaliar, por análises histomorfológicas, o efeito local do reparo tecidual e do potencial osteogênico do compósito formado por microesferas de hidroxiapatita e alginato (componente inorgânico + polímero orgânico) implantadas em defeito ósseo crítico;

C) Analisar o efeito sistêmico e o potencial osteogênico do ranelato de estrôncio administrado por via enteral em associação com a implantação local das microesferas de hidroxiapatita e alginato no reparo ósseo;

D) Analisar o efeito da concentração plasmática de cálcio e estrôncio no reparo ósseo após a administração enteral do ranelato de estrôncio associado com a implantação local das microesferas de hidroxiapatita e alginato.



Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 BIOMATERIAIS

As amostras de gelatina, colágeno hidrolisado e as microesferas de hidroxiapatita foram caracterizadas pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), Rio de Janeiro – RJ sob coordenação do Prof. Dr. Alexandre Malta Rossi.

4.1.1 Gelatina

Os grânulos secos de gelatina comestível¹, obtidos de pele bovina, têm tamanhos² de 600 µm. Este material antes de ser comercializado recebe um tratamento térmico pelo processo de ultrapasteurização UHT (*ultra high temperature*) que consiste basicamente no tratamento do produto a uma temperatura de 130° a 150°C durante 2 a 4 segundos e envasado sob condições assépticas. As análises físico-químicas e microbiológicas desse material constam no anexo A. As porções de gelatina de 0,12 g foram previamente fracionadas (Figura 33) em criotubos rosqueáveis³ de 2 mL, em câmara de fluxo laminar.

Figura 33 - Gelatina **(A)** Fracionada em criotubos rosqueáveis de 1,5mL; **(B)** Grânulos de gelatina



Fonte : Elaboração do autor.

- Microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raios-X por espectroscopia de energia dispersiva (MEV-EDS)

¹ 225H30 - Rousselot®, Amparo – SP, Brasil

² Corresponde ao mesh 30, segundo o fabricante.

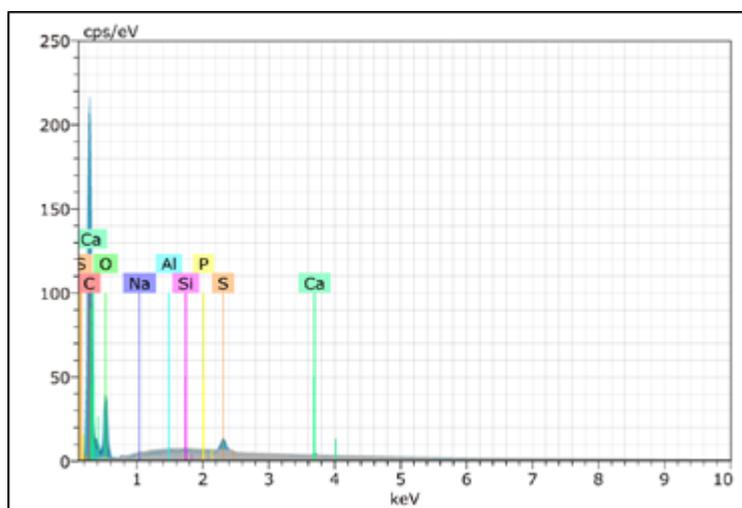
³ Techno Plastic Products AG, Suíça

As análises de MEV – EDS foram realizadas no laboratório de microscopia eletrônica do Instituto Militar de Engenharia – IME (Figuras 34 e 35 e Gráfico 1)

As amostras do biomaterial foram previamente diluídas em acetona, dispersas em uma fita condutora e revestidas por uma fina camada de ouro, durante dois ciclos de 30 segundos, em evaporadora⁴, a fim de aumentar sua condutividade e proteger contra o aquecimento localizado. Em seguida, a amostra revestida foi introduzida no MEV⁵ e interagiu com elétrons secundários, em alto vácuo, sob uma tensão de aceleração de 30 kV. Os espectros de energia dispersiva de raios-X (EDS) também foram adquiridos, para confirmar a composição do biomaterial.

No gráfico 1 observou-se os elementos Ca, Na, Al, Si, P e S que foram encontrados em baixa concentração na gelatina, sendo possivelmente provenientes do processo de extração e fabricação da gelatina. No colágeno natural estão presentes os elementos N, O, H e C. Os elementos Ca, P e O são importantes, pois também estão presentes no tecido ósseo.

Gráfico 1 – Espectro obtido por EDS do grânulo de gelatina



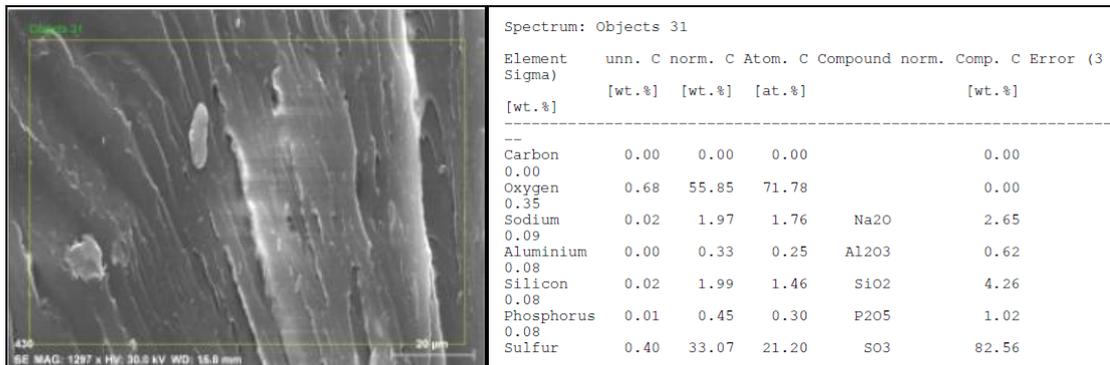
Fonte: CBPF

A figura 34 obtida representa a topografia de uma área na superfície do grânulo de gelatina. Esta superfície é irregular com disposição paralela das camadas do material. Nesta figura de acordo com a área selecionada observou-se o espectro dos elementos químicos listados abaixo.

⁴ Balzers FL-9496

⁵ Quanta FEG 250, marca FEI

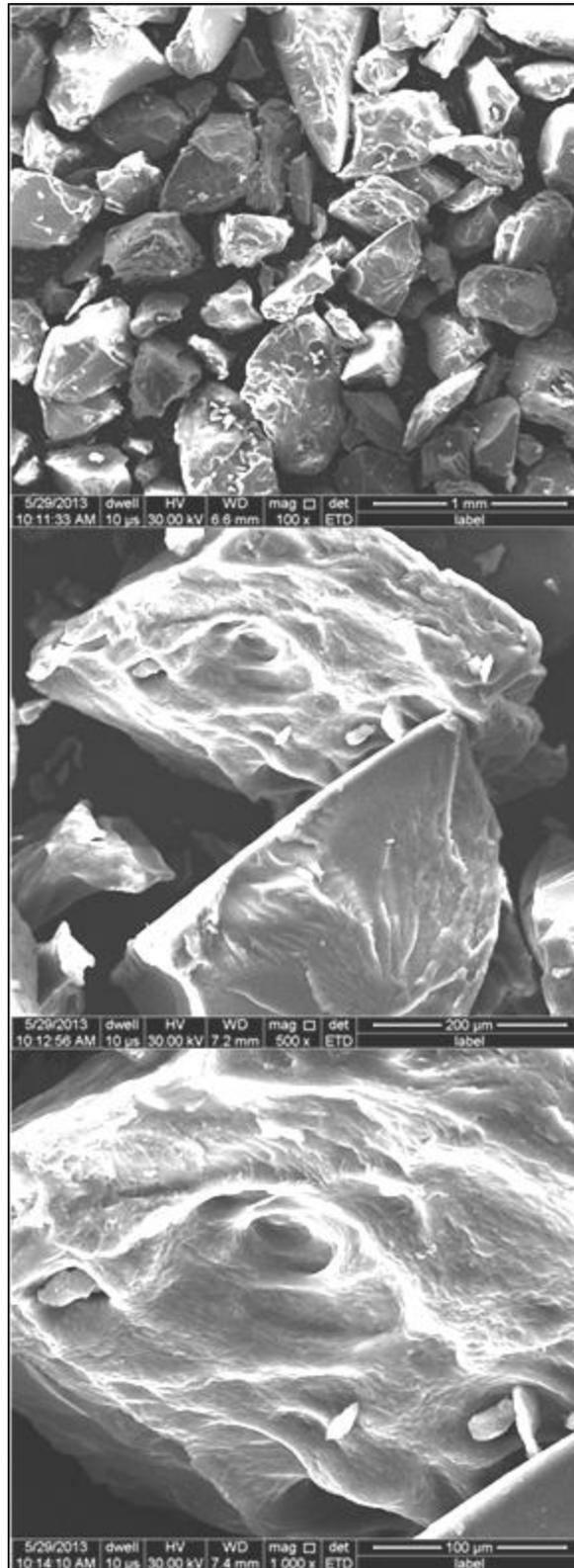
Figura 34 - Micrografia do grânulo de gelatina. Tamanho da imagem; 512 x 384; magnificação; 296.84x, 30kV, Barra 20 µm. Região selecionada para análise do EDS em amarelo



Fonte: CBPF

Na figura 35 observam-se grânulos em tamanhos homogêneos, com magnificação de 100x e em maiores magnificações de 500x e 1000x observa-se uma estrutura com poucos poros. Os grânulos são irregulares e o aspecto das superfícies sugere uma estrutura amorfa devido as fraturas conchoidais.

Figura 35 – Micrografia dos grânulos de gelatina obtidas por mEV –EDS. Topografia de superfície para a magnificação de 100x, 500x, 1000x

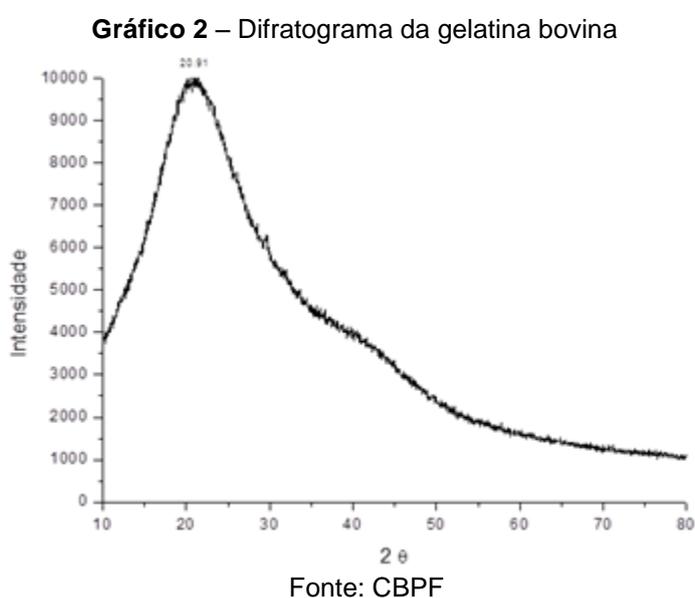


Fonte: CBPF

- Difração de raios-X (DRX)

Utilizou-se o difratômetro de pó⁶ com radiação de CuK α ($\lambda = 1,5418\text{\AA}$) e varredura angular de $10 - 80^\circ(2\theta)$, com passo de $0,05/s$, tempo 160 de segundos. Análise do pó de gelatina bovina, que foi peneirado e apresentou faixa granulométrica $<74\ \mu\text{m}$.

O difratograma do gráfico 2 é característico de um material amorfo, com pico largo e de alta intensidade.



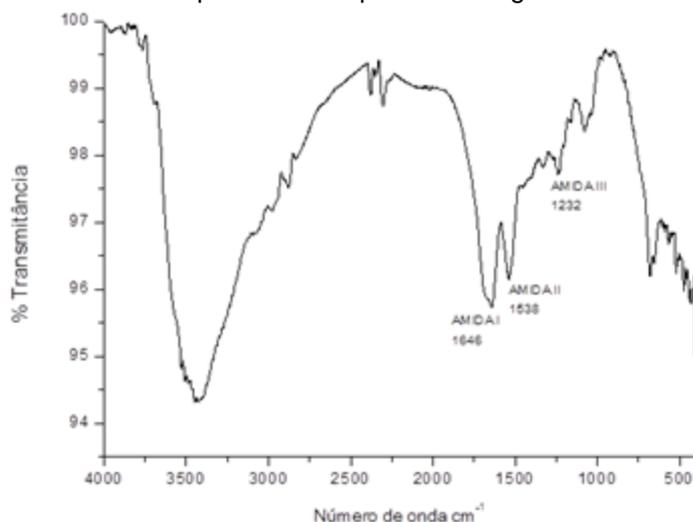
- Infra-vermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Utilizou-se o espectrofotômetro por transformada de Fourier⁷ com separador de feixes de KBr. A análise foi feita por transmitância a 1% de KBr na região mediana do infravermelho ($400 - 4000\ \text{cm}^{-1}$). Analisou-se o pó de gelatina bovina, moído e peneirado com faixa granulométrica $<74\ \mu\text{m}$.

O gráfico 3 indica a presença dos grupos funcionais do colágeno. O espectro de FTIR indicado nesse gráfico é constituído por bandas vibracionais dos grupos amidas. As bandas observadas em 1646 , 1538 e $1232\ \text{cm}^{-1}$ são típicas das amidas I, II e III, respectivamente conforme descrito por alguns autores (ALMEIDA et al., 2012; LIU; LEY; YANG, 2012).

⁶ Zeiss HZG4

⁷ IR-Prestige 21, Shimadzu

Gráfico 3 – Espectro obtido por FTIR da gelatina bovina

Fonte: CBPF

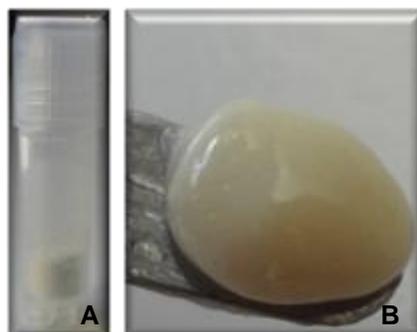
4.1.2 Colágeno hidrolisado

O pó de colágeno hidrolisado⁸ comestível apresentou granulometria de aproximadamente 75 μm . Esse colágeno hidrolisado é uma proteína modificada enzimaticamente com cadeias peptídicas menores (peso molecular médio de 5000 Da) do que as moléculas da gelatina. Esse colágeno não possui capacidade de formar gel, apresenta baixa viscosidade e é solúvel à temperatura ambiente. Este produto antes de ser comercializado também passa pelo processo UHT, conforme já descrito anteriormente semelhante à gelatina. As análises físico-químicas e microbiológicas deste material constam no anexo B.

As porções desse material foram previamente fracionadas em câmara de fluxo laminar contendo 0,5 mL do pó em criotubos rosqueáveis de 2 mL. Ao pó misturaram-se duas gotas de soro fisiológico à temperatura ambiente até obter uma pasta homogênea (Figura 36), sendo em seguida, implantada no defeito.

⁸ Peptan B[®]

Figura 36 – Colágeno hidrolisado (CH): **(A)** Colágeno hidrolisado em pó fracionado em criotubos rosqueáveis de 1,5mL; **(B)** Pasta obtida

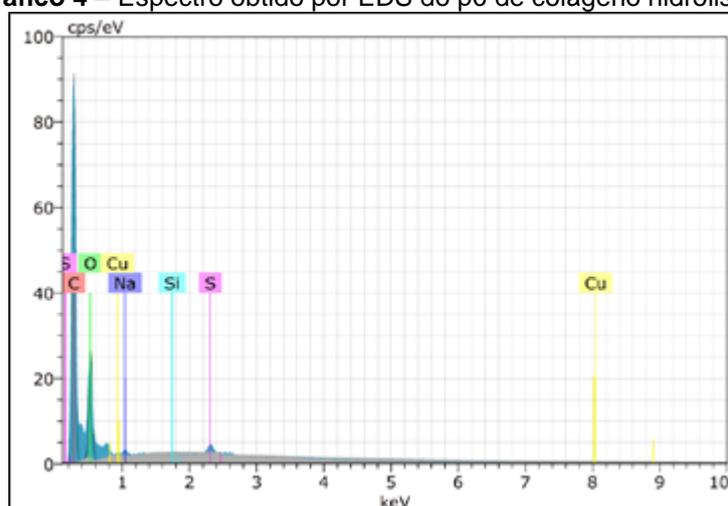


Fonte: Elaboração do autor.

- Microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raios-X por espectroscopia de energia dispersiva (MEV-EDS)

As análises do colágeno hidrolisado seguem o mesmo protocolo descrito para a gelatina. No gráfico 4, além dos elementos encontrados na gelatina, observou-se a presença de Cu; possivelmente estes elementos são provenientes do processo de fabricação do colágeno hidrolisado.

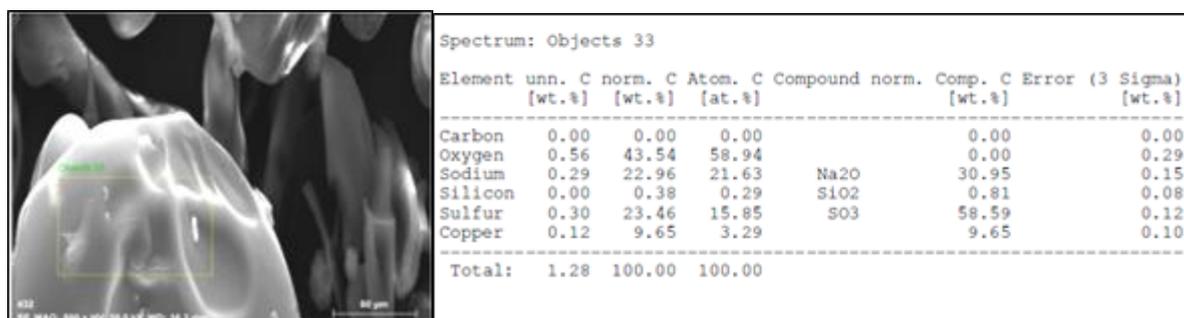
Gráfico 4 – Espectro obtido por EDS do pó de colágeno hidrolisado



Fonte: CBPF

A figura 37, com magnificação de 500x, representa a topografia de uma área na superfície do grânulo de colágeno hidrolisado para a análise por EDS no qual observamos uma superfície lisa, com depressões e contornos irregulares. Nesta figura, de acordo com a área selecionada, observou-se o espectro dos elementos químicos listados abaixo.

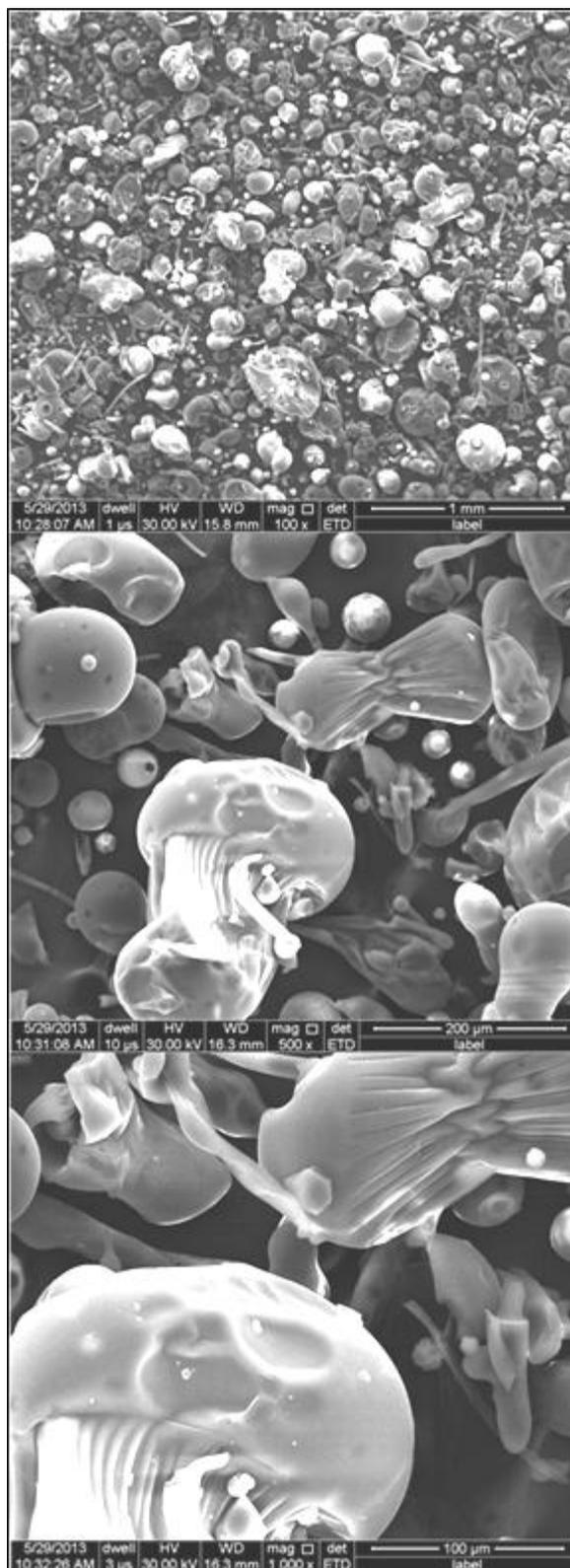
Figura 37 - Micrografia do pó de colágeno hidrolisado por MEV-EDS. Tamanho da imagem 512x384; magnificação: 500x, 30 kV e análise química do material. Região selecionada para análise do EDS em amarelo



Fonte: CBPF

Na figura 38, observou-se por MEV com magnificação de 100x partículas com formatos esferoides, irregulares e com tamanhos heterogêneos. Na topografia de superfície, com a magnificação de 1000x, observa-se ausência de poros e estruturas com aspecto de partículas amorfas.

Figura 38 – Micrografia do pó de colágeno hidrolisado por MEV-EDS. Topografia de superfície para a magnificação de 100x, 500x, 1000x

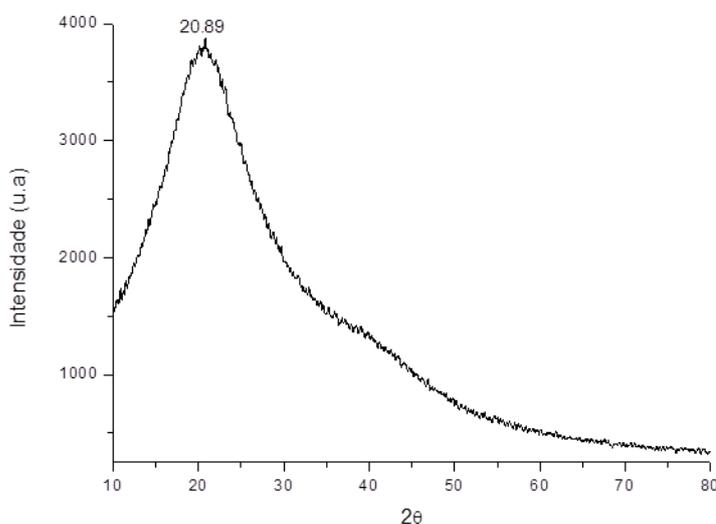


Fonte: CBPF

- Difração de raios-X (DRX)

A metodologia para esta análise é semelhante a já descrita anteriormente para a gelatina bovina. O pó de colágeno bovino apresenta faixa granulométrica <74 μm . O difratograma do gráfico 5 representa um material amorfo, com pico largo e de alta intensidade característico do colágeno, em concordância com as micrografias.

Gráfico 5 – Difratograma do colágeno bovino hidrolisado

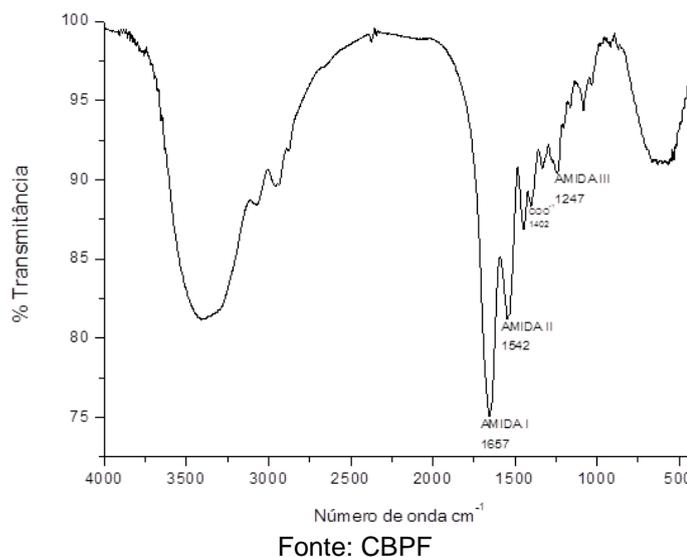


Fonte: CBPF

- Infra-Vermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Utilizou-se o mesmo equipamento e metodologia já descritos anteriormente. A análise do pó seco de colágeno bovino hidrolisado, com faixa granulométrica <74 μm .

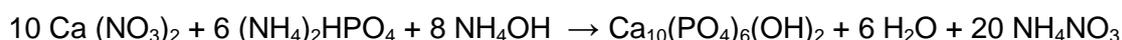
O espectro de FTIR mostrado no gráfico 6 é constituído por bandas vibracionais dos grupos amidas, que são grupos funcionais do colágeno. As bandas observadas em 1657, 1542 e 1247 cm^{-1} são típicas das amidas I, II e III, respectivamente (ALMEIDA et al., 2012; LIU; LEY; YANG, 2012).

Gráfico 6 – Espectro obtido por FTIR do colágeno bovino hidrolisado

4.1.3 Hidroxiapatita e alginato

As microesferas de hidroxiapatita nanoestruturadas HAAIg, não calcinadas e não sinterizadas, foram preparadas, caracterizadas e fornecidas pelo CBPF com 2,5% de alginato.

As amostras de hidroxiapatita estequiométrica (HA controle) foram sintetizadas pelo método de precipitação por via úmida com razão molar dos íons $[Ca]^{+2}/[PO_4]^{-3} = 1,67$ em condições reacionais apropriadas à formação de um material com uma única fase cristalina ilustrada pela reação:



O pH de 11 foi mantido por adição de NH_4OH .

A solução de nitrato de cálcio 0,2 M⁹ foi inicialmente colocada dentro do reator balão onde foi realizada a reação de precipitação sob agitação e temperatura de 90°C, sendo então adicionada à solução de diâmoniohidrogeno fosfato 1,2 M¹⁰ com auxílio de uma bomba peristáltica. A mistura permaneceu sob agitação, sob a mesma temperatura, por mais duas horas, para a maturação do precipitado formado, sendo em seguida filtrada em funil de Buckner e lavada por resuspensão com água

⁹ Merck®

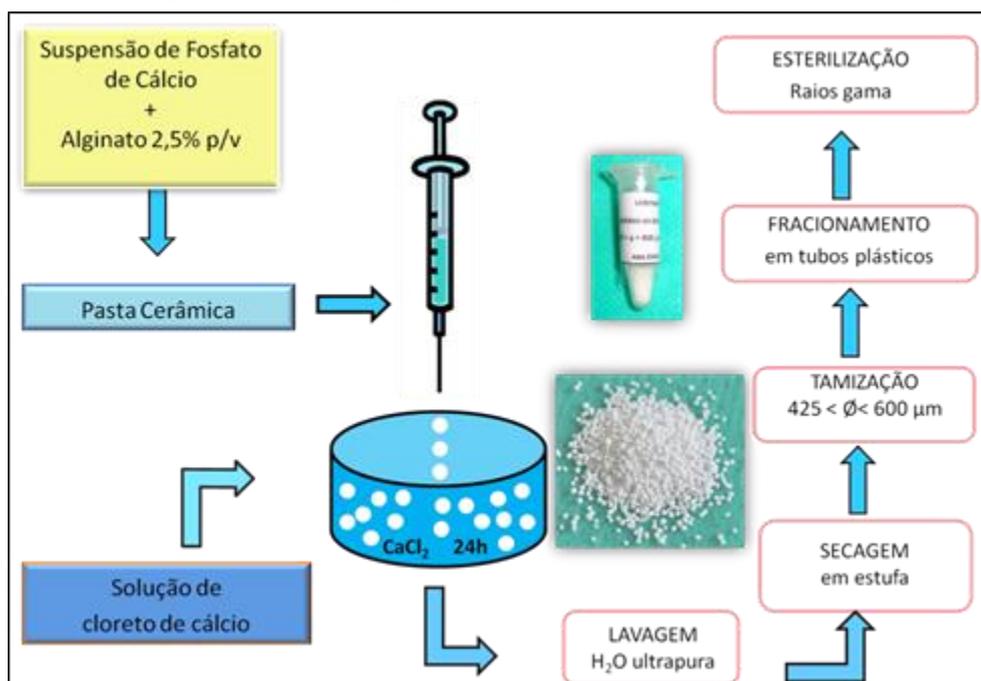
¹⁰ Merck®

ultra pura, deionizada¹¹ a 90°C até se obter pH=7,0 na água de lavagem.

O material obtido foi seco por liofilização com temperatura de 100°C durante 24 horas. Sendo em seguida feita a separação granulométrica, com o uso de peneira de abertura 74 µm.

As microesferas de HAAIlg foram obtidas a partir da mistura de hidroxiapatita em pó (faixa <74 µm) com uma solução de 2,5% de alginato de sódio¹². Após a mistura, uma emulsão foi formada, e a extrusão foi feita com auxílio de uma seringa e agulha em uma solução de CaCl₂ (0,15 M)¹³. Após 24 horas, as esferas foram lavadas em água ultrapura, deionizadas e secas em estufa a 60°C. As esferas secas foram separadas e peneiradas, com peneiras na faixa de 425 < Ø < 600 µm (Figura 39).

Figura 39 – Preparação das microesferas nanoestruturadas



Fonte : Elaboração do autor.

As alíquotas com 0,12 g dessas microesferas foram acondicionadas em tubos plásticos¹⁴ (Figura 36), sendo esterilizadas por raios gama no IME com dose de 15 kGy durante 10 horas.

¹¹ Mili Q®

¹² Fluka®

¹³ Merck®

¹⁴ Eppendorff®

Figura 40 – Microesferas de hidroxiapatita e alginato



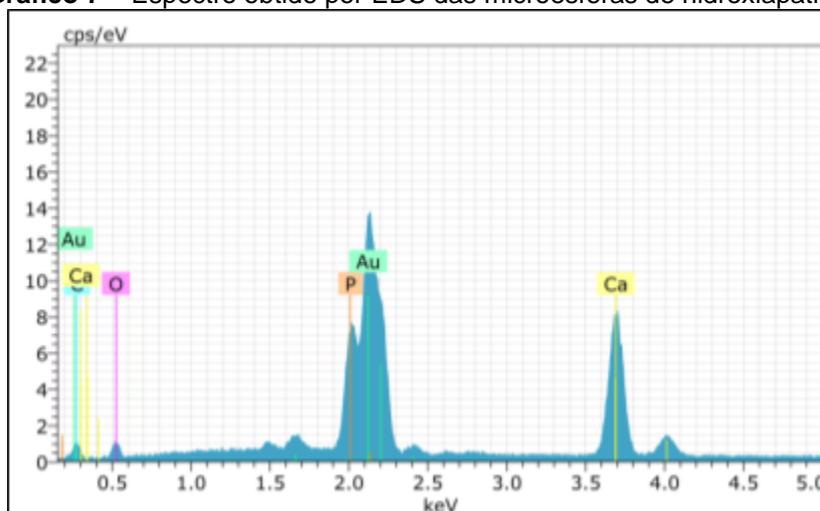
Fonte : Elaboração do autor.

- Microscopia eletrônica de varredura com microanálise de raios-X por espectroscopia de energia dispersiva (MEV-EDS)

As análises seguem o mesmo protocolo já descrito anteriormente, no entanto, a tensão de aceleração foi de 20 kV de forma a limitar os danos à estrutura da HA. Os espectros de energia dispersiva de raios-X (EDS) também foram adquiridos para confirmar a composição das microesferas de hidroxiapatita.

O gráfico 7 e a figura 41 confirmam a presença dos elementos químicos oriundos da composição dos reagentes utilizados na síntese, tais como o cálcio e o fósforo. O elemento oxigênio também foi observado que confirma a presença do alginato na forma de carbonato conforme a análise de FTIR (Gráfico 9). Igualmente, é possível identificar o elemento ouro, visto que este foi o material de recobrimento das amostras.

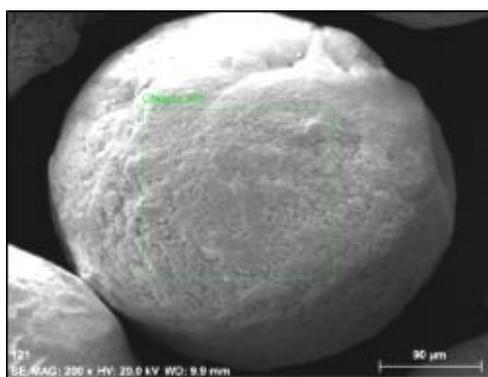
Gráfico 7 – Espectro obtido por EDS das microesferas de hidroxiapatitas



Fonte: CBPF

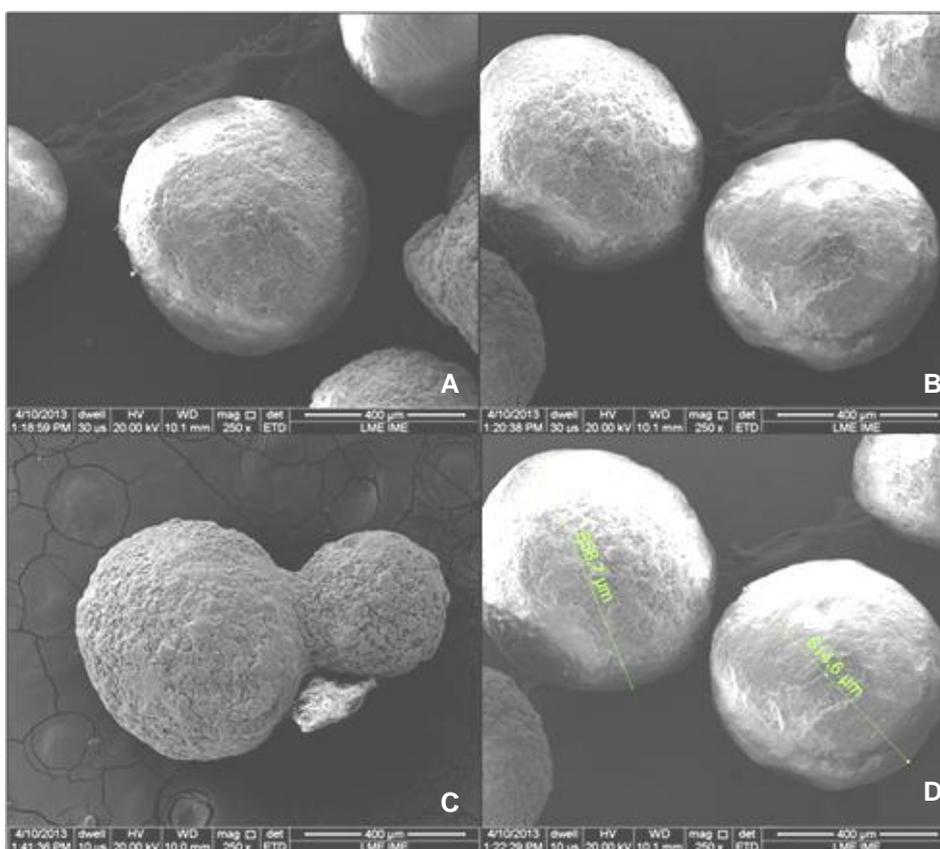
A superfície rugosa decorrente da aglomeração de partículas finas observada na MEV (Figuras 41 e 42) favorece o aumento da área. A morfologia dos precipitados, nesta etapa, apresenta aspecto mais globular, forma característica da apatita biológica. Nesta figura 41, de acordo com a área selecionada, observou-se o espectro dos elementos químicos listados abaixo.

Figura 41 – Micrografia de microsferas de hidroxiapatita por MEV-EDS com magnificação de 200x, com 20kv. Região selecionada para análise do EDS em verde



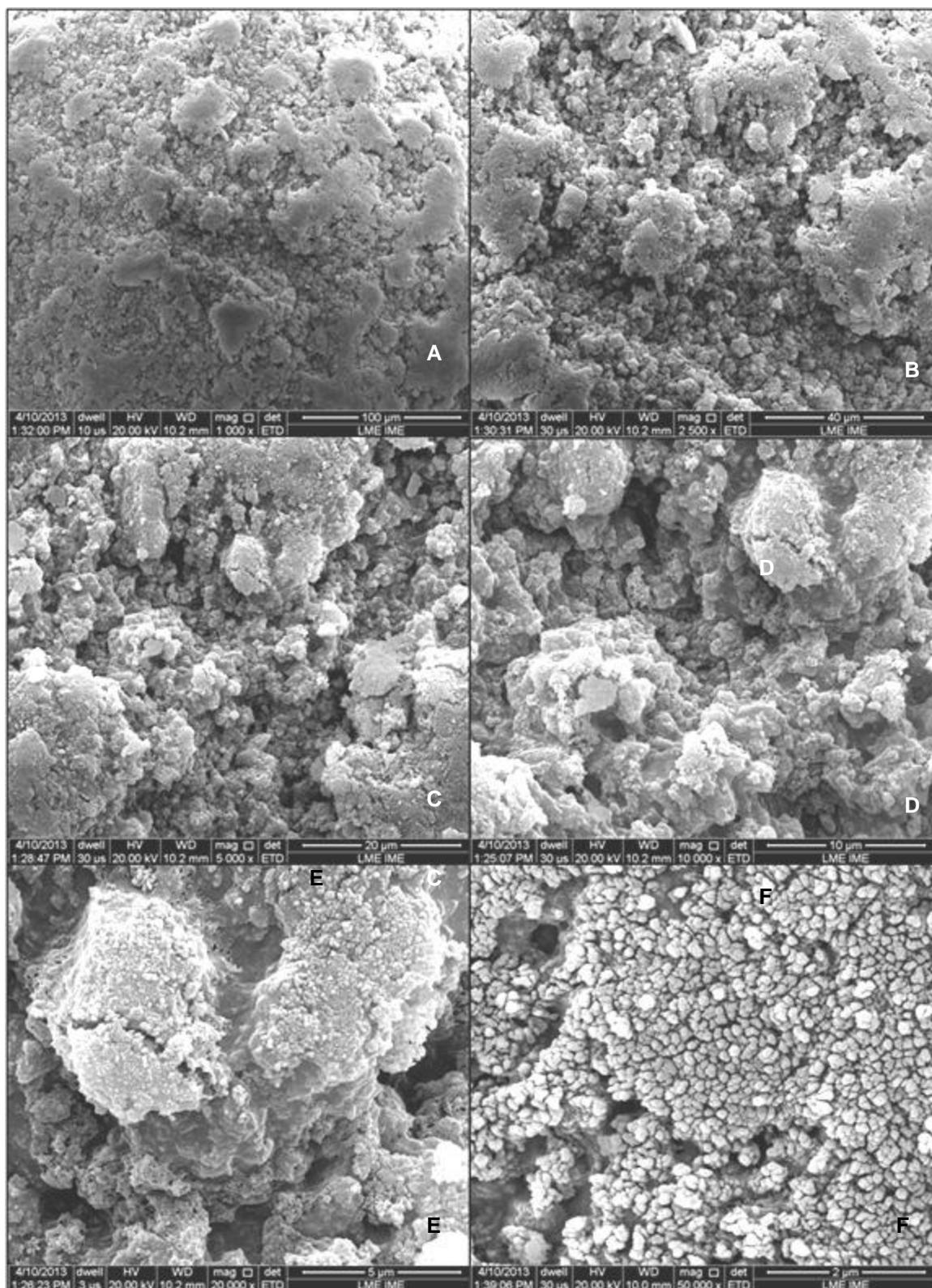
Fonte: CBPF

Figura 42 – Micrografia de microsferas de hidroxiapatita por MEV. Topografia de superfície e a microporosidade para a magnificação de 250x em A, B C e D.



Fonte: CBPF

Figura 43 – Micrografia de microesferas de hidroxiapatita por MEV. Topografia de superfície e a microporosidade para a magnificação de 1000x em A, de 2500x em B, de 5000x em C, de 10000x em D, 20000x em E e de 50000x em F. Nestas magnificações é possível observar que a superfície das microesferas apresenta-se bastante irregular formada por um aglomerado de partículas menores. Em F é possível identificar os cristais de HA.



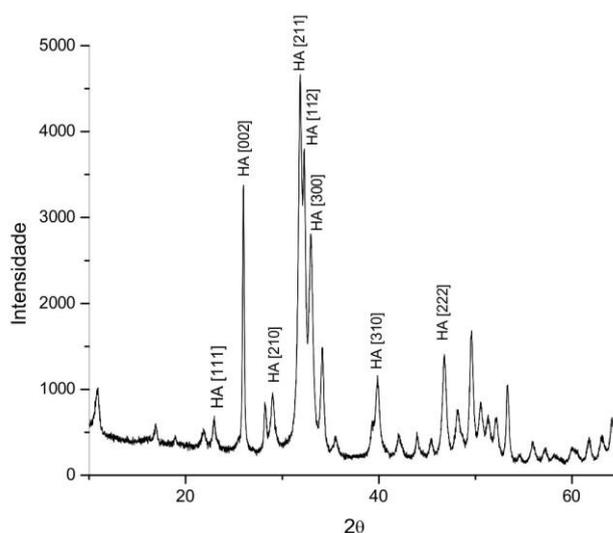
Fonte: CBPF

- Difração de raios-X (DRX)

A análise do pó de HAAIlg com 2,5% de alginato e de faixa granulométrica <74 μm seguiu o mesmo protocolo já detalhado anteriormente.

O difratograma abaixo é característico de uma HA estequiométrica padrão $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, Ca/P igual a 1,67] com os principais picos de acordo com a ficha padrão PCPDFWIN 09.0432 (JCPDS) – Internacional Centre for Diffraction Data. É possível observar pelo eixo “y” que a amostra tem picos estreitos e de alta intensidade característico de amostras com alta cristalinidade.

Gráfico 8 – Difratograma da HAAIlg



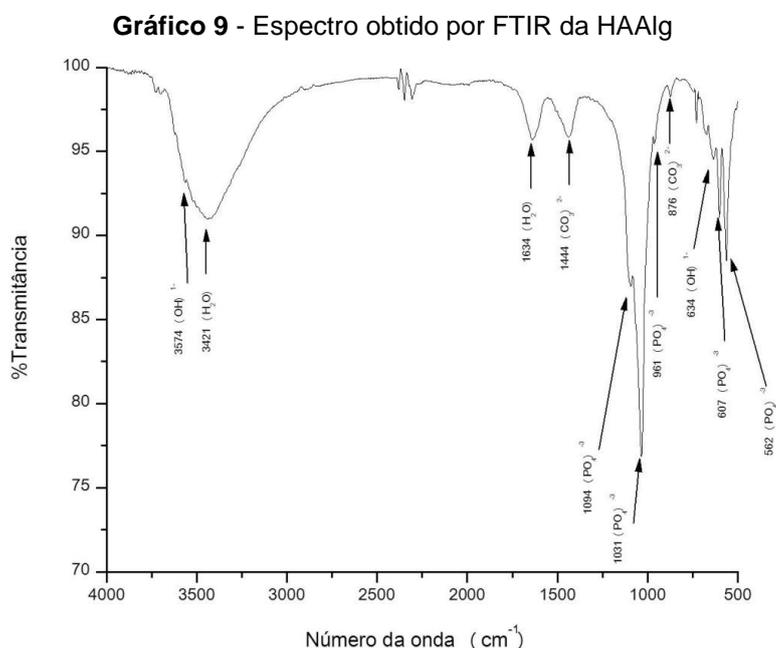
Fonte: CBPF

- Infra-Vermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Utilizou-se o mesmo equipamento e metodologia já descritos anteriormente para a gelatina. A análise do pó de HAAIlg com 2,5% de alginato e de faixa granulométrica <74 μm . A tabela FTIR de referência corresponde ao Anexo C.

O gráfico 9 indica os grupos funcionais de uma HA $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ padrão. O espectro de FTIR é constituído por bandas vibracionais dos grupos fosfatos da hidroxiapatita em 1094 cm^{-1} , 1031 cm^{-1} , 961 cm^{-1} , 607 cm^{-1} , 562 cm^{-1} . As bandas observadas em 1444 , e 876 cm^{-1} são típicas de íons carbonato na estrutura da hidroxiapatita, o que confirma a presença do alginato. As bandas observadas em 3574 cm^{-1} e 634 cm^{-1} são características do grupo hidroxila $(\text{OH})^{-1}$.

A incorporação de CO_3^{2-} ao biomaterial ou a presença desta fase caracteriza o comportamento bioativo que permite ao material uma integração com o tecido ósseo a partir de ligações químicas (LIU et al., 2002).



Fonte: CBPF

4.1.4 Ranelato de estrôncio

O fármaco, ranelato de estrôncio¹⁵, foi incorporado à dieta com ração pastosa, na proporção de 900 mg/Kg/dia/rato, conforme protocolo modificado a partir do descrito por Ammann e colaboradores (2004). Os animais apresentavam peso médio de 375 g e com isso calculou-se uma dose média de 337,5 mg de ranelato de estrôncio anidro, que correspondeu à dose diária de 675 mg de pó do Protos[®] fracionada em tubo plástico¹⁶. A administração do fármaco por via oral, na dieta, iniciou-se no segundo dia do pós-operatório estendendo-se até o período dos respectivos pontos biológicos. Uma porção da ração sólida (aproximadamente 8 g) foi triturada e misturada com 5 mL de água filtrada para formar dieta pastosa, e a esta se acrescentou a dose diária do ranelato de estrôncio (Figura 44) sempre no mesmo horário matinal, a partir do segundo dia pós-cirúrgico até a duração dos respectivos pontos biológicos avaliados. No entanto, antes de receber o fármaco em

¹⁵ PROTOS[®] - Laboratório Servier, França

¹⁶ Eppendorfs[®]; Axygen Quality[®], USA

dieta pastosa, no pós-operatório imediato, os animais dispunham para consumo apenas de água *ad libitum*.

Figura 44 - Ranelato de estrôncio e dose administrada na dieta em dieta pastosa



Fonte : Elaboração do autor.

4.2 AMOSTRA

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), conforme o Protocolo nº 0004/2010 do CEUA - UEFS (Anexos D e E). Esta seguiu as Normas Éticas de Pesquisas em Animais, com protocolos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)¹⁷, bem como as Normas Nacionais de Biossegurança. Foram observadas as diretrizes do Instituto Nacional de Saúde americano (NIH) para o cuidado e uso de animais de laboratório¹⁸.

Para a composição da amostra, foram utilizados 105 ratos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar albinus* (Figura 45) adultos jovens, machos, pesando, entre 350 e 400 g, o que corresponde à 3 a 4 meses de idade, operados e mantidos no pós-operatório Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Os animais foram mantidos durante todo o período experimental em gaiolas identificadas e autoclavadas, forradas com cama de maravalha de *pinus* autoclavada e trocada diariamente, alimentados com ração¹⁹, água *ad libitum* e mantidos em condições ambientais controladas de temperatura e luminosidade. Na ficha de identificação de cada animal, ainda constavam a massa corporal do animal, a data da cirurgia e da eutanazia bem como o nome do pesquisador.

¹⁷ www.concea.mct.gov.br

¹⁸ NIH Publicação n° 85-23, Rev. 1996.

¹⁹ Nuvilab CR-1 - Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo - PR, Brasil

4.3 TÉCNICA CIRÚRGICA

Os animais foram pesados e receberam anestesia e sedação por meio de injeção intramuscular de cloridrato de quetamina²⁰ 10%, na proporção de 0,12 mL/100g de peso, e cloridrato de xilazina²¹, na proporção de 0,06 mL/100g de massa corpórea, respectivamente (Figura 46A). Na sequência, os animais foram tricotomizados (Figura 46B) na região superior da calvária, e em seguida realizou-se a anti-sepsia do campo operatório com solução de iodopovidine (Figura 46C) e o posicionamento dos animais em decúbito ventral. Os animais foram então cobertos por um campo cirúrgico estéril do tipo fenestrado.

Logo após, o acesso à região da calvária foi feito por meio de uma incisão cutânea bicoronal, semilunar, com extensão de aproximadamente 3 cm, com tesoura cirúrgica curva de ponta fina, 15 cm²² (Figura 46D). Seguidamente, divulsionou-se (Figura 46E) com tesoura de ponta romba⁴ e elevou-se o retalho cutâneo com pinças mosquito curva para ter acesso ao perióstio, o qual foi incisado com lâmina²³ de bisturi nº 15 (Figura 46F), pinçado com pinça dente de rato, descolado (Figura 46G) e removido com auxílio de um periótomo de Molt²⁴ e uma tesoura ponta fina Íris curva²⁵ (Figura 46H)

Para confecção do defeito ósseo crítico, com aproximadamente 8,5 mm de diâmetro e aproximadamente 1,0 mm de profundidade na porção mediana da calvária (Figura 46) entre os vértices da sutura anterior (coronal) e posterior (lambdoidea), utilizou-se fresa trefina²⁶, acoplada a um contra-ângulo²⁷ com redução 16:1, e, a um motor cirúrgico para implantes²⁸ com rotação de 1500 rotações por minuto (rpm), torque de 55 N.cm, sob constante irrigação com solução fisiológica estéril (Figuras 46H e 46I). Na transfixação da calvária o fragmento foi removido, juntamente com dura-máter (Figura 46J). Em seguida, irrigou-se abundantemente o defeito para remoção de espículas ósseas e implantação dos biomateriais (Figura 45L) nos seus respectivos grupos, exceto no GCDC e no GRAnSr, no qual o defeito

²⁰ Dopalen[®], Vetbrands, SP - Brasil

²¹ Anasedan[®], Vetbrands, SP-Brasil

²² ABC Stainless Ltd[®] - Brasil

²³ Bencton Dickinson[®]- Brasil

²⁴ SS White[®]

²⁵ Rhosse[®]

²⁶ Dentoflex[®] - Brasil

²⁷ Dabi Atlante[®] – Brasil

²⁸ Driller[®] BLM 600 Plus – Brasil

foi preenchido apenas por coágulo (Figura 46J). Por fim, os retalhos foram reposicionados e suturados com pontos interrompidos com fio seda²⁹ 4.0 (Figura 46M) com auxílio de uma pinça Corn para sutura³⁰. Os pontos de sutura não foram removidos, pois transcorridos os tempos biológicos avaliados os mesmos caíram espontaneamente.

Figura 45 – Anatomia da calvária de rato: Linha temporal (LT); sutura escamosa (SE); sutura lambdoidea (SL); sutura sagital (SS); sutura coronal (SC); sutura interfrontal (SI); osso temporal (T); osso interparietal (IP); osso parietal (Pa); osso frontal (F)

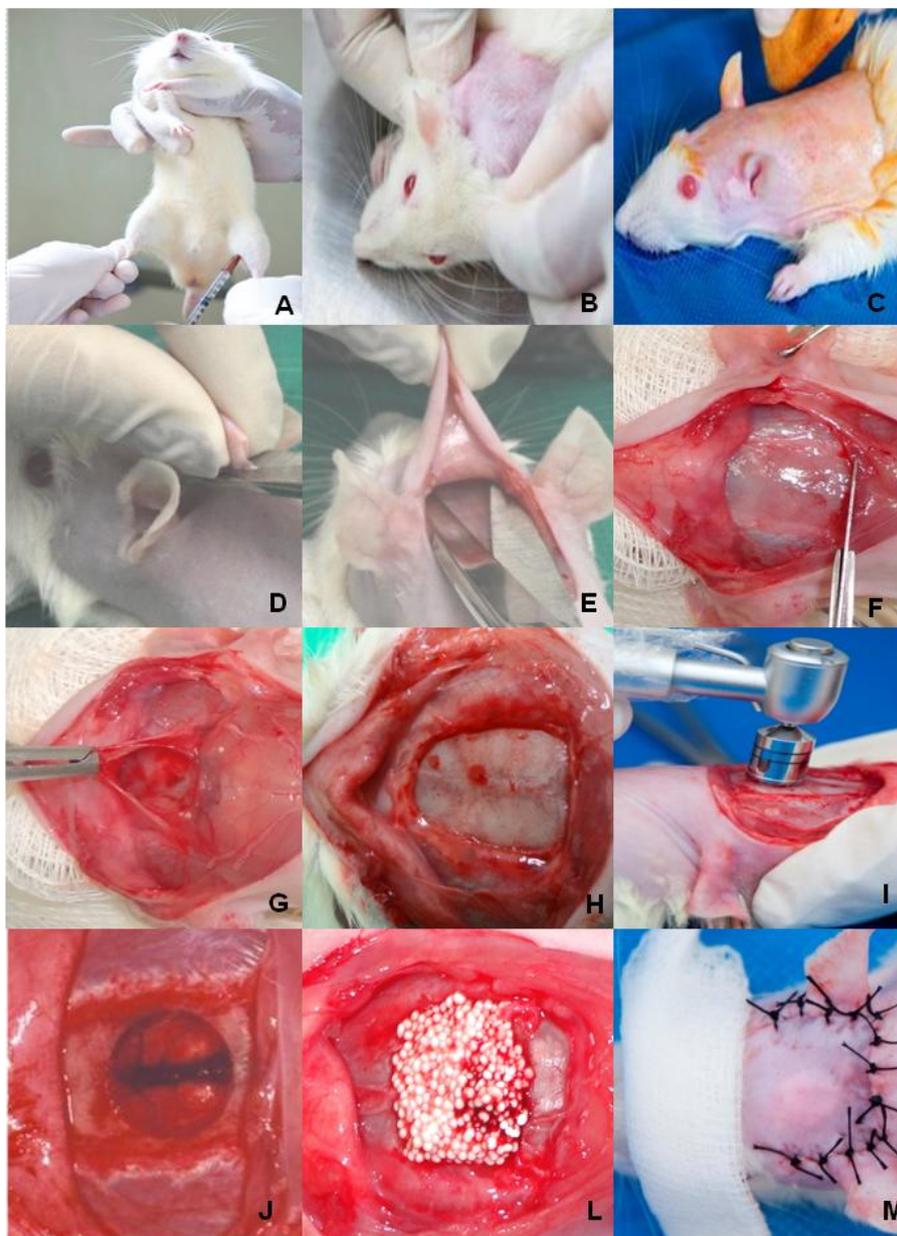


Fontes: Vista lateral direita: MCCORMACK, 2010; Vista superior: Acervo do autor.

²⁹ Ethicon – Johnson & Johnson® – Brasil

³⁰ SP20, HU-FRIEDY® - Brasil

Figura 46 – Sequência cirúrgica e implantação dos biomateriais: **(A)** Anestesia, analgesia e sedação; **(B)** Tricotomia; **(C)** Anti-sepsia e isolamento com campo cirúrgico; **(D)** Pinçamento e incisão cutânea bicoronal semilunar; **(E)** Divulsão; **(F)** Incisão do periósteo; **(G)** Descolamento e remoção do periósteo; **(H)** Exposição da calvária; **(I)** Demarcação do defeito crítico; **(J)** Transfixação; **(L)** Preenchimento do defeito com o biomaterial; **(M)** Retalho repositicionado e suturado



Fonte: Elaboração do autor.

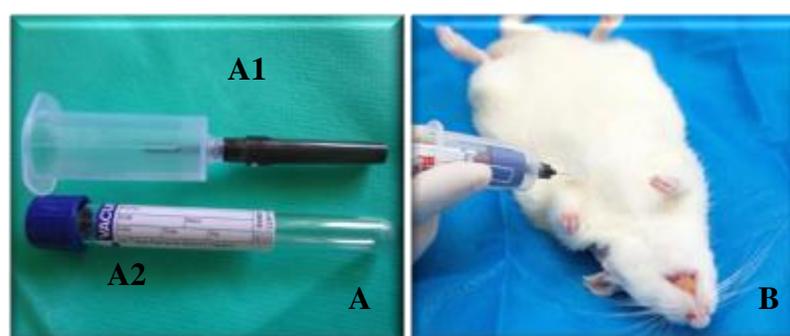
4.4 ETAPA LABORATORIAL

4.4.1 Coleta de sangue

O protocolo de coleta e a análise plasmática dos elementos cálcio e estrôncio é o mesmo descrito por Nascimento (2010). Os animais foram anestesiados e sedados nos pontos biológicos (15, 45 e 120 dias) com a mesma dose do anestésico e do relaxante muscular utilizados na etapa cirúrgica já descrita. Em seguida, os animais foram eutanasiados por exsanguinação com punção cardíaca. Posicionou-se o animal em decúbito dorsal, realizou-se a antisepsia com álcool iodado 2% na região do tórax. Em seguida, localizou-se a região do coração com o dedo indicador sobre o tórax entre a 4ª e 6ª costela e, ao perceber-se os batimentos cardíacos, introduziu-se a agulha perpendicularmente à parede torácica já acoplada no adaptador e, posteriormente, posicionou-se o tubo de coleta a vácuo, contendo heparina sódica (Figura 47).

Nos grupos CCDC, RanSr e HAAIgrRanSr, foram coletados 6,0 mL de sangue³¹ dos animais com aspiração lenta de aproximadamente 2,0 mL/min. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos e congelado (-20°C) para posterior análise bioquímica. Esta coleta foi realizada no Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana. As análises bioquímicas para cálcio e estrôncio foram realizadas no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, tendo como responsável o Prof. Dr. José Antônio Menezes Filho.

Figura 47 – Punção cardíaca para coleta de sangue: **(A) A1**- Adaptador e agulha para punção; **A2** - Tubos de coleta com heparina sódica³²; **(B)** Coleta de sangue



Fonte : Elaboração do autor.

³¹ Volume total de sangue do rato: 58-70 mL/kg (cerca de 6,4% do peso do animal). Um animal de 375 g teria aproximadamente 24 mL de volume total de sangue. Fonte: Weiss et al., 2000.

³² Vacuntainer®

4.4.2 Análise plasmática de cálcio e estrôncio

A) Dosagem de estrôncio

As amostras foram preparadas em duplicata, de acordo com o método descrito por D'Haese et al. (1997). Nesse procedimento, 400 µL da solução diluente [Triton X-100 0,1% em HNO₃ 0,2% (Suprapur³³)] foram pipetados diretamente para os frascos do amostrador automático e, em seguida, adicionados a 100 µL do plasma, com agitação. Essa diluição (1:5) foi suficiente para que os níveis plasmáticos normais ficassem dentro da faixa da curva de calibração, que foi entre 2,5 a 20 µg/L. As amostras dos animais tratados com ranelato de estrôncio sofreram diluição mais elevada (1:1000) devido a especificidade da técnica, descrita a seguir.

As concentrações de estrôncio no plasma foram determinadas por meio da espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry GFAAS)³⁴. Essa técnica apresenta alta sensibilidade, especificidade e seletividade para quantificar elementos cujos teores estão geralmente muito baixos em amostras biológicas (D'HAESE et al., 1997). A fonte de luz foi uma lâmpada de cátodo oco, usada em 25 mA a 460,7 nm. As condições de temperatura padronizadas foram as seguintes: secagem – evaporação do solvente (70-120°C); carbonização – remoção da matéria orgânica ou dos componentes voláteis da matriz (1000°C), ambas sob fluxo de argônio de 0,3 L/min e a atomização – que gera uma nuvem do metal no estado elementar quando é feita a leitura a 2600°C. Apenas 8 µL da amostra foram transferidos para o tubo de grafite particionado, revestido piroliticamente.

Todas as amostras preparadas foram injetadas no GFAAS em duplicata, sendo aceita somente uma variação intrainjeção menor que 10%. O limite de detecção do método foi de 1 µg/L. A precisão intrabateria, em amostra de plasma humano (n=5, 25 µg/L), calculada como coeficiente de variação, foi <1%. Por falta de uma amostra de referência certificada, a exatidão (99,6%) foi calculada como recuperação em plasma humano, adicionando-se 10 µgSr/L.

³³ Merck®

³⁴ Varian AA240Z, acoplado ao forno de grafite GTA 120 com o auxílio do amostrador automático PSD 120.

B) Dosagem de cálcio

O método empregado na preparação e análise plasmática do cálcio foi adaptado a partir do descrito por Welch, Hamar e Fettman (1990). Uma alíquota do plasma dos animais foi precipitada com igual volume de ácido tricloroacético³⁵ a 5%. Em seguida, o sobrenadante foi diluído na proporção 1:50 com solução de cloreto de lantânio³⁶ a 0,1%. Todas as amostras foram preparadas em duplicatas e aspiradas por espectrometria de absorção atômica com chama (Flame Atomic Absorption Spectrometry - FAAS)³⁷. Foi registrada a média de três leituras, observado o coeficiente de variação menor que 5%. O equipamento foi calibrado com soluções-padrão de cálcio (1 a 5 mg/L), preparadas em ácido nítrico 0,2%.

Para fins de controle de qualidade, amostras de referência de soro humano Lyphocheck Nível 1³⁸ foram analisadas repetidamente (n=6) durante a corrida das amostras. A exatidão e precisão observadas foram 103,3% e 98,8%, respectivamente.

As concentrações de Ca no plasma foram determinadas no FAAS, equipado com queimador de ar-acetileno. Essa é uma técnica bastante utilizada para analisar elementos em níveis de mg/L. A fonte de luz foi uma lâmpada de cátodo oco, usada em 10 mA a 422,7 nm.

4.4.3 Processamento histológico

Os animais foram eutanasiados em cada grupo após a dose letal do anestésico e por exsanguinação nos pontos biológicos de 15, 45 e 120 dias do pós-operatório. Removeu-se toda porção superior da calvária em bloco. Os espécimes obtidos foram avaliados macroscopicamente, e colocados em recipientes plásticos, identificados, contendo solução de formol tamponado a 4% para fixação durante 48 horas. Em seguida, os espécimes foram reduzidos 1 mm aquém e posterior ao maior diâmetro do defeito crítico, na linha de corte (LC), conforme ilustrado nas figuras 48 e 49. Utilizou-se um disco de carborundum nº 409, acoplado a um mandril e a uma

³⁵ Merck®

³⁶ JT Backer®

³⁷ SpectrAA 55B, Varian®

³⁸ Bio-Rad®

micro retífica³⁹. E, na área do defeito, o corte foi feito com navalha para parafina.

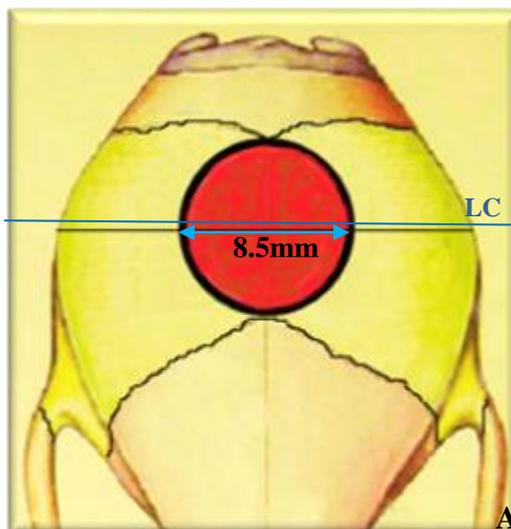
No Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB) do Instituto de Ciências da Saúde – UFBA, após fixação, os espécimes correspondentes à porção anterior da calvária/defeito foram descalcificados em EDTA a 5% por um período de sete dias e incluídos em parafina. No Instituto de Patologia Geral e Cutânea (Ipac), Salvador, Bahia, procedeu-se o processamento destes espécimes em um processador automático de tecido⁴⁰ utilizando-se a sequência de álcool em diferentes concentrações, xilol e parafina. Subsequentemente, foi realizada a inclusão das amostras em blocos de parafina, com o lado do defeito voltado para o fundo do cassete, com a finalidade de efetuar cortes transversais que permitissem avaliar a reparação do defeito, tendo como referência a borda óssea. As lâminas foram previamente lavadas com detergente neutro, água destilada, solução de ácido clorídrico (1 N), solução de álcool absoluto e ácido acético na proporção (3:1). Em seguida, foram previamente silanizadas, de maneira sequencial, em solução de organossilano a 2% diluído em acetona, acetona pura e por último lavadas com água destilada. Os cortes histológicos seriados de 5 µm de espessura, cortados em micrótomo⁴¹ e navalha específica para parafina, foram dispostos nestas lâminas e corados por: hematoxilina e eosina, picrossírius vermelho para identificar o colágeno, tricrômico de Masson-Goldner para evidenciar células e vasos, e examinados por microscopia de luz comum.

³⁹ Dremel® Multipro 395

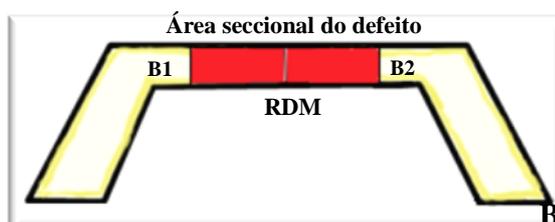
⁴⁰ LEICA® – Alemanha

⁴¹ LEICA® – Heidelberger - Alemanha

Figura 48 - Desenho esquemático de defeito crítico em calvária de rato: **(A)** Linha de referência (maior diâmetro do defeito) para o corte transversal dos espécimes (Adaptado de MEINEL e outros, 2005) e linha de corte (LC) 1 mm aquém do maior diâmetro; **(B)**. Corte transversal da extensão linear e da área seccional; bordas ósseas (B1 e B2); região da dura máter (RDM)

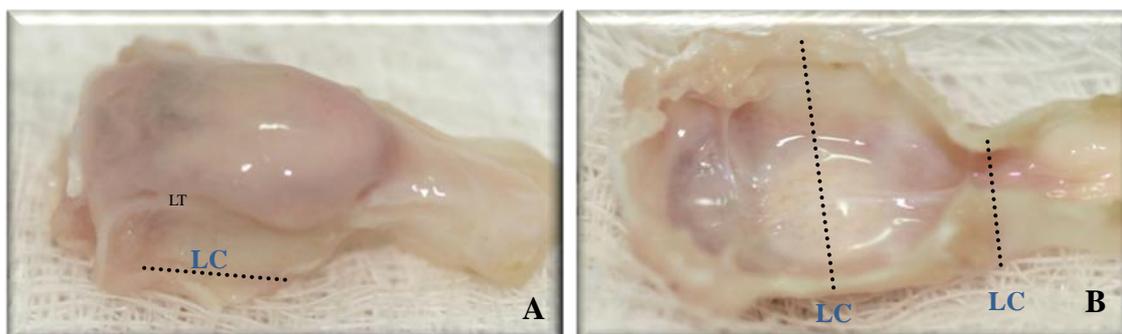


Fonte: Adaptado de Meinel et al., 2005.



Fonte : Elaboração do autor.

Figura 49 – Padronização das linhas de corte nos espécimes: **(A)** Vista dorsal do espécime com biomaterial preenchendo a região do defeito; linha de corte (LC) e Linha temporal (LT) **(B)** Vista ventral do espécime, com as linhas de referência para o corte.



Fonte : Elaboração do autor

A aquisição das imagens foi por meio de uma câmera de vídeo digital⁴² acoplada a um microscópio de luz⁴³ polarizada, utilizada para captura e morfometria das imagens no Sistema de Análise de Processamento de Imagens⁴⁴ calibrada com 1pixel = 2,46 µm e zoom de 0,56x. A seleção das áreas as linhas para morfometria foram delineadas manualmente. Os ajustes de brilho e contraste, bem como a identificação das estruturas, foram realizadas em um programa de edição de imagens⁴⁵.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Plano amostral

Devido à alocação não randômica dos animais nos grupos e, conseqüentemente, a impossibilidade de uma estimativa adequada do erro-padrão, não foram realizadas análises inferenciais (teste estatístico de hipótese, intervalo de confiança) (LUDWIG, 2005; MAXWELL; DELANEY, 2004). As análises foram realizadas em um Software Estatístico Livre⁴⁶.

4.5.1 Análise estatística da concentração plasmática de cálcio e estrôncio

Devido à grande variabilidade e assimetria da concentração plasmática de cálcio e estrôncio nos grupos, realizou-se análise descritiva não centrada na média aritmética (mediana, 1º e 3º quartis, valores mínimos e máximos) para identificar as características gerais e específicas da amostra. Com os resultados, foram gerados boxplots e tabelas. Utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman na avaliação da correlação entre as concentrações plasmáticas de cálcio e estrôncio

4.5.2 Análise estatística do histomorfométrico das calvárias

Os parâmetros mensurados foram:

- Extensão linear do defeito (EL);
- Extensão linear da matriz osteoide (ELO);

⁴² Leica DFC310 FX; Resolução: 1392 x 1040 pixels – 1.4 Mpixels, LEICA® Heerbrugg/Suíça.

⁴³ Leica DM 1000; LEICA® – Alemanha.

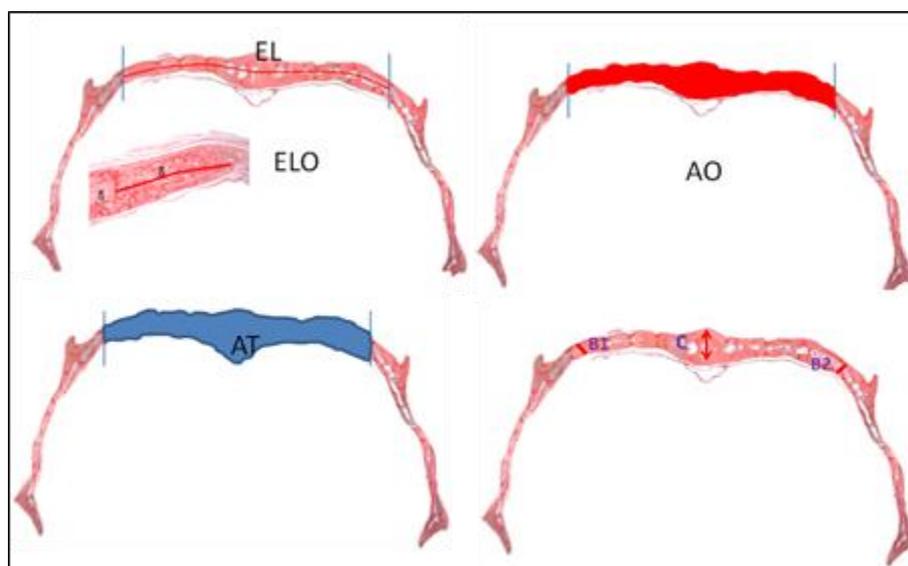
⁴⁴ Software Leica QWin Plus, 2011, LEICA® – Alemanha.

⁴⁵ Corel Photo Paint X5, versão 2010.

⁴⁶ R (versão .15.2) R development Core Team, 2013.

- %ELO - porcentagem de ELO comparado à EL;
- Área seccional total de preenchimento do defeito (AT);
- Área seccional de matriz osteoide (AO);
- % AO - porcentagem de AO comparado à AT;
- B1 e B2 – espessura das bordas do defeito;
- C – espessura no centro do defeito sem incluir o seio sagital;

Figura 50 - Micrografia esquemática da morfometria das calvárias para as variáveis: EL, AT, AO, C, B1 e B2



Fonte : Elaboração do autor.

A morfometria no grupo CSDC foi realizada, considerando a região do defeito obtido pela média global (grupo e tempo) de EL dos demais grupos. A partir da $EL_{média}$, foi possível ver as linhas de corte para a medição das espessuras B1 e B2.

Para a análise estatística do histomorfométrico das calvárias foram gerados boxplots e tabelas e realizou-se uma análise descritiva centrada na média aritmética.

Foram efetuadas análises de variância descritivas, para se avaliar a variação (efeito) intragrupos, intergrupos e do tempo sobre cada uma das variáveis histomorfométricas. Fez-se análise de correlação entre medidas histomorfométricas através do coeficiente de correlação de Lin (LIN, 1989).



5.1 RESULTADOS DA ANÁLISE PLASMÁTICA¹

Após transcorridos os pontos biológicos, obteve-se a concentração plasmática de cálcio e estrôncio de cada animal que recebeu a terapia sistêmica com o ranelato de estrôncio (RanSr e HAAIgRanSr) e nos animais do grupo controle com defeito crítico (CCDC). Na análise estatística, observou-se que a média das concentrações plasmáticas não representam os dados, nem para o cálcio, nem para o estrôncio. Por isso, o cálculo comparativo entre os grupos e nos tempos biológicos foi efetuado pelo valor da mediana. As tabelas 3, 4 e 5 representam os valores encontrados para estes três grupos avaliados.

Tabela 3 – Análise plasmática de estrôncio e cálcio aos 15 dias do pós-operatório

AOS 15 DIAS						
GRUPOS ANIMAIS	CCDC		RanSr		HAAIgRanSr	
Concentração Plasmática	Sr ⁺² (mmol/L)	Ca ⁺² (mmol/L)	Sr ⁺² (mmol/L)	Ca ⁺² (mmol/L)	Sr ⁺² (mmol/L)	Ca ⁺² (mmol/L)
Valor mínimo	0,00042	2,40000	0,20000	2,00000	0,00068	1,91000
Mediana	0,00050	2,50000	0,20000	2,20000	0,00074	1,97000
Valor máximo	0,00057	2,80000	0,30000	2,20000	0,00077	2,04000

Tabela 4 – Análise plasmática de estrôncio e cálcio aos 45 dias do pós-operatório

AOS 45 DIAS						
GRUPOS ANIMAIS	CCDC		RanSr		HAAIgRanSr	
Concentração Plasmática	Sr ⁺² (mmol/L)	Ca ⁺² (mmol/L)	Sr ⁺² (mmol/L)	Ca ⁺² (mmol/L)	Sr ⁺² (mmol/L)	Ca ⁺² (mmol/L)
Valor mínimo	0,00052	2,50000	0,03000	2,20000	0,000769	2,12000
Mediana	0,00060	2,50000	0,10000	2,30000	0,000857	2,20000
Valor máximo	0,00064	2,60000	0,11000	2,50000	0,000943	2,35000

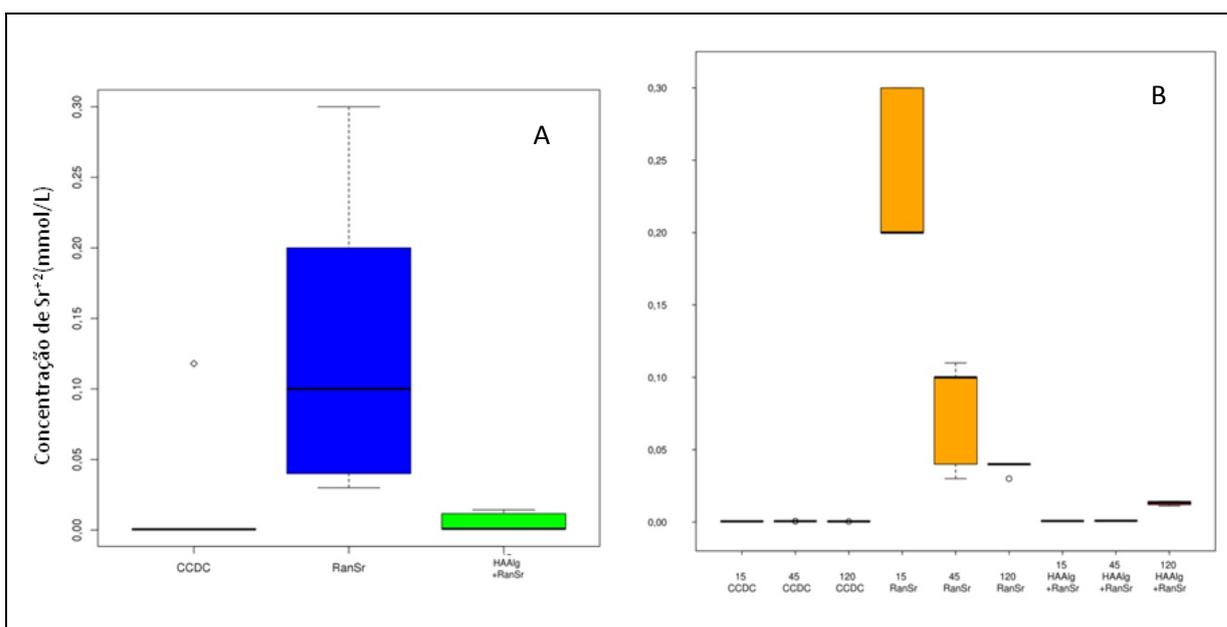
¹ Os dados do grupos CCDC e RanSr, nos pontos biológicos avaliados, foram cedidos por NASCIMENTO, 2010, para a comparação dos resultados com o grupo HAAIgRanSr.

Tabela 5 – Análise plasmática de estrôncio e cálcio aos 120 dias do pós-operatório

AOS 120 DIAS						
GRUPOS ANIMAIS	CCDC		RanSr		HAAIlgRanSr	
Concentração Plasmática	Sr ⁺² (mmol/L)	Ca ⁺² (mmol/L)	Sr ⁺² (mmol/L)	Ca ⁺² (mmol/L)	Sr ⁺² (mmol/L)	Ca ⁺² (mmol/L)
Valor mínimo	0,00040	2,30000	0,03000	2,20000	0,01124	2,21000
Mediana	0,00047	2,40000	0,04000	2,30000	0,01368	2,55000
Valor máximo	0,00052	2,50000	0,04000	2,40000	0,01437	2,63000

Os dados numéricos não paramétricos representados pela mediana da concentração plasmática de cálcio e estrôncio foram plotados em gráfico *Boxplot* no *Software* Estatístico Livre R (versão 2.15.2)²

Como observado no gráfico 10A, nos grupos em que houve administração do ranelato de estrôncio, a concentração plasmática desse elemento foi maior naqueles animais, quando comparada à concentração encontrada no grupo controle para todos os pontos avaliados.

Gráfico 10 - Concentração plasmática de estrôncio: A) por grupo e B) por ponto biológico aos 15, 45 e 120 dias nos grupos avaliados

² R Development Core Team, 2013

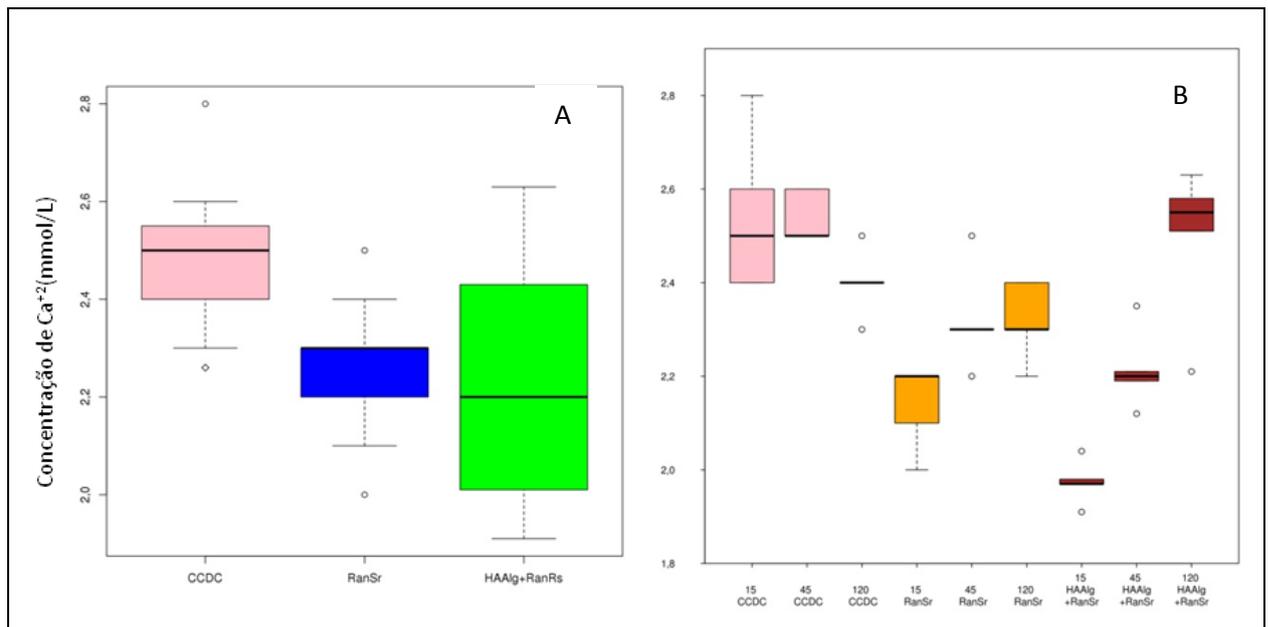
No grupo RanSr a mediana da concentração plasmática do Sr foi maior do que a mediana da concentração do Sr no CCDC aos 15 dias (400x), aos 45 dias (166,6x) e aos 120 dias (85,1x). O platô biológico ocorreu aos 15 dias e reduziu gradativamente (Gráfico 10B).

No grupo HAAIlgRanSr, a mediana da concentração plasmática de estrôncio foi maior aos 15 dias (1,48x), aos 45 dias (1,43x) e aos 120 dias (29,1x) do que a concentração no CCDC nos respectivos tempos biológicos (Gráfico 10B).

A mediana da concentração de Sr no RanSr foi maior aos 15 dias (270,2x), aos 45 dias (116,7x) e aos 120 dias (2,9x) do que a concentração no grupo HAAIlgRanSr (Gráfico 10B).

O gráfico 11A representa a concentração plasmática de cálcio que de uma forma geral foi maior no grupo controle.

Gráfico 11 - Concentração plasmática de cálcio: A) por grupo e B) por ponto biológico aos 15, 45 e 120 dias nos grupos avaliados



Observa-se que no grupo experimental em que se administrou o RanSr, a mediana da concentração plasmática de Ca foi menor nos pontos biológicos aos 15 dias (0,88x), aos 45 dias (0,92x) e aos 120 dias (0,96x), quando comparado com a do grupo CCDC (Gráfico 11).

A mediana da concentração do Ca HAAIlgRanSr foi menor aos 15 dias (0,79x), aos 45 dias (0,88x) e maior aos 120 dias (1,06x), quando comparado com a

do grupo CCDC. Essa concentração de Ca no grupo HAAIlgRanSr, aos 120 dias, foi superior ao do grupo RanSr e ao do grupo CCDC no mesmo período.

A mediana da concentração do Ca no grupo RanSr foi maior aos 15 dias (1,11x) e aos 45 dias (1,04x), porém, foi menor aos 120 dias (0,9x), quando comparado com a do grupo HAAIlgRanSr. No grupo CCDC houve uma redução progressiva de Ca no sangue (Gráfico 11).

No grupo RanSr a concentração de Sr aumentou, enquanto a de Ca diminuiu para os pontos biológicos observados (Gráficos 10 e 11). No grupo HAAIlgRanSr, tanto a concentração de Sr, quanto a de Ca aumentaram progressivamente nos pontos biológicos. No entanto, na análise estatística para a concentração de cálcio e estrôncio foi observado, por meio do teste de Spearman ($Rho = -0,37729$), que houve correlação fraca e inversa entre a concentração plasmática de cálcio e estrôncio de 37,7%.

Em todos os grupos e em todos os pontos biológicos, a concentração de cálcio foi sempre maior do que a do estrôncio (Gráficos 10 e 11).

5.2 ANÁLISE QUALITATIVA – DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA

5.2.1 GCSDC – Controle sem defeito crítico

Em corte transversal da calvária íntegra na região correspondente ao defeito confeccionado nos outros grupos experimentais, a espessura óssea (EC), obtida por histomorfometria, foi em média de 0,88 mm na região do seio sagital (SS). A região correspondente à borda do defeito apresentava espessura óssea média de 0,78 mm. A extensão transversal linear entre as linhas temporais (LT) correspondia a 11,4 mm. A espessura óssea na região da linha do temporal foi de aproximadamente 1,1 mm. O osso temporal remanescente apresentou altura entre a linha temporal e a linha de corte de 3,8 mm. Nesse tecido mineralizado, observou-se lamelas de deposição óssea, regiões de medula óssea, osteócitos e seus prolongamentos e osteoblastos (Prancha 1A).

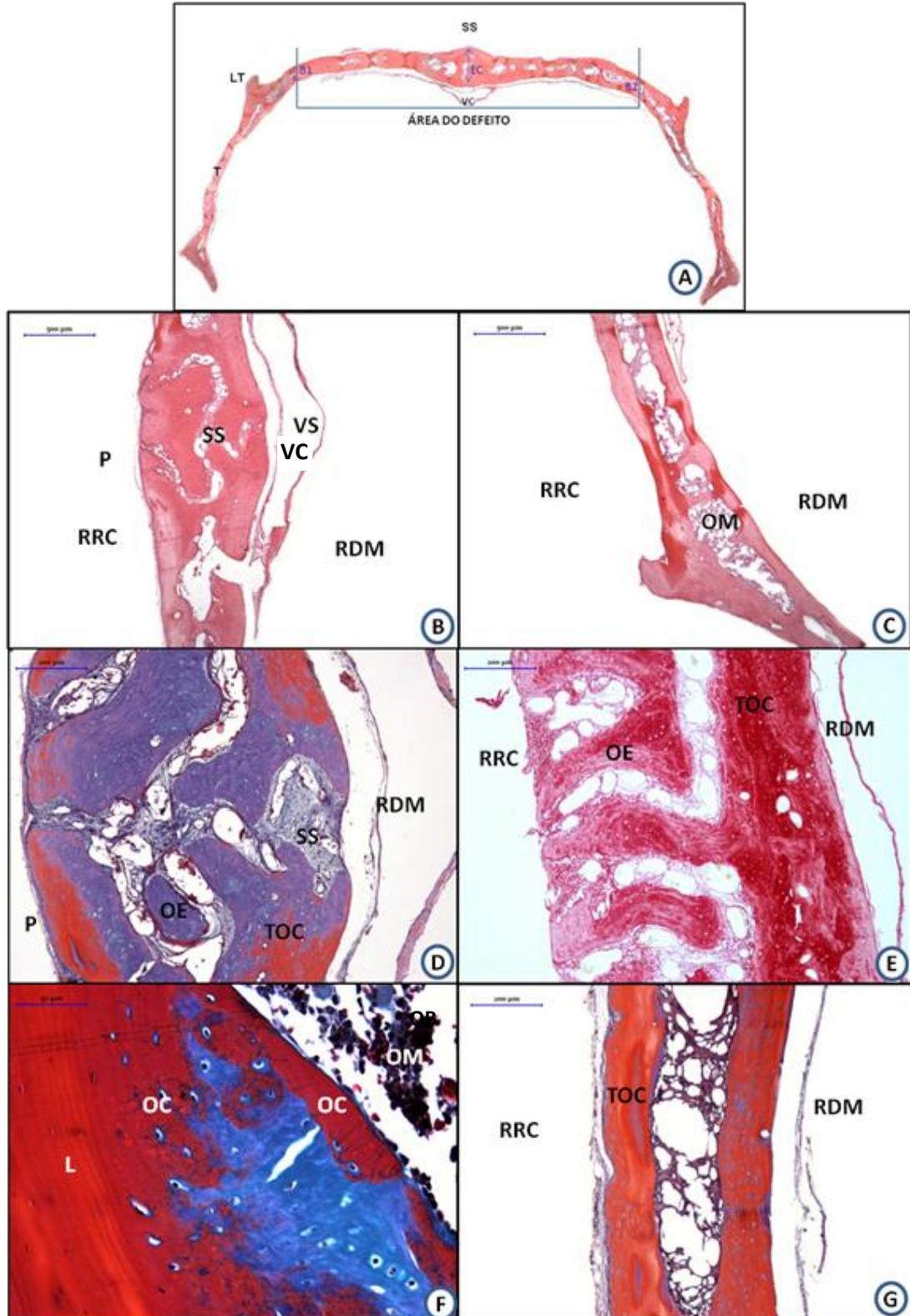
Nas superfícies do tecido ósseo, o perióstio pode ser identificado na região mais superficial voltada para o retalho cutâneo e a dura mater na região mais profunda. O tecido conjuntivo estava disposto em toda a extensão transversal, tangenciando o tecido ósseo. O tecido conjuntivo era mais frouxo e bem

vascularizado na região voltada para o retalho cutâneo e mais delgado, denso, bem organizado, com fibras colágenas em disposição paralelas entre si, na região da dura mater. Numerosos vasos capilares sanguíneos foram observados neste tecido conjuntivo. Na região central correspondente à sutura sagital, próximo à dura mater, observou-se o corte transversal do seio sagital paralelo a esta sutura. A sutura sagital era constituída por tecido conjuntivo denso, rico em fibras colágenas, fibroblastos e presença de vasos capilares sanguíneos (Prancha 1B, C, D e E).

Na calvária, o osso cortical era formado pelas lâminas externa e interna e entre estas havia a díploe que constituía o tecido ósseo medular. A região medular, ora apresentava-se com espaços amplos, ora com poucas intercomunicações entre si. Na região central, próximo ao seio sagital, havia canais medulares que se comunicavam com a região da dura-máter (Prancha 1C e G).

Osteócitos, osteoblastos e células da medula óssea também foram identificados no tecido ósseo da calvária (Prancha F).

PRANCHA 1 - Fotomicrografias do GCSDC - 15, 45 e 120 dias. Calvária íntegra, apresentando aspectos anatômicos semelhantes em todos os pontos biológicos, **aos 120 dias:** (A) As espessuras das bordas são correspondentes à área do defeito (B1 e B2); sutura sagital (SS), seio sagital (VC), espessura central do osso parietal (EC), linha do temporal (LT), osso temporal (T), em HE. Barra: 1 mm. Em maior aumento, em B e C, GCSDC, **aos 15 dias:** (B) Região central - seio sagital (VC) na região da dura-máter (RDM), sutura sagital (SS), em HE. Barra: 500 µm. (C) Tecido ósseo cortical (TOC) da diploe e medula óssea (OM), em HE. Barra: 500 µm. Nos cortes D e E no GCSDC, **aos 45 dias:** (D) Região central - perióstio (P), sutura sagital (SS), dura-máter (RDM) em TG, barra: 200 µm. (E) Osso cortical (TOC) e osso esponjoso (OE) em PIFIG, barra: 200 µm. **F e G GCSDC, aos 120 dias:** (F) Lamelas ósseas (L), osteócitos e seus prolongamentos, osteoblastos (OB), medula óssea (OM), endóstio (E) em TG, Barra: 50 µm. (G) Osso cortical (TOC) e medular aos 120 dias em TG. Barra: 200 µm.



5.2.2 GCCDC – Controle com defeito crítico

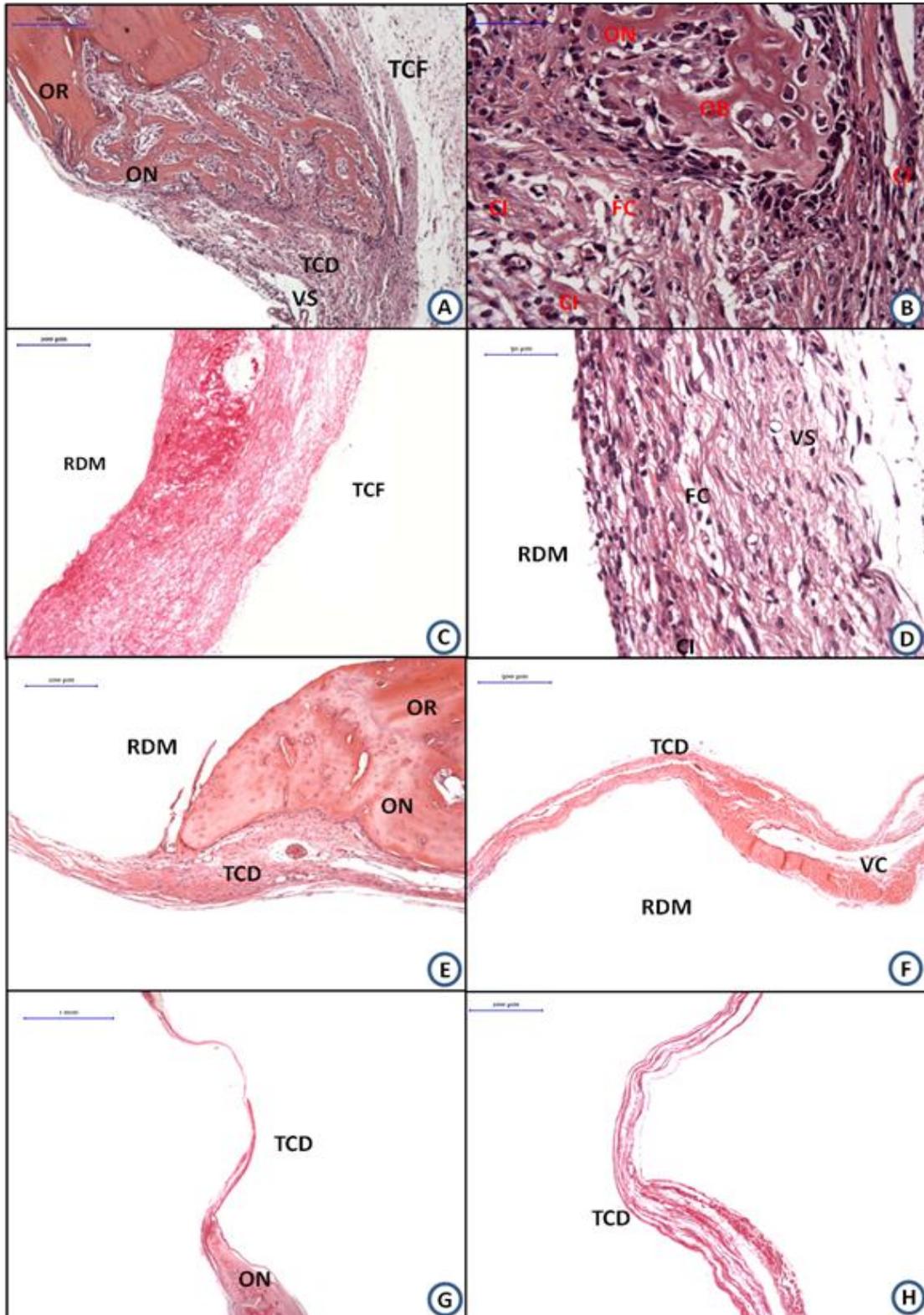
Na região das bordas ósseas do defeito, aos 15 dias, houve neoformação óssea reparativa e restrita a estas, com presença de osteoblastos ativos e esta neoformação manteve-se com as mesmas características aos 45 dias, apenas em maior extensão, sendo que aos 120 dias mostrava-se mais estável e sem características de proliferação (Prancha 2A, E e G).

As demais áreas reparativas do defeito estavam preenchidas aos 15 dias por tecido conjuntivo frouxo, com uma espessura reduzida em relação à morfologia do defeito, com proliferação de células fusiformes mesenquimais, mais acentuadas na região voltada para a dura mater (Prancha 2B, C e D). O tecido conjuntivo, aos 45 e 120 dias, tornou-se progressivamente mais delgado, aquém da espessura da borda óssea, adelgaçando-se das bordas ao centro do defeito. A presença de fibras colágenas e células fusiformes, algumas com aspectos semelhantes a fibroblastos, estavam dispostas paralelamente entre si (Prancha 2E, F, G e H).

Houve um discreto infiltrado inflamatório mononuclear difuso (Prancha 2B e D) aos 15 dias, que se tornou inconspícuo aos 45 dias, com presença de poucas células inflamatórias e ausentes no ponto biológico de 120 dias.

O estroma bem vascularizado com capilares sanguíneos foi observado aos 15 dias. Essa vascularização estava reduzida aos 45 dias, sendo mais evidente próximo às bordas ósseas. Embora houvesse a presença de vasos sanguíneos, não se observou neoangiogênese aos 120 dias.

PRANCHA 2 - Fotomicrografias do GCCDC - 15, 45 e 120 dias. Os cortes histológicos A, B, C e D, **aos 15 dias**, representam: **(A)** Borda óssea - osso remanescente (OR), matriz osteoide do osso reparacional (ON), tecido conjuntivo frouxo (TCF) e denso (TCD), com presença de vasos sanguíneos (VS), em HE. Barra: 200 µm. **(B)** Matriz osteoide com osteoblastos ativos, fibras colágenas, fibroblastos (FB) e células inflamatórias em HE. Barra: 50 µm. Na região central do defeito: **(C)** Tecido conjuntivo frouxo (TCF), rico em fibras colágenas, em PIFIG. Barra: 200 µm. Em maior aumento na mesma região: **(D)** Células inflamatórias (CI), fibras colágenas (FC) e fibroblastos ativos, em HE. Barra: 50 µm. Nos cortes E e F, **aos 45 dias**: **(E)** Na região da borda óssea, osso remanescente (OR) e osso neoformado (ON); As demais regiões do defeito estão preenchidas pelo tecido conjuntivo fibroso (TCD), em PIFIG. Barra: 200 µm. **(F)** Região central do defeito, observa-se o seio sagital (VC), em PIFIG. Barra: 500 µm. Neste mesmo grupo, nos cortes G e H, **aos 120 dias**: **(G)** Tecido conjuntivo fibroso (TCD) em menor espessura, 120 dias, em PIFIG. Barra: 1mm. Em maior aumento em **(H)**, fibras colágenas em PIFIG. Barra: 200 µm.



5.2.3 GGel – Gelatina

O tecido mineralizado, aos 15 dias, preencheu dois terços de extensão: mais espesso próximo à borda óssea e mais delgado em direção ao centro do defeito próximo ao seio sagital com um terço de espessura. Havia proliferação de células fusiformes que se diferenciavam em osteoblastos com formação inicial de lamelas mineralizadas (Prancha 3 e Prancha 4A). Este tecido, aos 45 dias, ocupava de um terço a três quartos da extensão do defeito com direção centrípeta e espessura similar ou um pouco aquém da espessura da borda óssea (Prancha 4E e F), exceto na região central do defeito em que se adelgaça. O defeito ósseo, aos 120 dias, apresentava-se quase totalmente reparado, faltando um pouco menos do que um quinto para fechá-lo na região que corresponde à sutura sagital. O preenchimento do defeito com o tecido mineralizado apresentou espessura muito similar à borda óssea. Este tecido tinha lamelas de deposição que circunscruvia vasos sanguíneos, regiões de medula óssea, osteócitos ativos com seus prolongamentos e osteoblastos (Prancha 5).

Em algumas áreas, aos 15 dias, foram vistos elementos esferoides e eosinofílicos do biomaterial, com tamanhos entre 5 e 20 μm aproximadamente, englobados na matriz osteoide (Prancha 3D; Prancha 4C e D). Nos demais pontos biológicos, esses elementos tinham tamanhos menores e alguns com núcleos de mineralização.

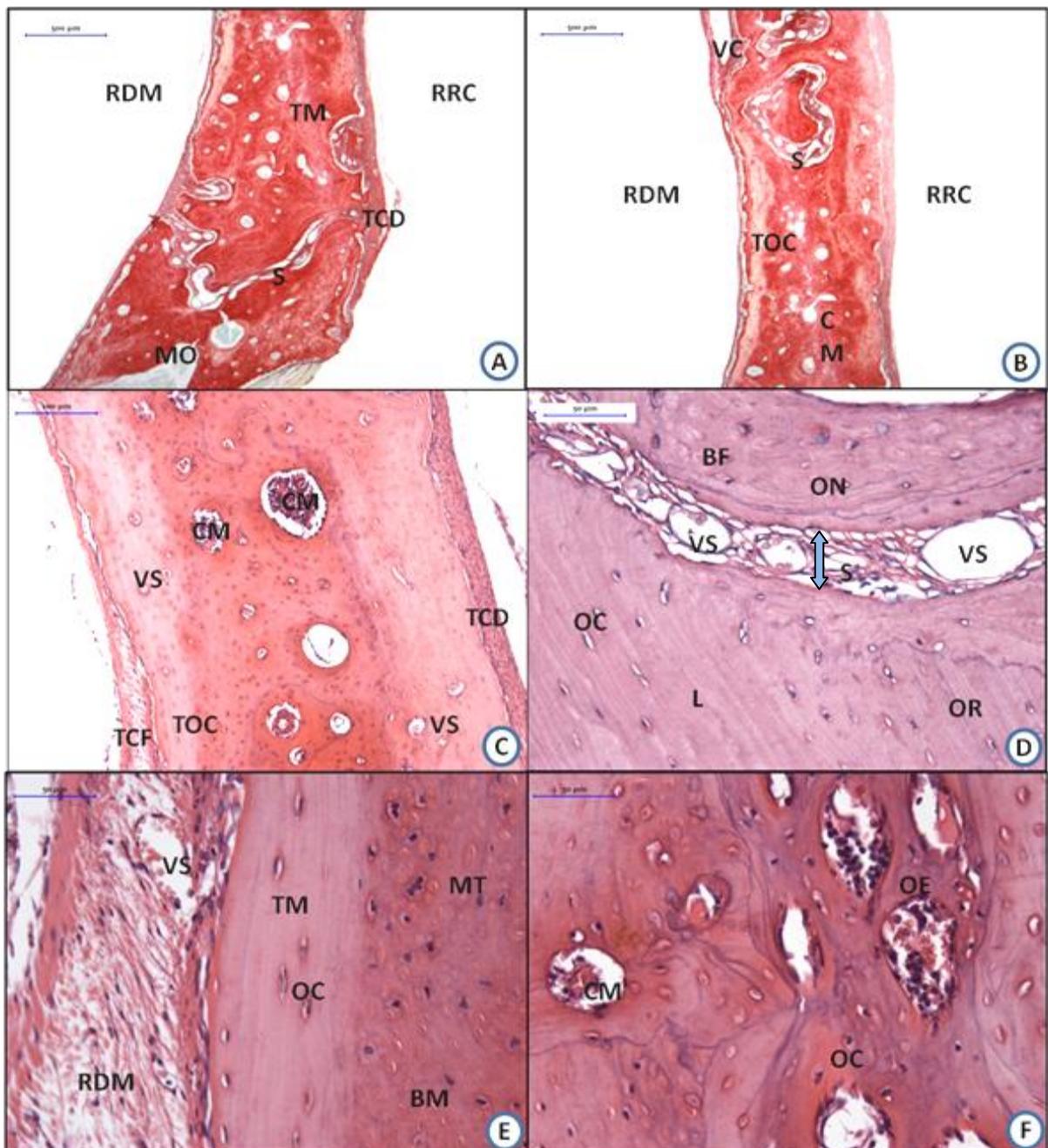
O tecido conjuntivo denso, com disposição de fibras colágenas paralelas entre si e fibroblastos em toda a extensão do defeito, aos 15 dias, tangenciando o tecido mineralizado formado, tanto na região do retalho, quanto na região da dura máter (Prancha 3B e E; Prancha 4B) em algumas regiões, era frouxo e edemaciado. Nos demais pontos biológicos, aos 45 dias – e 120 dias nas áreas onde não houve formação de tecido mineralizado – houve preenchimento pelo mesmo tipo de tecido conjuntivo denso (Prancha 4 E e F; Prancha 5).

Um discreto infiltrado inflamatório mononuclear foi encontrado, aos 15 dias, próximo à dura máter, porém, aos 45 e 120 dias, a inflamação estava praticamente inconspícua.

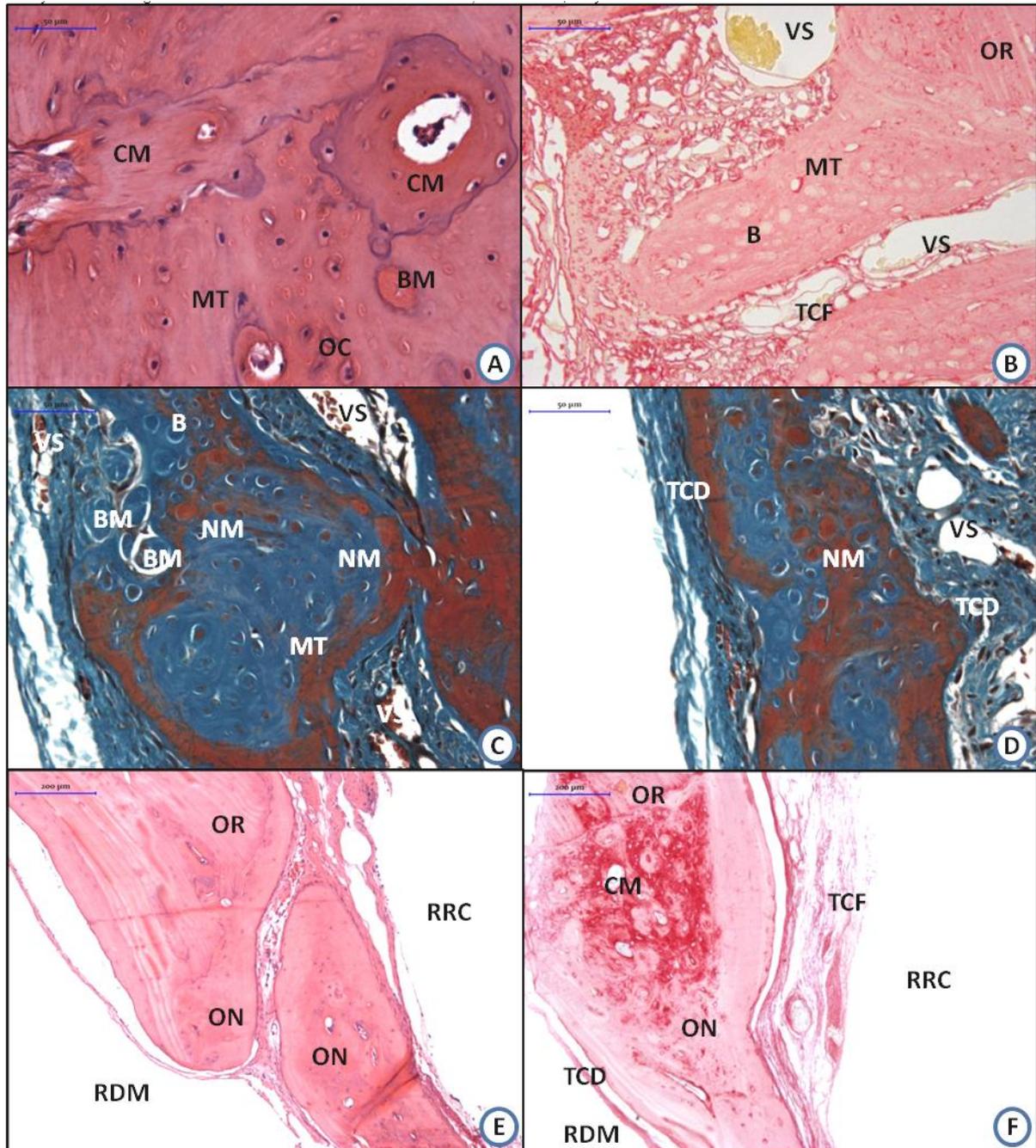
O tecido conjuntivo estava bastante vascularizado por capilares sanguíneos aos 15 dias, sem características de neoformação e, aos 45 e 120 dias, esse tecido

apresentava-se bem vascularizado por vasos e capilares sanguíneos estáveis (Prancha 5D, E e F).

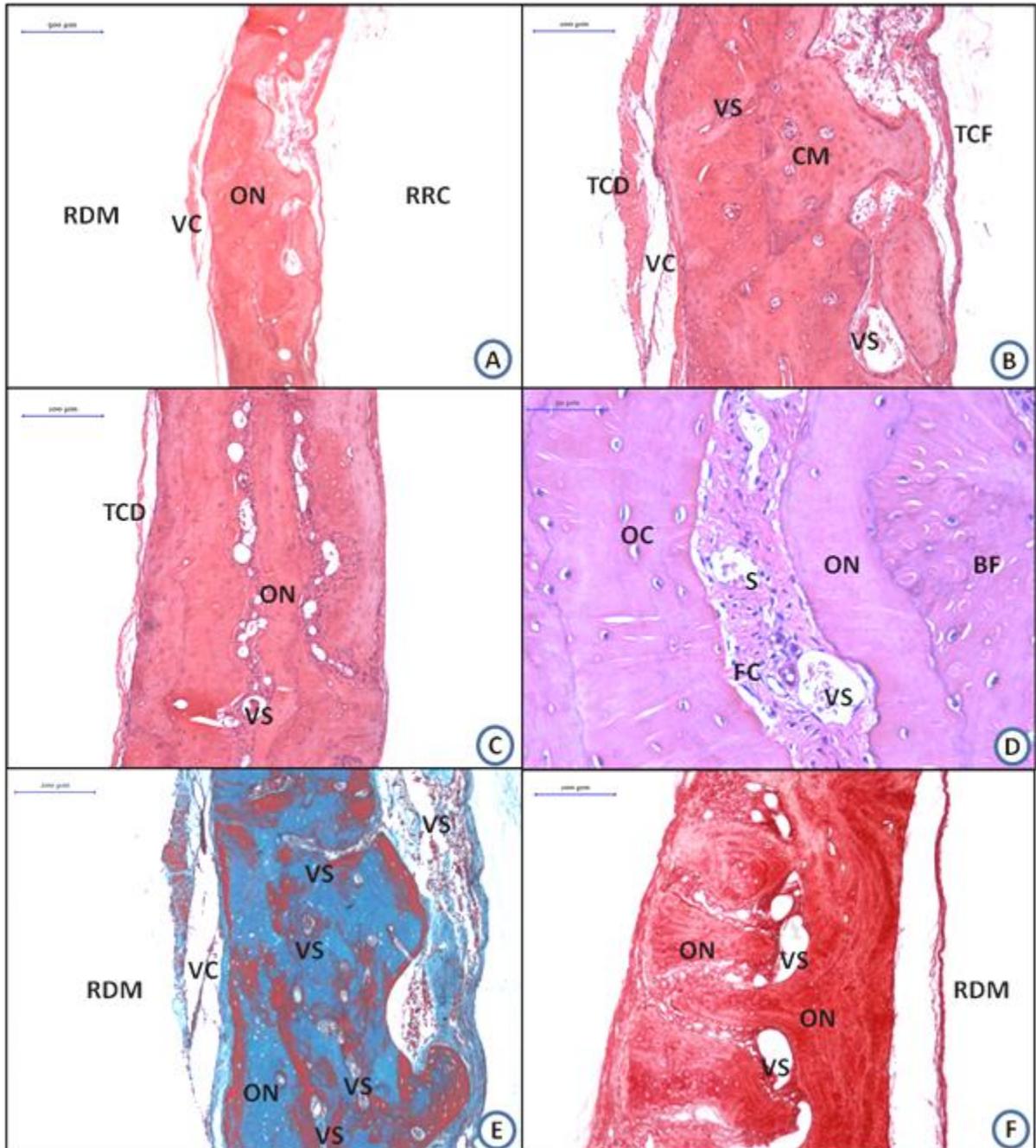
PRANCHA 3 - Fotomicrografias do GGel -15 dias. Na região da borda óssea, em **(A)**, tecido mineralizado cortical (TM) e área de medula óssea (MO); tecido conjuntivo fibroso (TCD) na região do retalho cutâneo (RRC) e sutura (S) constituída por fibras colágenas; seio sagital (VC), em PIFIG. Barra: 500 µm. Na região central do defeito, em **(B)**, os canais medulares (CM) circundados por tecido mineralizado (TOC), a sutura (S); próximo à região central do defeito e ao seio sagital (VC), em PIFIG. Barra: 500 µm. Em maior aumento, em região próxima à borda óssea, em **(C)**, tecido mineralizado (TOC), canais medulares (CM), vasos sanguíneos (VS), em HE. Barra: 200 µm. Na região da borda óssea, em **(D)**, sutura (S), constituída por fibras colágenas e bem vascularizada por vasos sanguíneos (VS); osso neoformado (ON), próximo à borda óssea remanescente (OR). No osso remanescente, muitos osteócitos (OC) e as linhas de deposição cíclica de matriz, as lamelas ósseas (L); em HE. Barra: 50 µm. Na região central e profunda do defeito na região da dura máter (RDM), em **(E)**, observa-se tecido conjuntivo fibroso rico em fibras colágenas e bem vascularizado com vasos sanguíneos (VS) e tecido mineralizado (TM) mais organizado com osteócitos (OC); matriz osteoide (MT) e, englobada a esta matriz, os fragmentos de biomaterial (BM), em HE. Barra: 50 µm. Em **(F)**, osso medular (OE), osteócitos ativos (OC), canais medulares (CM), em HE. Barra: 50 µm.



PRANCHA 4 - Fotomicrografias do GGel – 15 dias em maior aumento e 45 dias. Nos cortes histológicos A, B, C e D, **aos 15 dias**, observa-se, em (A), anais medulares (CM) em corte longitudinal e transversal, osteócitos (OC), matriz osteoide (MT) com fragmentos do biomaterial (BM) englobados, em HE. Barra: 50 μ m. Na região próxima à borda óssea, em (B), osso remanescente da borda (OR), tecido conjuntivo frouxo (TCF), bem vascularizado por vasos sanguíneos (VS) e matriz osteoide (MT) em PIFIG. Barra: 50 μ m. O biomaterial pode ser observado em C e D. Em (C), matriz osteoide (MT) com fragmentos do biomaterial (BM), núcleos de mineralização (NM), e vasos sanguíneos (VS) em TG. Barra: 50 μ m. Em (D), tecido conjuntivo denso (TCD), bem vascularizado e matriz osteoide com partículas do biomaterial em TG. Barra: 50 μ m. Na região da borda óssea, **aos 45 dias**, em (E), osso remanescente (OR) da borda em bisel, tecido ósseo neoformado (ON), em HE. Barra: 200 μ m. E, neste mesmo ponto biológico, em (F), o osso neoformado (ON), rico em colágeno, tem direção centripeta, com maior espessura próximo à borda óssea. Presença de canais medulares (CM) e tecido conjuntivo fibroso (TCF), com fibras colágenas mais organizadas, na região da dura máter (RDM) e tecido conjuntivo frouxo (TCF) na região do retalho cutâneo (RRC), em PIFIG. Barra: 200 μ m.



PRANCHA 5 - Fotomicrografias do GGel - 120 dias. Na região central do defeito, em (A), tecido ósseo neoformado (ON), mais evidente em espessura próximo ao seio sagital (VC) e que preenche em extensão todo o defeito, em HE. Barra: 500 μ m. Em maior aumento, no corte (B), observa-se este tecido mineralizado, circunscrevendo áreas semelhantes a canais medulares (CM) e algumas áreas de tecido conjuntivo frouxo (TCF) bem vascularizado por vasos sanguíneos (VS), em HE. Barra: 200 μ m. Na região central do defeito, em (C), observa-se a deposição de tecido mineralizado ósseo neoformado (ON) e áreas semelhantes a suturas constituídas por tecido fibroso vascularizado, em HE. Barra: 200 μ m. Em maior aumento, observa-se, em (D), a região de sutura (S) bem vascularizada por vasos sanguíneos (VS); Biomaterial (BF) englobado no tecido mineralizado do osso neoformado (ON) com inúmeros osteócitos ativos (OC), em HE. Barra: 50 μ m. No corte histológico, em (E), observa-se tecido ósseo neoformado (ON) na região central do defeito; em vermelho, as áreas com maior mineralização e numerosos vasos sanguíneos (VS) em TG. Barra: 200 μ m. Nas demais áreas do defeito, em (F), o osso cortical neoformado (ON) apresenta-se com lamelas mais organizadas na região próxima à dura mãe (RDM), em PIFG. Barra: 200 μ m.



5.2.4 CH – Colágeno hidrolisado

O tecido mineralizado, aos 15 dias, era reparativo com direção centrípeta, com extensão de um quarto a dois terços e espessura progressivamente menor em direção centro do defeito (Prancha 6A e B; Prancha 7A e B). A neoformação foi heterogênea aos 45 dias, com reparação restrita às bordas em dois animais. Em um dos animais, além de reparativa em bordas, havia matriz osteoide localizada focalmente na região central do defeito. E nos demais animais (três) o preenchimento era de dois terços do defeito (Prancha 7C, D, E e F). Este tecido preenchia de dois a três terços do defeito, aos 120 dias, com espessura de um a dois terços, quando comparado à espessura da borda óssea remanescente (Prancha 8E, F, G e H).

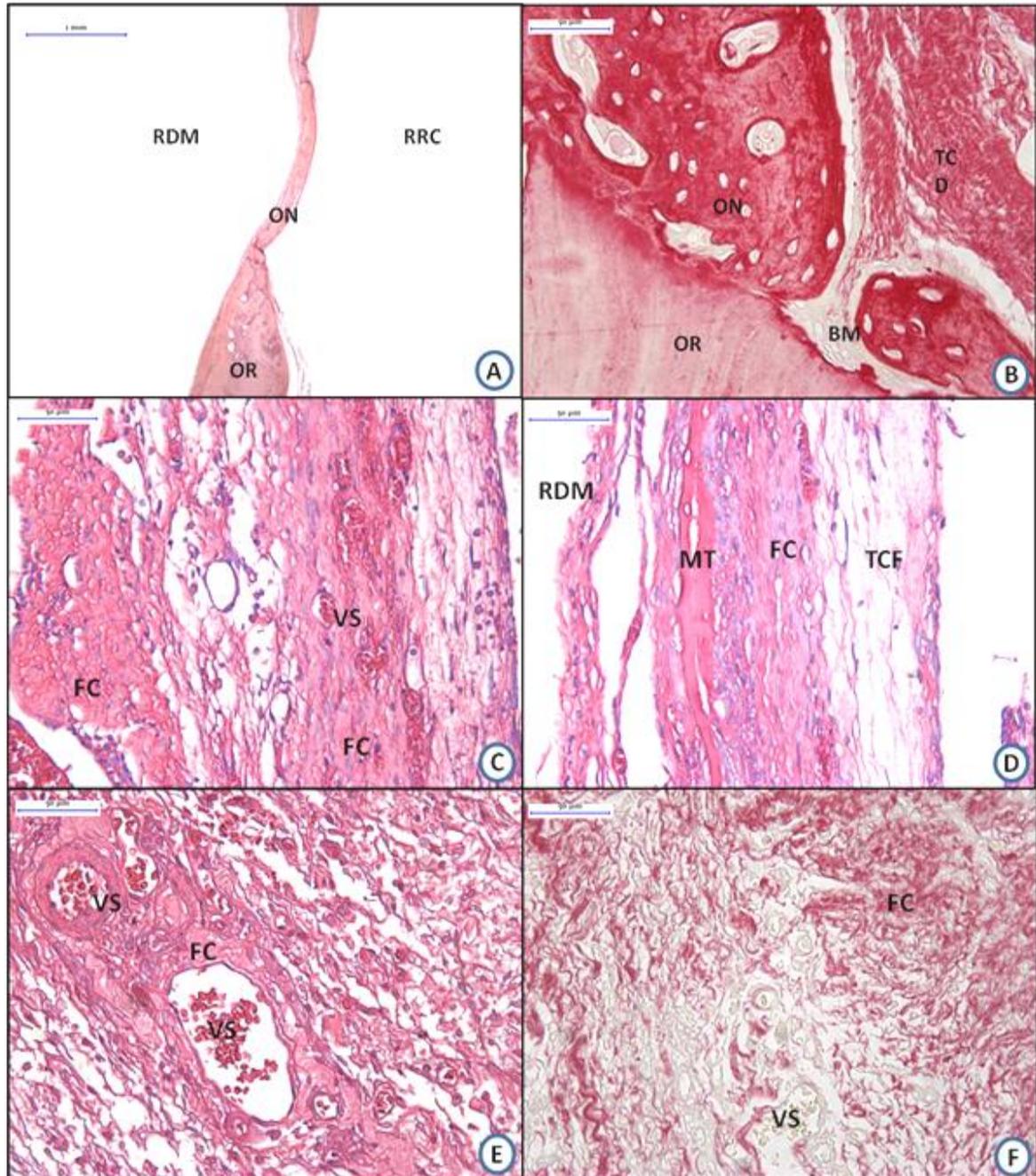
O biomaterial foi incorporado ao tecido neoformado, não sendo possível identificá-lo na maioria das lâminas para as colorações utilizadas. Entretanto, na prancha 8A e B foi interpretado como sendo o biomaterial.

O tecido conjuntivo era fibroso, com abundantes células fusiformes e fibras colágenas na região da dura máter, aos 15 dias e, em maior espessura, quando comparado ao GSDC (Prancha 6B, C, D, E e F). Nos demais pontos biológicos, esse tecido era fibroso e estava com maior espessura, quando comparado com o ponto biológico de 15 dias (Prancha 7E; Prancha 8A, B e C). O tecido fibroso apresentava-se, aos 120 dias, com espessura de três a quatro vezes a espessura do grupo controle nesse mesmo ponto biológico (Prancha 8F). Na região do retalho cutâneo, o tecido conjuntivo apresentava-se frouxo.

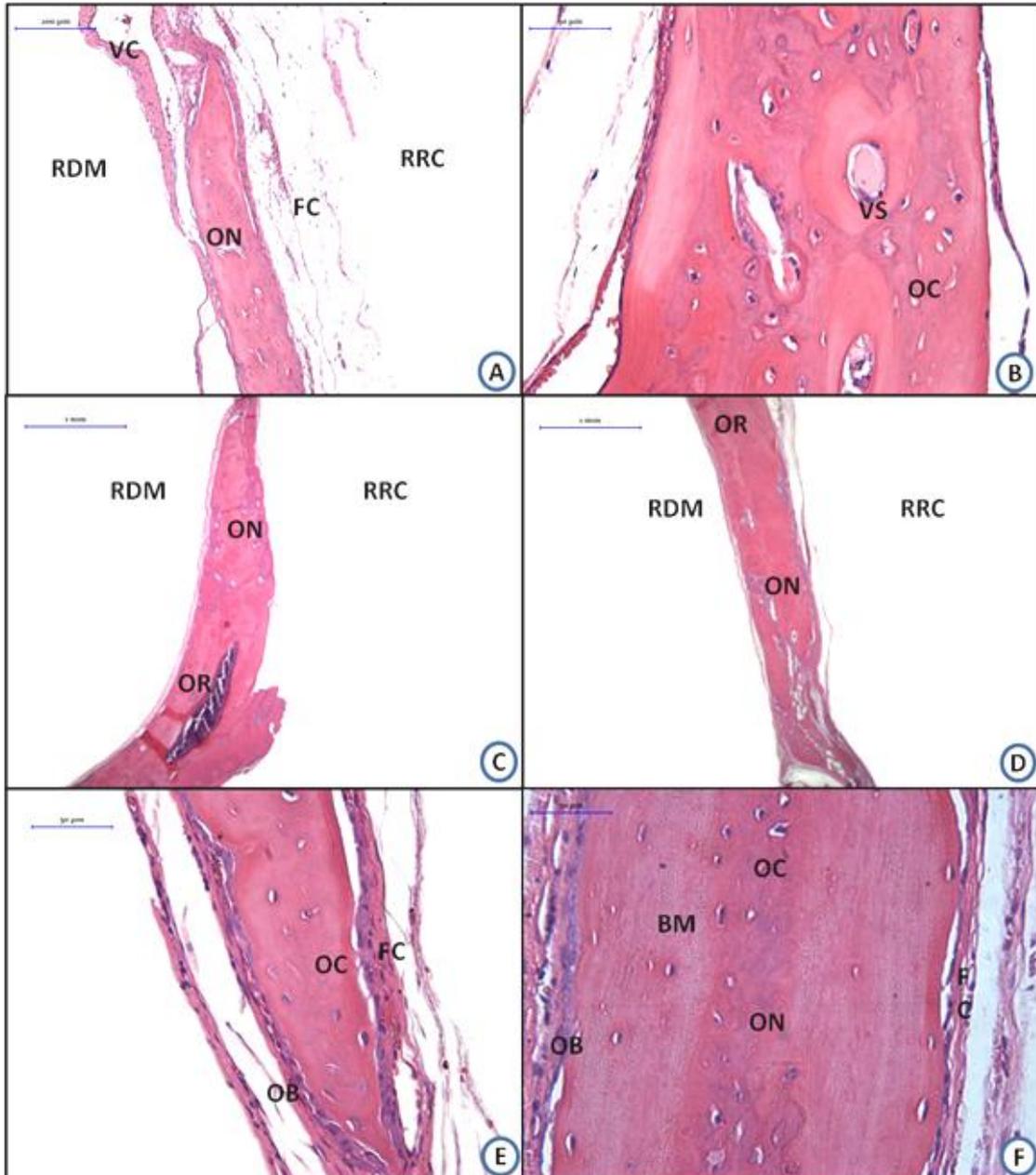
A reação inflamatória era inconspícua aos 15 dias, não sendo observada nos demais pontos biológicos, aos 45 e 120 dias.

A neoformação e proliferação vascular foram observadas aos 15 dias (Prancha 6C, E e F) e, nos demais pontos biológico, a vascularização era estável (Prancha 8B e C)

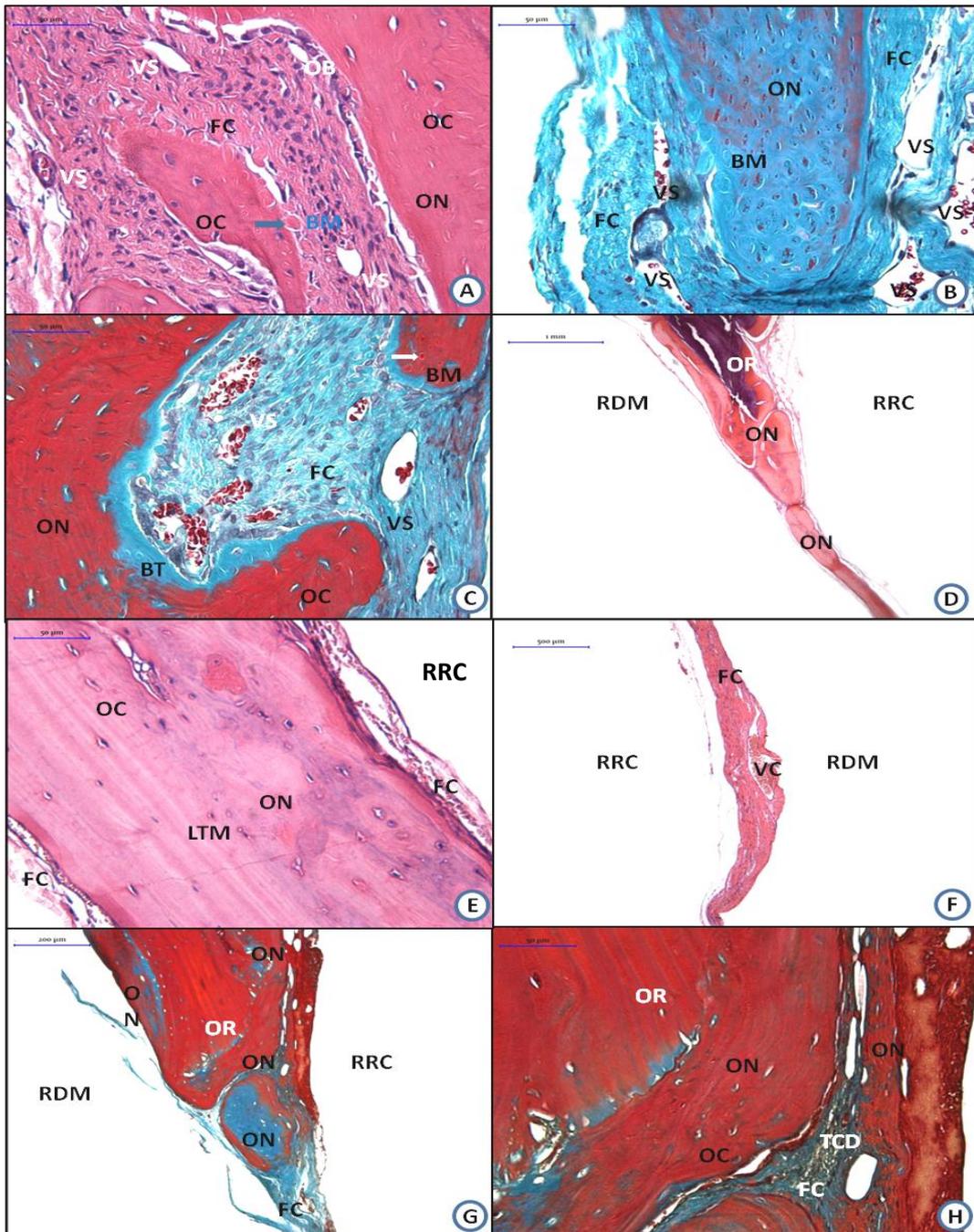
PRANCHA 6 - Fotomicrografias do GCH - 15 dias. No corte histológico, em (A), observa-se a borda óssea com tecido ósseo remanescente (OR) e as demais regiões do defeito preenchidas por delgado tecido mineralizado (ON) em HE. Barra: 1 mm. Em maior aumento, em (B), a borda óssea com a linha de corte e, em vermelho, destaca-se osso neoformado (ON) menos mineralizado, rico em colágeno e bem vascularizado. O tecido conjuntivo apresenta-se fibroso e também rico em fibras colágenas, coradas em verde claro, possivelmente eram vestígios do biomaterial, em PIFIG. Barra: 50 µm. Em (C), tecido conjuntivo mais espesso com presença de numerosos capilares, fibroblastos ativos e fibra de colágeno, em HE. Barra: 50 µm. Em (D), na região central do defeito, a presença de matriz osteoide (MT) depositada na região próxima à dura máter (RDM), fibras colágenas com disposição mais organizada, paralelas entre si e tecido conjuntivo frouxo (TCF) na região voltada para o retalho cutâneo, HE. Barra: 50 µm. No corte, em (E), observa-se um tecido conjuntivo rico em fibras colágenas pouco organizadas e numerosos vasos, tais como capilares, arteríolas e vênulas (VS), em HE. Barra: 50 µm. Em (F), observa-se a disposição irregular das fibras colágenas (em vermelho) e outras fibras não identificadas (em verde) em PIFIG. Barra: 50 µm.



PRANCHA 7 - Fotomicrografias do GCH - 15 e 45 dias. Na região central do defeito, **aos 15 dias**, em A e B, sendo que, em (A), observa-se que o tecido mineralizado neoformado (ON) tem direção centripeta e preenche o defeito até próximo à região do seio sagital (VC), em HE. Barra: 200 μ m. Em maior aumento, em (B), é possível observar numerosos osteócitos ativos englobados na matriz osteoide e diversos vasos sanguíneos (VS), em HE. Barra: 50 μ m. Os cortes C, D, E e F representam este grupo **aos 45 dias**. Na região da borda óssea, em (C), o tecido mineralizado do osso reparacional (ON) apresenta-se mais estável em HE. Barra: 1 mm. Na região central do defeito, em (D), observa-se que o tecido mineralizado do osso reparacional (ON) tem direção centripeta, porém, não fecha o defeito na região próxima ao seio sagital (VC) e, nesta região, apresenta-se em menor espessura, quando comparada à região da borda óssea, em HE. Barra: 1 mm. Em maior aumento, em (E), observa-se a matriz osteoide, com presença de numerosos osteócitos englobados e, na periferia desta matriz, observa-se osteoblastos ativos enfileirados, em HE. Barra: 50 μ m. No mesmo ponto biológico, em (F), observa-se tecido mineralizado e possivelmente fragmentos do biomaterial englobados a este tecido neoformado, em HE. Barra: 50 μ m.



PRANCHA 8 - Fotomicrografias do GCH - 45 e 120 dias. Os cortes A, B e C representam este grupo **aos 45 dias**. Em (A), o tecido ósseo neoformado (ON) com osteócitos englobados à matriz e, na periferia, os osteoblastos; tecido conjuntivo fibroso rico em células fusiformes e fibras colágenas (FC), em HE. Barra: 50 μ m. Em (B), a matriz osteoide do osso neoformado (ON) com núcleos de mineralização (em vermelho) nas partículas do biomaterial (BM), em TG. Barra: 50 μ m. Em (C), tecido mineralizado do osso reparacional (ON) da borda óssea, com osteócitos e no tecido conjuntivo com fibras colágenas e fibroblastos ativos; numerosos vasos com hemácias coradas de vermelho, em TG. Barra: 50 μ m. Os cortes D, E, F, G e H representam o ponto biológico **aos 120 dias**. Em (D), observa-se a borda óssea remanescente (OR) e osso neoformado (ON), este em menor espessura e grande extensão do defeito, em HE. Barra: 1 mm. Em maior aumento, em (E), tecido mineralizado estável com presença de osteócitos (OC) e lamelas de deposição (LTM), em HE. Barra: 50 μ m. Na região central do defeito, em (F), observa-se que o tecido conjuntivo fibroso em maior espessura, com presença de fibras colágenas (FC), em HE. Barra: 500 μ m. Na região da borda óssea, em (G), observa-se uma reparação óssea estável (ON), em TG. Barra: 200 μ m. Em maior aumento: (H) Na borda óssea, com osteócitos (OC) englobados na matriz óssea neoformada (ON) e fibras colágenas do tecido conjuntivo, em TG. Barra: 50 μ m.



5.2.5 GHAAI_g - Hidroxiapatita e alginato

A neoformação óssea reparativa restrita às bordas ósseas, aos 15 dias, foi mais evidente na região próxima à dura máter, com presença de poucos osteoblastos e osteócitos ativos (Prancha 9A e B). Nessas bordas ósseas, aos 45 dias, o tecido mineralizado exibiu deposição concêntrica em torno de capilares sanguíneos, com presença de osteócitos ativos. Na maioria dos animais, nesse ponto biológico, a matriz osteoide preencheu aproximadamente um terço de cada lado do defeito a partir das bordas em direção centrípeta. A espessura era decrescente até próximo à área central e, nessa área, tinha um quinto da espessura das bordas ósseas remanescentes. Observou-se matriz osteoide por entre os diminutos fragmentos do biomaterial próximos à borda (Prancha 9H). E, focalmente na região próxima ao seio sagital e a dura máter, essa matriz osteoide circundou os fragmentos do biomaterial. O tecido mineralizado, aos 120 dias, ocupou de dois terços à totalidade da extensão do defeito, com espessura maior próxima às bordas, com discreto adelgaçamento na região central próxima ao seio sagital. Em algumas áreas próximas à região da dura-máter, a deposição de matriz osteoide mostrava-se com formato irregular. Em outras áreas, houve deposição em lamelas concêntricas de tecido mineralizado que circundaram os diminutos fragmentos do biomaterial e também havia osteoblastos ativos na periferia (Prancha 10).

A região do defeito crítico, aos 15 dias, estava preenchida em espessura por três a quatro camadas de esferas fragmentadas e ocupava toda a sua extensão. Os múltiplos fragmentos diminutos puderam ser identificados em regiões mais superficiais na área do defeito, e áreas esféricas, circundadas por tecido conjuntivo denso, correspondentes às esferas fragmentadas, eram vistas mais próximas à dura máter (Prancha 9B e C). Aos 45 dias, o biomaterial estava ainda mais microparticulado e, de permeio, alguns locais com matriz osteoide e/ou tecido conjuntivo frouxo (Prancha 9G e H). Os diminutos fragmentos, aos 120 dias, estavam englobados no tecido mineralizado (Prancha 10).

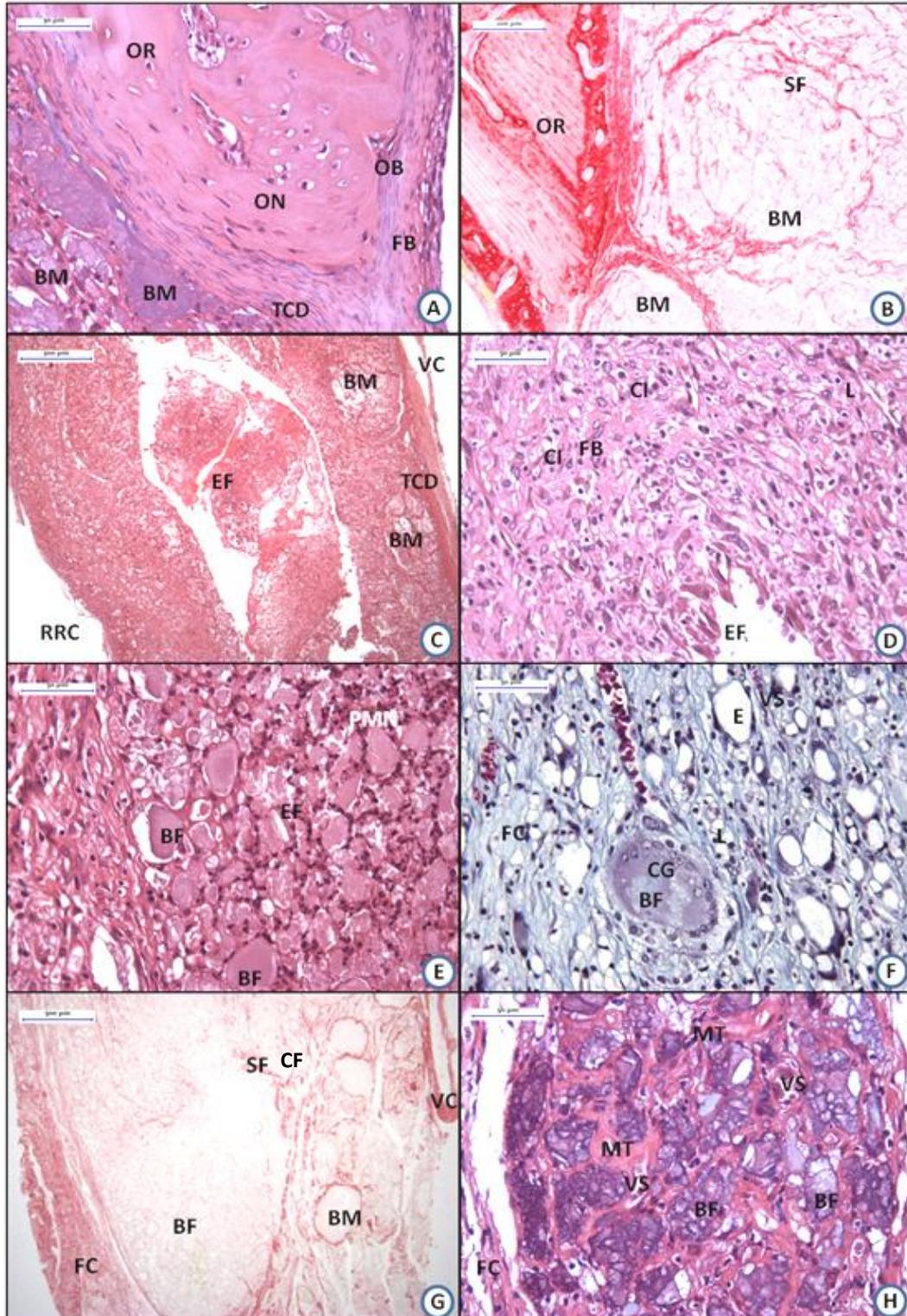
Na área próxima ao retalho 15 dias, foi observado um tecido conjuntivo edemaciado, rico de células fusiformes em proliferação, células gigantes e macrófagos (Prancha 9F). Na área próxima à dura-máter, havia fibrose. As fibras de colágeno estavam mais adensadas e organizadas paralelamente, com proliferação de fibroblastos e maior organização do tecido de granulação. Em outras áreas mais

profundas, essa fibrose apresentava-se mais espessa, circunscrevendo os fragmentos e com pequenos septos em direção centrípeta no interior das esferas fragmentadas (Prancha 9B e E). Na região central próxima ao abscesso e nas áreas próximas ao retalho cutâneo, o tecido conjuntivo estava frouxo (Prancha 9C). Em algumas regiões, aos 45 dias, o tecido conjuntivo estava frouxo e edemaciado, com feixe de fibras colágenas e presença de fibroblastos. Porém, próximo à dura máter, o tecido conjuntivo estava mais adensado e espesso em torno das esferas fragmentadas, formando uma cápsula fibrosa com presença de delgados septos fibrosos em direção centrípeta (Prancha 9G). Havia tecido conjuntivo denso, aos 120 dias, rico em fibras colágenas entre os fragmentos do biomaterial e tecido conjuntivo frouxo na área do retalho cutâneo (Prancha 10A, B, C e D).

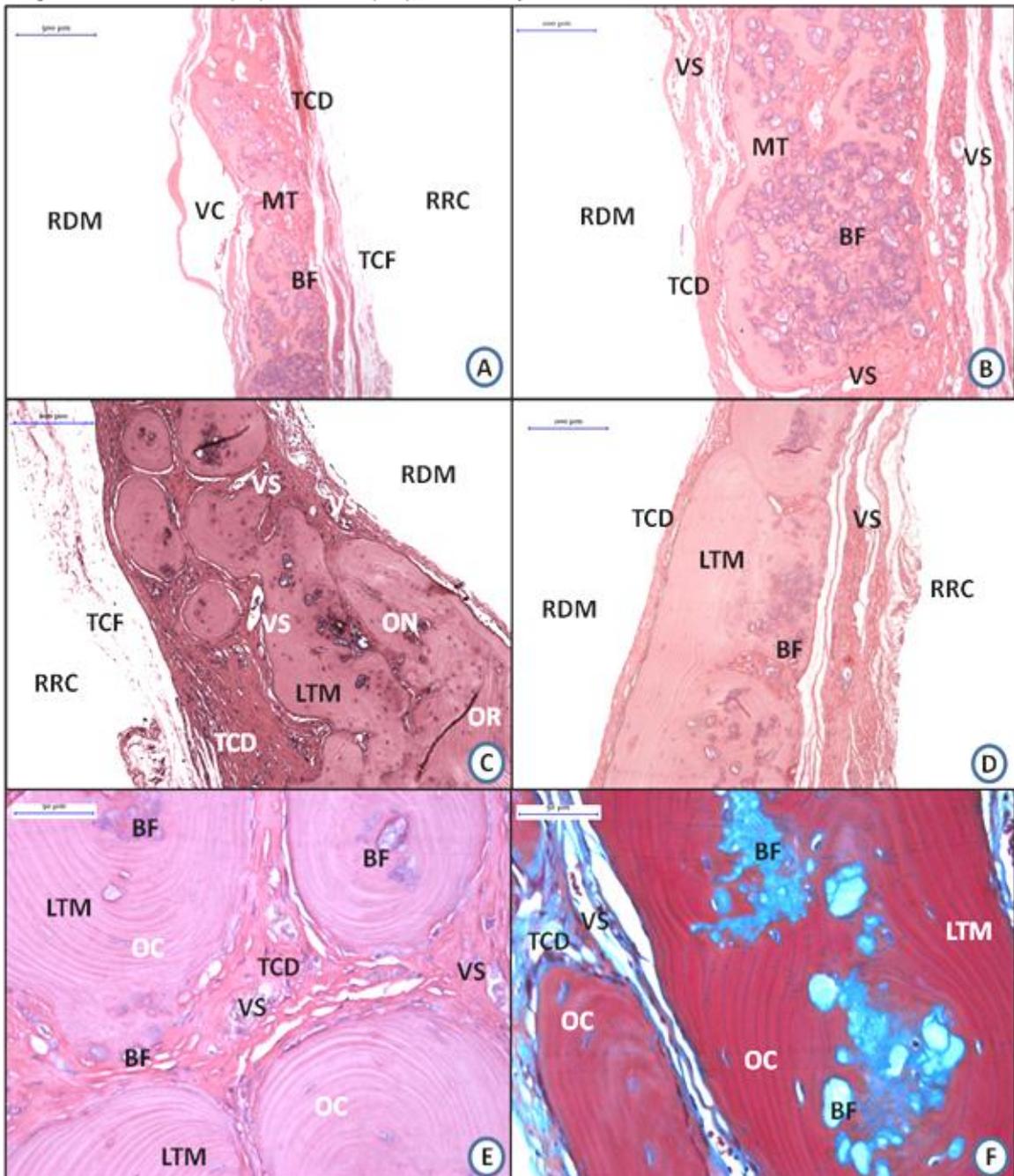
A intensa reação inflamatória granulomatosa crônica, aos 15 dias, com presença de células mononucleares – linfócitos, células gigantes – estava na região próxima à borda óssea de permeio aos fragmentos do biomaterial. E, em algumas áreas do defeito havia inflamação aguda, com presença dos polimorfonucleares. Na região periférica (próximo à borda óssea) houve proliferação de células fusiformes (fibroblastos) e fibras colágenas. Na região central do defeito, mais próximo à região do retalho, havia exsudato fibrinoleucocitário e numerosas células da inflamação aguda (polimorfonucleares) (Prancha 9D, E e F). A reação inflamatória crônica granulomatosa era mais extensa aos 45 dias, com presença de numerosas células gigantes multinucleares, macrófagos, com áreas de calcificação distrófica e alguns grupos de linfócitos esparsamente distribuídos. Essa inflamação, aos 120 dias, era discreta e escassa, com acúmulos focais de linfócitos na região próxima à dura máter e à borda óssea.

Nas áreas mais profundas, próximo à dura máter, aos 15 dias, havia um tecido de granulação organizado e com inúmeros capilares sanguíneos em toda a extensão do defeito. Não se percebeu, nos demais pontos biológicos, uma neoformação vascular, porém, havia a presença de vasos capilares sanguíneos estáveis.

PRANCHA 9 - Fotomicrografias do GHAAlg - 15 e 45 dias. Os cortes A, B, C D, E e F são aos 15 dias. Na borda óssea, em (A), osso remanescente (OR), osso neoformado (ON) com osteoblastos ativos (OB), tecido conjuntivo denso (TCD) com fibroblastos (FB), em HE. Barra: 50 μ m. (B) Septos fibrosos (SF) de colágeno circundam o biomaterial (BM), em PIFIG. Barra: 200 μ m. Na região central do defeito, o tecido conjuntivo apresenta, em (C), exsudato fibrinoleucocitário (EF) e áreas de tecido conjuntivo denso (TCD); áreas esféricas com biomaterial fragmentado (BF), em HE. Barra: 500 μ m. Em maior aumento na região central, em (D), células inflamatórias (CI) do exsudato, em HE. Barra: 50 μ m. Em (E), exsudato fibrino-leucocitário (EF) com presença de polimorfonucleares (PMN); cápsula de tecido conjuntivo denso (C) e biomaterial (BM) com septos de tecido conjuntivo de permeio, em HE. Barra: 50 μ m. Em (F), células gigantes (CG), edema (E), vasos sanguíneos (VS), fibras colágenas (FC) e linfócitos (L), em TG. Barra: 50 μ m. Os cortes G e H são aos 45 dias. Na região central do defeito, em (G), esferas (BM) mais íntegras, próximas à dura máter e o seio sagital (VC) e mais fragmentado (BF) próximo ao retalho cutâneo; cápsula (CF) de fibras colágenas e septos fibrosos (SF); fibras colágenas adensadas (FC) na região do retalho cutâneo, em PIFIG, Barra: 500 μ m. Em maior aumento e próximo à borda, em (H), biomaterial fragmentado (BF) onde se observa, nos fragmentos da HA nanoestruturada, partículas menores; de permeio ao biomaterial, a matriz osteoide (MO) e numerosos vasos sanguíneos (VS), em HE. Barra: 50 μ m.



PRANCHA 10 - Fotomicrografias do GHAAIlg - 120 dias. Na região central do defeito, em (A), biomaterial fragmentado (BF) e englobado na matriz osteoide (MT) com extensão até o seio sagital (VC); tecido conjuntivo denso (TCD) encapsulando o tecido mineralizado e mais externamente tecido conjuntivo frouxo (TCF) próximo ao retalho cutâneo (RRC), em HE. Barra: 500 µm. Em maior aumento, na mesma região, em (B), biomaterial fragmentado (BF); matriz osteoide (MT) e, na periferia, tecido conjuntivo fibroso organizado com numerosos vasos sanguíneos (VS) estáveis, em HE. Barra: 200 µm. Em outro corte histológico, em (C), observa-se lamelas de tecido mineralizado (LTM) de osso neoformado (ON) circunscritas aos fragmento de biomaterial (BF); tecido conjuntivo fibroso (TCD) denso de permeio ao tecido mineralizado e tecido conjuntivo frouxo (TCF) próximo ao retalho cutâneo (RRC), em HE. Barra: 200 µm. Em (D), os fragmentos de biomaterial (BF) na região próxima ao retalho cutâneo (RRC) com tecido mineralizado depositadas por osteocondução, circunscrevendo essas partículas e, na região próxima à dura máter (RDM), as lamelas encontram-se mais organizadas paralelas entre si e não se observa mais a presença dos fragmentos do biomaterial, em HE. Barra: 200 µm. Em maior aumento, em (E), observa-se os fragmentos de biomaterial (BF) englobada ao tecido mineralizado neoformado estável. Este tecido mineralizado apresenta as lamelas de deposição (LTM) e, de permeio, observa-se tecido conjuntivo denso (TCD) com vasos sanguíneos (VS) e fibras colágenas, em HE. Barra: 50 µm. Em outra coloração, destaca-se, em (F), os fragmentos de biomaterial (BF), corados em azul, e o osso neoformado, em vermelho, com suas linhas de deposição (LTM) e osteócitos (OC). em TG. Barra: 50 µm.



5.2.6 GRanSr – Ranelato de estrôncio

Nas bordas ósseas, aos 15 dias, a matriz osteoide reparativa neoformada, com diversos osteócitos e osteoblastos muito exuberantes e ativos, apresentava ocupação linear centrípeta e abrangia, aproximadamente, dois terços do defeito. Nas outras regiões do defeito, houve também neoformação de matriz osteoide adjacente à dura-máter, em direção centrípeta, em maior espessura, quando localizada próximo à borda óssea remanescente (Prancha 11A, B, C e D). As mesmas características foram observadas aos 45 dias, porém, o tecido mineralizado da borda óssea apresentava-se com uma redução progressiva na atividade dos osteoblastos e presença de osteócitos (Prancha 11E e F).

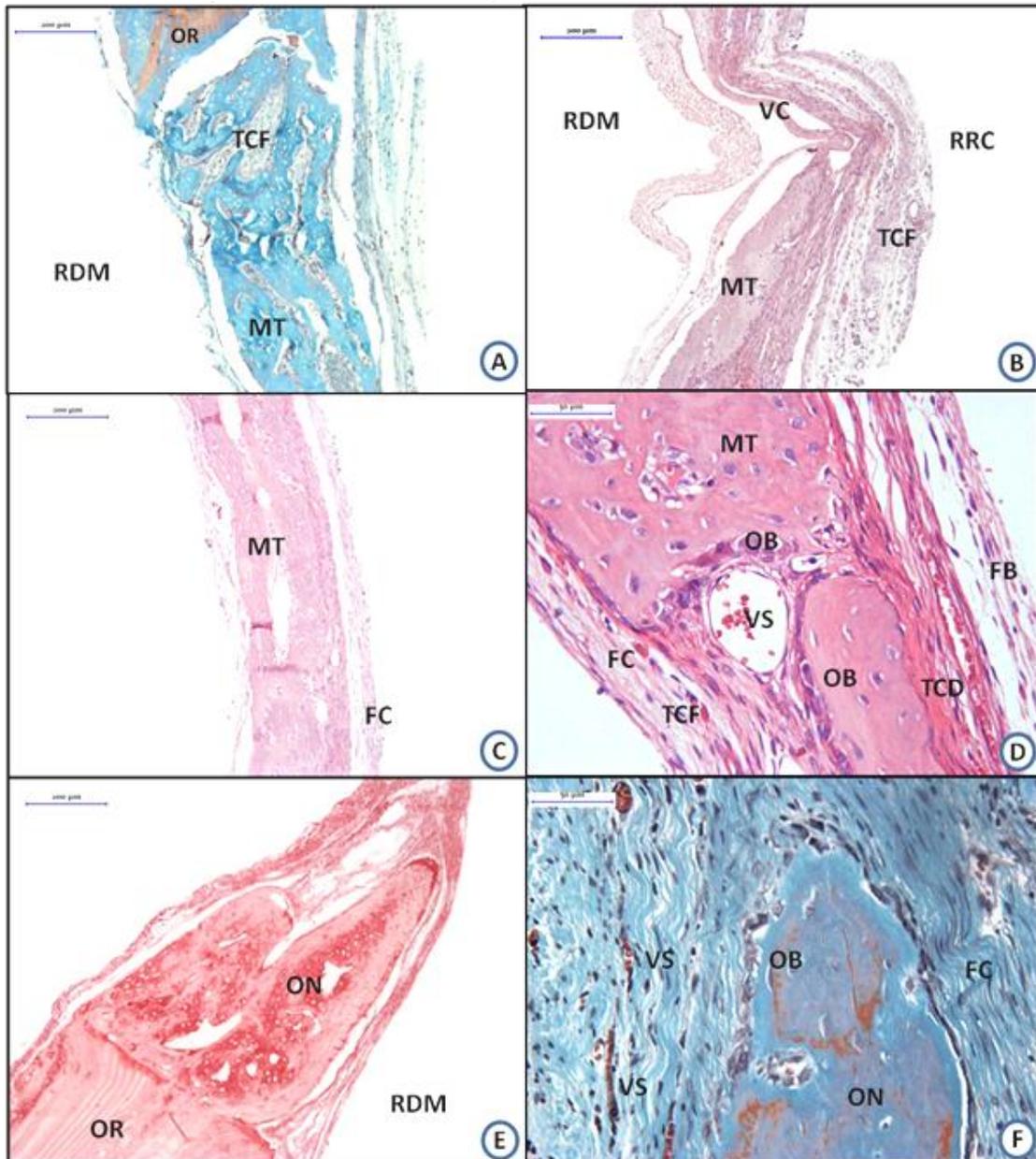
Essa matriz osteoide, aos 120 dias, encontrava-se mais estável, em fase avançada de maturação, com direção centrípeta e adelgaçando-se com espessura de dois terços, próximo à borda óssea, e de aproximadamente um terço na região central do defeito. Neste ponto biológico, a matriz osteoide ocupou quase toda a extensão do defeito, exceto na região central, onde se observou, na maioria dos animais, uma delgada camada de tecido conjuntivo denso. Este tecido conjuntivo ocupou aproximadamente um quinto da extensão linear do defeito, provavelmente correspondente à região da sutura sagital (Prancha 12B e D).

O tecido conjuntivo denso, aos 15 dias, estava 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. Foi observado edema em regiões mais próximas ao tegumento, o que conferiu, nesses sítios, aspecto de tecido conjuntivo denso mais frouxo, com ocupação das fibras colágenas de maneira mais espaçada e menos organizada (Prancha 11A, B, C e D). Já aos 45 e 120 dias, observou-se tecido conjuntivo denso mais organizado na região do defeito, com suas fibras colágenas orientadas paralelamente em relação ao longo eixo do defeito ósseo e fibroblastos mais fusiformes. O tecido conjuntivo estava frouxo na região do retalho cutâneo e, na região da dura-máter, apresentava-se denso e mais (Prancha 11E; Prancha 12D e F).

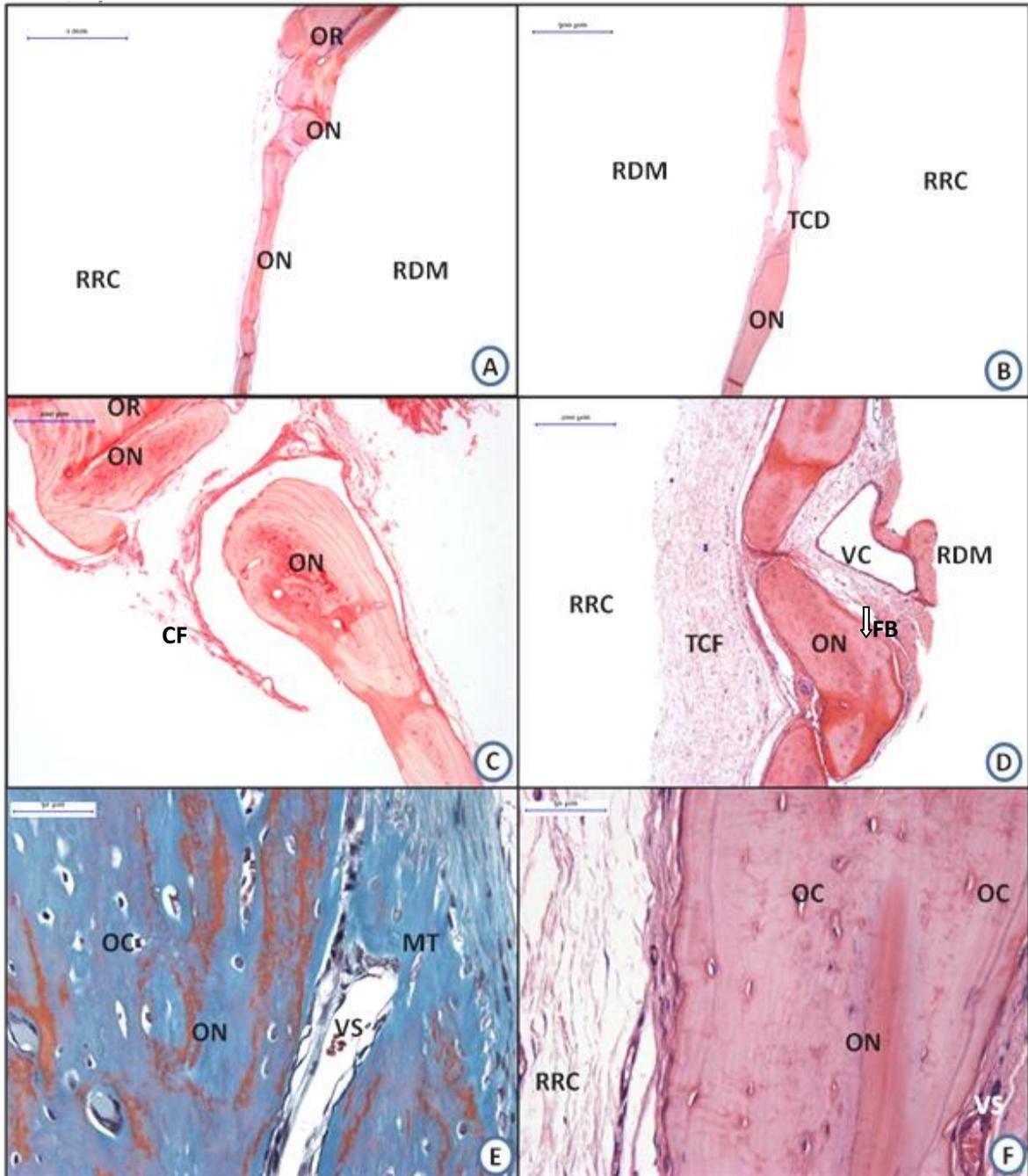
A neoformação vascular disorganizadocreta, aos 15 dias (Prancha 11D) e nos pontos biológicos de 45 e 120 dias, havia vasos sanguíneos estáveis com células endoteliais quiescentes e ausência de angiogênese.

Um discreto infiltrado inflamatório mononuclear difuso estava presente, aos 15 dias, com redução progressiva ao longo do tempo nos demais pontos biológicos.

PRANCHA 11 - Fotomicrografias do GRanSr - 15 e 45 dias. Os cortes A, B, C e D são aos 15 dias. Na região da borda óssea, em (A), observa-se o osso remanescente (OR), matriz osteoide (MT) e tecido conjuntivo fibroso, em TG. Barra: 200 µm. Na região central do defeito, em (B), a matriz osteoide (MO) se estende até o centro do defeito próximo ao seio sagital (VC); tecido conjuntivo frouxo (TCF) na região do retalho cutâneo (RRC), em HE. Barra: 200 µm. Em (C), região central do defeito com matriz osteoide (MT), em HE. Barra: 200 µm. Em (D), tecido conjuntivo frouxo (TCF) e denso (TCD), com fibras colágenas (FC) e fibroblastos (FB), em HE. Barra: 50 µm. Nos cortes E e F, aos 45 dias: Em (E), borda óssea, tecido mineralizado (ON) e fibras colágenas (FC), em PIFIG. Barra: 200 µm. Em (F), osso neoformado (ON) com osteoblastos, tecido conjuntivo denso (TCD) com numerosos vasos sanguíneos (VS), 45 dias, em TG. Barra: 50 µm.



PRANCHA 12 - Fotomicrografias do GRanSr - 120 dias. No corte (A), observa-se a borda óssea e em extensão, preenchendo o defeito e tecido mineralizado (TM), em HE. Barra: 1 mm. Em (B), osso neoformado (ON) na região central do defeito e tecido conjuntivo denso (TCD), em HE. Barra: 500 µm. Em maior aumento, em (C), a borda óssea e uma cápsula fibrosa de tecido conjuntivo (CF) entre o osso reparativo da borda e o osso neoformado nas demais áreas do defeito, em HE. Barra: 200 µm. Em (D), na região central do defeito, o osso neoformado (ON) e tecido conjuntivo frouxo (TCF), em HE. Barra: 200 µm. O tecido ósseo apresentava-se estável em (E), com osteócitos aprisionados na matriz osteoide (MT), áreas mais mineralizadas da matriz, em vermelho, e vasos sanguíneos (VS), em TG. Barra: 50 µm. Em (F), osteócitos (OC) e seus prolongamentos, aos 120 dias em HE. Barra: 50 µm.



5.2.7 GHAAIlgRanSr - HAAIlg e Ranelato de estrôncio

A formação óssea, aos 15 dias, estava restrita às bordas do defeito (Prancha 13A, C e D; Prancha 14E), sendo que aos 45 dias, a formação óssea tinha espessura semelhante à espessura da borda óssea (Prancha 14F) e matriz osteoide foi observada de permeio aos fragmentos do biomaterial (Prancha 15A, B, C e D). Nessa região, aos 120 dias, a formação óssea reparativa era estável. Na região do defeito, apenas aos 120 dias, observou-se matriz osteoide com formação focal ou próxima à borda óssea e na região da dura-máter, mais escassamente, circundando e de permeio ao biomaterial (Prancha 16C, D, E e F; Prancha 17A, B, C e F).

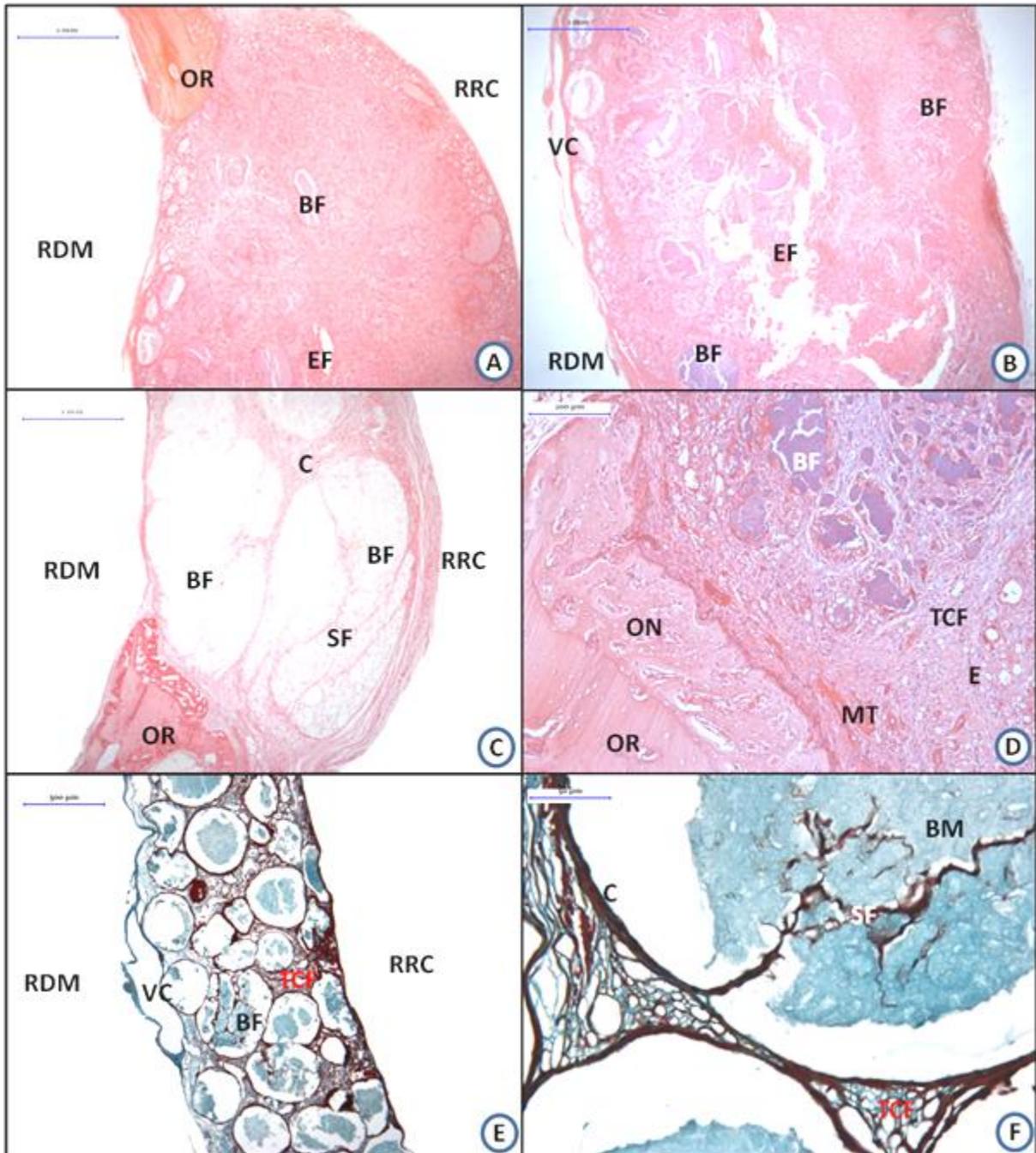
O biomaterial, aos 15 dias, ocupava uma área de reparo do defeito equivalente, pelo menos, a duas vezes a espessura da calvária. O biomaterial encontrava-se distribuído em toda a extensão do defeito, muito fragmentado em tamanhos diminutos sendo possível visualizar poucas esferas. Na região central do defeito, próximo à dura-máter e ao seio sagital, o biomaterial está mais fragmentado, apresentando cápsulas de tecido conjuntivo denso e finos septos fibrosos com direção centrípeta, porém, foi possível identificar áreas correspondentes às esferas fragmentadas (Prancha 13; Prancha 14A, B, C e D). O biomaterial, aos 45 dias, ocupava, na área reparativa do defeito, uma espessura que correspondia de duas a duas vezes e meia a espessura da borda óssea; apresentava-se ainda mais fragmentado do que no ponto biológico anterior (Prancha 15B, C e D). Os fragmentos do biomaterial, aos 120 dias, estavam encapsulados com ausência de septos de fibras colágenas (Prancha 16D, E e F).

O estroma na área do defeito, aos 15 dias, estava representado por tecido conjuntivo frouxo (Prancha 13), e aos 45 dias, denso, de permeio aos fragmentos do biomaterial, com células fusiformes e fibras colágenas (Prancha 15C, E e F). Na região da dura-máter, próximo ao seio sagital, aos 45 dias, as fibras colágenas estavam mais adensadas e organizadas, distribuídas paralelamente entre si e disformes nas outras áreas do defeito (Prancha 14F). O estroma também apresentava septos fibrosos mais espessos e mais organizados de permeio aos fragmentos do biomaterial; há células fusiformes mesenquimais e fibroblastos (Prancha 16A e B). Aos 120 dias, o tecido conjuntivo estava mais denso, organizado e próximo às bordas; na área reparativa, algumas áreas de fibrose mais densa (Prancha 17).

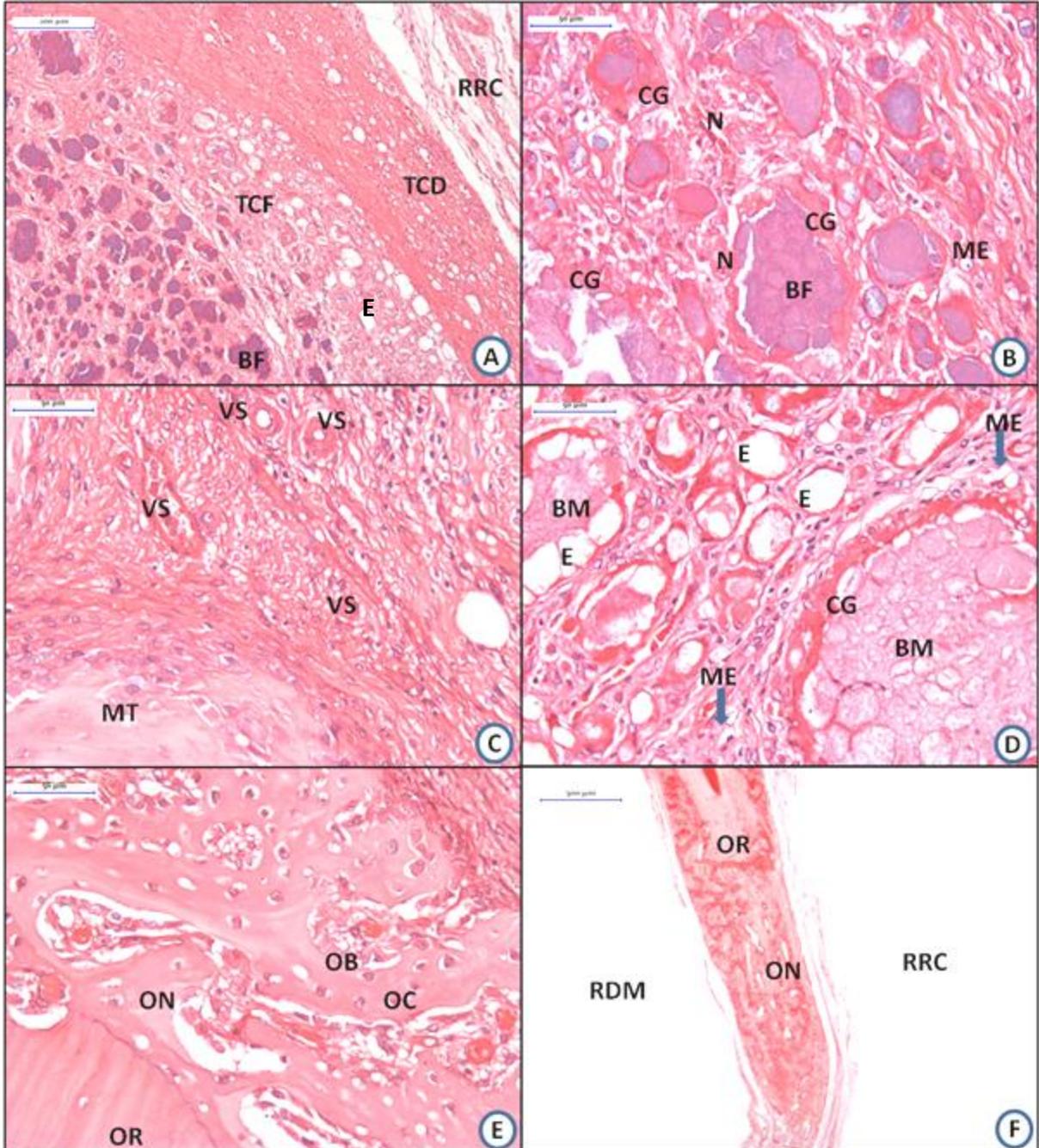
Aos 15 dias, houve a presença de uma extensa área de inflamação crônica granulomatosa, com presença de células gigantes e, focalmente, macrófagos. Ocasionalmente, observou-se grandes macrófagos com aspecto espumoso, (citoplasma claro). Em alguns animais, foi observado um exsudado fibrinoleucocitário em toda a extensão do defeito, na área mais superficial do defeito próximo ao retalho cutâneo. Inflamação aguda focal, com presença de neutrófilos, eosinófilos e polimorfonucleares, na região central do defeito próximo ao seio sagital e inflamação crônica granulomatosa difusa. De permeio aos fragmentos do biomaterial, havia células fusiformes às vezes já diferenciadas em fibroblastos com discreta produção de fibras colágenas (Prancha 13B; Prancha 14B e D). No ponto biológico de 45 dias, a reação inflamatória crônica granulomatosa estava mais discreta e em menor intensidade aos 120 dias, com presença de macrófagos espumosos e menor quantidade de células gigantes. Essa reação granulomatosa foi observada na região próxima ao seio sagital e, mais superficialmente, na região próxima ao retalho (Prancha 15E e F; Prancha 16A e B).

A neoformação vascular de capilares sanguíneos mais conspícuos, aos 15 dias, foi observada na região da borda óssea, e numerosos vasos sanguíneos na região central próxima ao seio sagital (Prancha 14C). Aos 45 dias e 120 dias, não houve neovascularização, porém, um maior número de vasos sanguíneos estáveis pôde ser observado, especialmente próximo às bordas ósseas. Septos de tecido conjuntivo com capilares sanguíneos foram observados no biomaterial fragmentado, aos 120 dias, em alguns animais (Prancha 17).

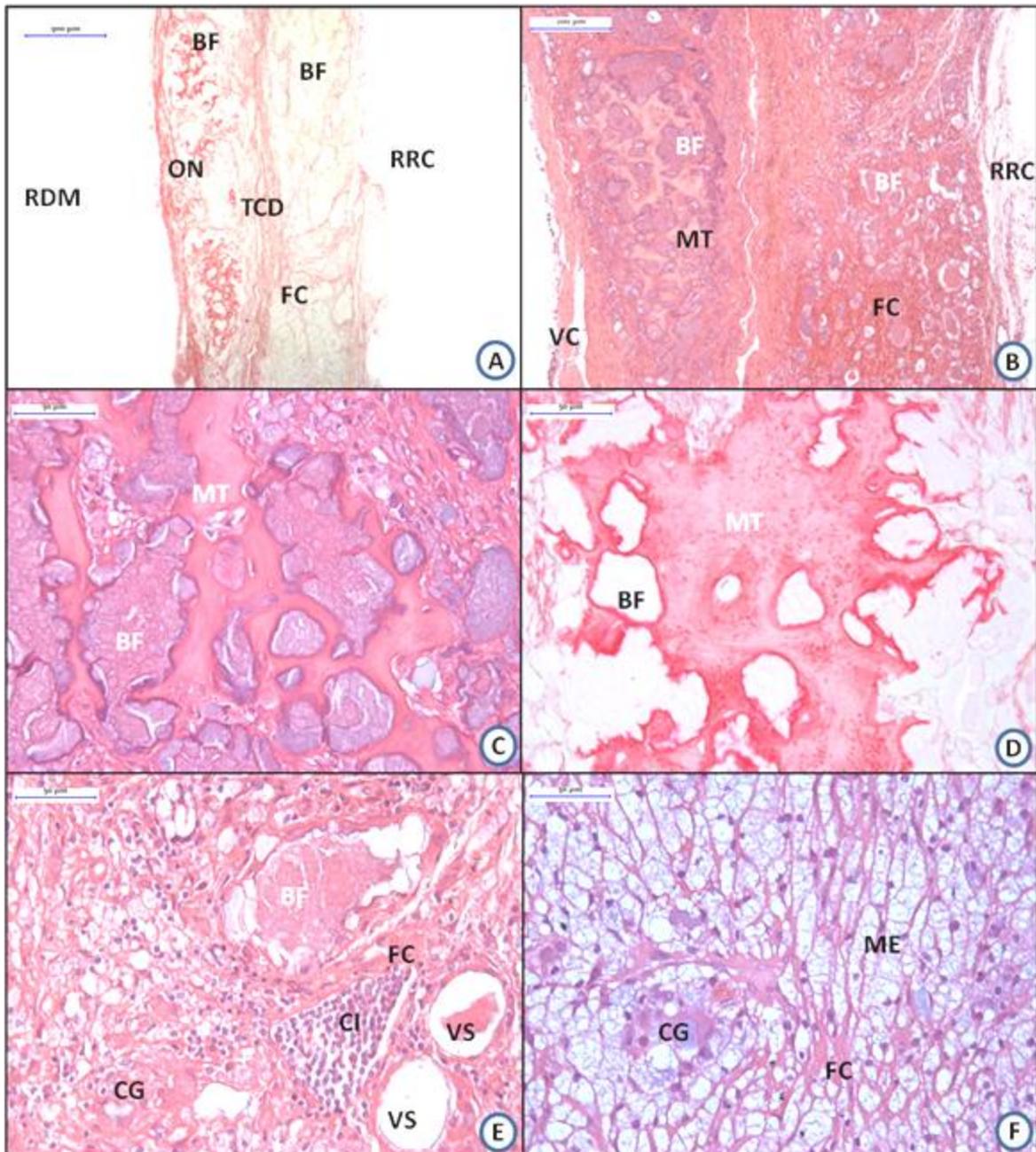
PRANCHA 13 - Fotomicrografias do GHAAIlgRanSr – 15 dias. No corte, em (A), observa-se a borda óssea (OR), com pouca ou nenhuma neoformação, e as demais regiões, preenchidas por áreas de tecido conjuntivo denso (TCD) e frouxo (TCF); exsudato fibrino-leucocitário (EF), em HE. Barra: 1 mm. Na região central do defeito, em (B), extensa área com exsudato fibrino-leucocitário (EF); esferas do biomaterial (BF) mais íntegras próximas à dura máter e ao seio sagital (VC), e mais fragmentadas próximas ao retalho cutâneo (RRC), em HE. Barra: 1 mm. Em (C), observa-se cápsula de tecido conjuntivo (C) e septos fibrosos (SF) entre os fragmentos do biomaterial (BF) e tecido ósseo reparativo nas bordas (ON), em PIFIG. Barra: 1 mm. Em maior aumento na região da borda óssea, em (D), com fragmentos de hidroxiapatita (BF) e pequenas áreas de deposição de matriz osteoide (MT) entre os fragmentos; o tecido conjuntivo frouxo (TCF) constituído por fibras colágenas (FC) e áreas de edema (E), em HE. Barra: 200 µm. Em um único animal, as esferas apresentavam-se mais íntegras e não havia exsudato. Em (E), observam-se as esferas do biomaterial (BF) envoltas por uma cápsula de tecido conjuntivo denso (C) de fibras colágenas (FC) e septos fibrosos (SF), em TG. Barra: 500 µm. Neste mesmo corte em maior aumento, em (F), o tecido conjuntivo frouxo (TCF) de permeio às esferas fragmentadas, com áreas de edema (E) e, dentro das microesferas, os septos fibroso em direção centrípeta em TG. Barra: 50 µm.



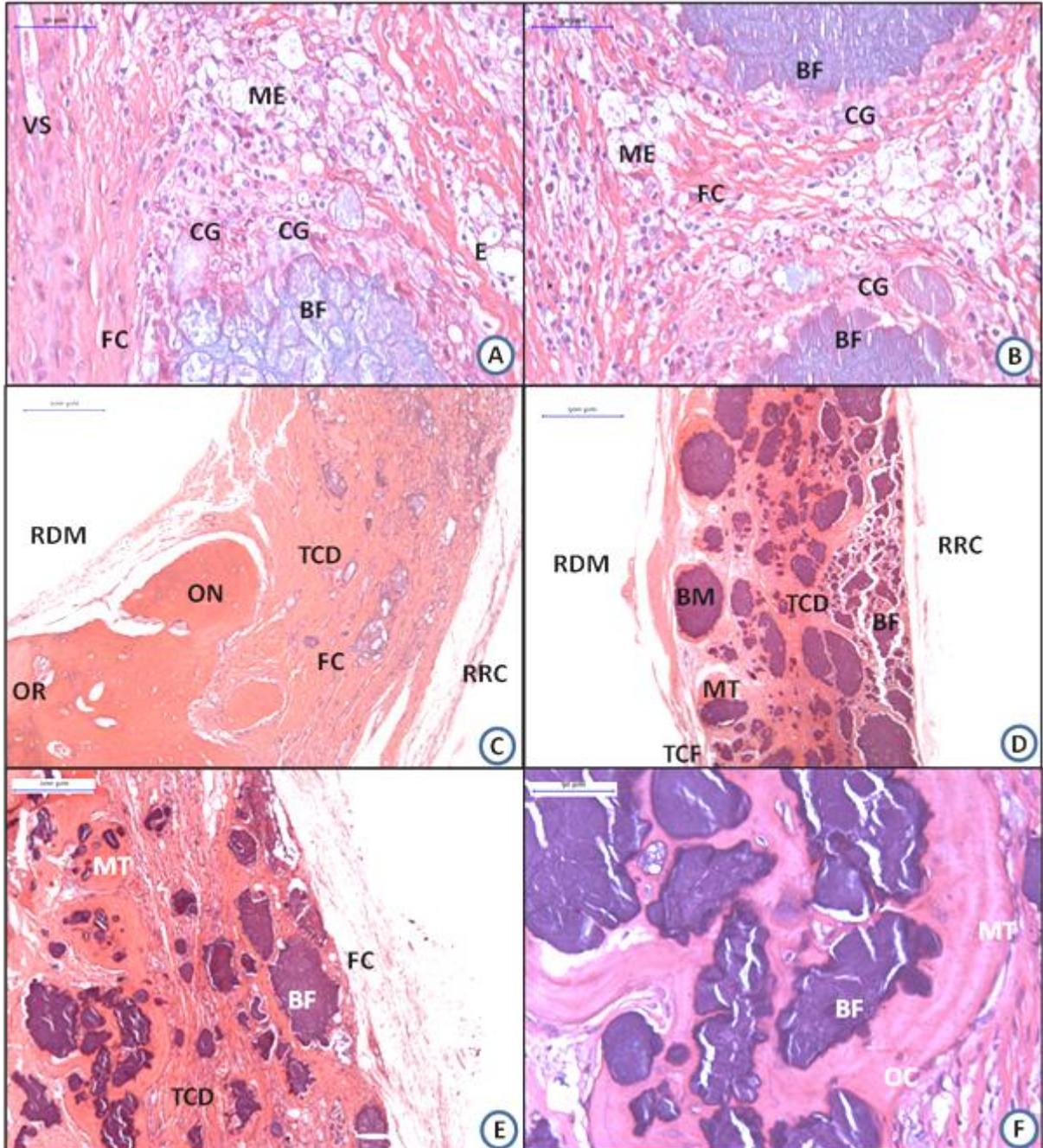
PRANCHA 14 - Fotomicrografias do GHAAI_gRanSr - 15 e 45 dias. Os cortes A, B, C D e E são **aos 15 dias**. Em maior aumento, em (A), tecido conjuntivo frouxo na região próxima ao retalho cutâneo (RRC), a cápsula de tecido conjuntivo denso (TCD) e, mais próximo aos fragmentos, áreas de edema (E) no tecido conjuntivo frouxo (TCF), em HE. Barra: 200 μ m. Em (B), fragmentos de HA em diferentes tamanhos (BF), e em torno destes, células gigantes (CG); no tecido conjuntivo, macrófagos espumosos (ME), neutrófilos(N) e fibras colágenas (FC) com presença de células fusiformes, em HE. Barra: 50 μ m. Próximo à borda óssea, em (C), observa-se numerosos vasos sanguíneos (VS) e matriz osteoide (MT) e osteoblastos ativos, em HE. Barra: 50 μ m. Em (D), fragmentos do biomaterial (BF), sendo fagocitados por células gigantes (CG) e macrófagos espumosos (ME); o tecido conjuntivo frouxo (TCF) com áreas de edema (E), em HE. Barra: 50 μ m. Na região da borda óssea, em (E), osso remanescente (OR), osso neoformado (ON) e, na sua matriz, inúmeros osteócitos (OC), em HE. Barra: 50 μ m. Na borda óssea, **aos 45 dias**, em (F), osso neoformado (ON) em espessura semelhante à da borda e direção centrípeta, em PIFIG. Barra: 500 μ m.



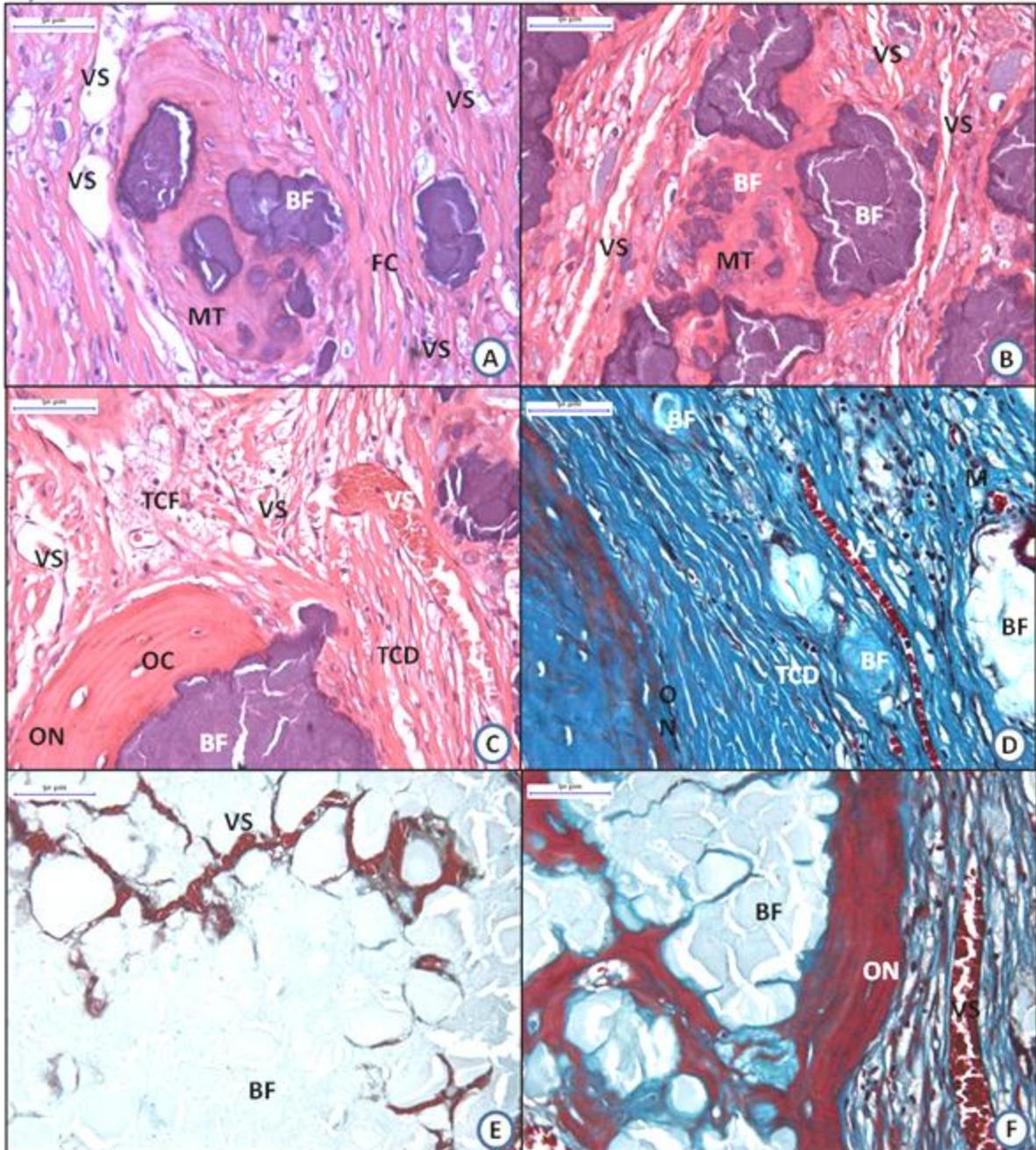
PRANCHA 15 - Fotomicrografias do GHAAIlgRanSr - 45 dias. Na região mais profunda e próximo ao centro do defeito, em **(A)**, osso neoformado (ON) de permeio aos fragmentos do biomaterial (BF); na região mais superficial, o biomaterial (BF) está encapsulado por uma cápsula de tecido conjuntivo denso (TCD) de fibras colágenas (FC), com formação de septos entre os fragmentos do biomaterial, em PIFIG. Barra: 500 µm. Em maior aumento, em **(B)**, matriz osteoide (MT) de permeio aos fragmentos de HA (BF); e em algumas áreas próximo ao retalho cutâneo (RCC), esses fragmentos são permeados por fibras colágenas (FC) aos em HE. Barra: 200 µm. O biomaterial, em **(C)**, fragmentado em diversos tamanhos (BF) e de permeio à matriz osteoide (MT), em HE. Barra: 50 µm. Em **(D)**, de modo mais evidente, a matriz osteoide (MT) rica em colágeno, em PIFIG. Barra: 50 µm. Áreas de inflamação aguda (IA), em **(E)**, com células inflamatórias (CI), linfócitos (L), fragmentos de HA (BF), em HE. Barra: 50 µm. Áreas de inflamação crônica (IC), em **(F)**, com macrófagos espumosos (ME) e células gigantes (CG) permeadas por um arcabouço de fibras colágenas (FC), em HE. Barra: 50 µm.



PRANCHA 16 - Fotomicrografias do GHAAlgRanSr - 45 e 120 dias. Os cortes A e B são aos 45 dias. Em (A), fragmentos do biomaterial (BF) sendo fagocitados por macrófagos espumosos (ME) e células gigantes (CG); de permeio, fibras colágenas adensadas (FC) e vasos sanguíneos (VS); em HE. Barra: 50 μ m. Em (B), é possível identificar a direção das fibras colágenas entre o biomaterial e de permeio numerosos macrófagos espumosos (ME), em HE. Barra: 50 μ m. Os cortes C, D, E e F são aos 120 dias. Na região da borda óssea, em (C), osso reparativo neoformado (ON) e nas demais regiões do defeito, tecido conjuntivo denso (TCD) constituído por fibras colágenas (FC) e ainda observam-se fragmentos do biomaterial (BF), em HE. Barra: 200 μ m. Na região central do defeito, em (D), esferas do biomaterial (BM) mais íntegras, próximas à região da dura mãe (RDM) e mais fragmentadas na região do retalho cutâneo (RRC); pouca matriz osteoide (MO) circundando (BF) e, de permeio, fibras colágenas (FC), em HE. Barra: 500 μ m. Em maior aumento, em áreas próximas à dura mãe, em (E), matriz osteoide (MT) que circunda os fragmentos do biomaterial (BF); tecido conjuntivo fibroso (TCF) de permeio, em HE. Barra: 200 μ m. Em (F), matriz osteoide (MT) com osteócitos (OC) e os fragmentos de hidroxiapatita nanoestruturada (BF), em HE. Barra: 50 μ m.



PRANCHA 17- Fotomicrografias do GHAAI_gRanSr - 120 dias. Em (A), degradação do biomaterial fragmentado (BF) com incorporação à matriz osteoide (MT) e, de permeio, tecido conjuntivo denso (TCD) bem vascularizado por vasos sanguíneos (VS) em HE. Barra: 50 µm. Em (B), o biomaterial fragmentado (BF) em algumas áreas em tamanhos diminutos e também é possível notar partículas em tamanhos menores compondo parte da esfera fragmentada; matriz osteoide (MO) e vasos sanguíneos (VS), em HE. Barra: 50 µm. O tecido conjuntivo frouxo (TCF), em (C), na região próxima à dura máter; aposição de osso neoformado (ON) com osteócitos (OC) na superfície dos fragmentos do biomaterial (BF) e cápsula de tecido conjuntivo denso (TCD), em HE. Barra: 50 µm. Na borda óssea, em (D), fragmentos de hidroxiapatita nanoestruturada (BF); fibras colágenas (FC) do tecido conjuntivo fibroso (TCD) com áreas de edema (E) e vasos estáveis (VS), em TG, Obj. 40x; Em (E), vasos sanguíneos de permeio ao biomaterial fragmentado (BF) na RRC, em TG, Barra: 50 µm. Em (F), fragmentos da esfera de hidroxiapatita (BF) e, de permeio, tecido mineralizado neoformado (ON) reparativo estável; Fibras colágenas (FC) e vasos sanguíneos compõem o tecido conjuntivo fibroso (TCD) que encapsula áreas que contém esses fragmentos, em TG. Barra: 50 µm.



5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA – HISTOMORFOMETRIA

Nas tabelas abaixo estão destacadas as maiores médias (em verde) e as menores médias (em vermelho) entre os grupos experimentais avaliados para as respectivas variáveis morfométricas: extensão linear do defeito (EL) na tabela 6, extensão linear de matriz osteoide (ELO) na tabela 7, área seccional total de preenchimento do defeito (AT) na tabela 8, área seccional da matriz osteoide (AO) na tabela 9, percentagem de ELO comparado a EL (%ELO) na tabela 10, percentagem de AO, comparado à AT (%AO) na tabela 11 e espessura no centro do defeito sem incluir o seio sagital (C) na tabela 11. Nestas tabelas é possível identificar as médias e desvio padrão por grupo e por tempo biológico e a média global (grupo e tempo) nas respectivas variáveis analisadas.

Tabela 6 - Distribuição das médias e desvios padrão (Dp) de EL de acordo com os grupos no tempo

Morfometria EL(μm)							
Tempo	CCDC	Gel	CH	HAAIg	RanSr	HAAIgRanSr	Total grupo
(dias)	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias
	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP
15	6734.04	7386.08	6760.42	7301.68	7164.40	7861.38	7240.23
	902.19	1136.05	390.89	725.88	589.35	642.54	825.66
45	7150.98	7590.52	6819.39	7169.64	7520.43	7834.83	7391.76
	402.95	818.03	838.62	869.00	321.57	423.53	666.60
120	7203.93	7177.52	6937.67	7137.18	8114.24	7817.66	7377.56
	1053.96	420.19	736.91	1142.40	348.17	308.62	818.11
Total	7047.04	7384.71	6857.07	7202.83	7599.69	7837.76	7338.98
Tempo	803.28	811.44	628.42	875.38	572.61	442.28	767.65

HAAIgRanSr > RanSr > Gel > HAAIg > CH

Tabela 7 - Distribuição das médias e desvios padrão (Dp) de ELO de acordo com os grupos no tempo

Morfometria ELO(μm)							
Tempo	CCDC	Gel	CH	HAAIg	RanSr	HAAIgRanSr	Total grupo
(dias)	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias
	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP
15	704.39	5714.49	4983.09	1773.42	2743.81	674.53	2683.01
	133.96	3091.87	999.55	1352.75	3230.14	590.88	2741.05
45	556.68	3235.64	4330.38	2252.29	3162.04	2646.34	2529.60
	203.62	2410.10	1791.73	1439.99	1982.47	1161.66	1858.92
120	731.81	5262.18	3967.81	4980.63	5685.57	2581.47	3849.15
	271.26	2345.81	1955.60	1995.61	1632.63	1045.30	2378.68
Total	661.93	4737.44	4343.58	3002.11	3863.81	2009.88	3036.42
Tempo	216.76	2714.53	1601.55	2105.30	2583.55	1303.70	2396.44

Gel > CH > RanSr > HAAIg > HAAIgRanSr

Tabela 8 - Distribuição das médias e desvios padrão (Dp) de AT de acordo com os grupos no tempo

Morfometria AT(μm^2)							
Tempo	CCDC	Gel	CH	HAAIg	RanSr	HAAIgRanSr	Total grupo
(dias)	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias
	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP
15	4626461.17	5350876.00	2588639.53	19475273.46	3861792.60	28001700.53	11305752.90
	1634136.74	2908274.31	665963.57	8149159.03	1621236.03	11478776.14	11231944.00
45	1489181.40	2635496.80	2983461.82	10647052.71	2797867.50	9657120.26	5297275.94
	821178.32	877479.46	1634452.73	5923124.78	1688486.80	2811511.13	4756980.64
120	1898704.11	4667759.36	2338425.30	5323291.92	3538679.79	10740546.68	4679599.73
	855817.17	1359001.37	809819.22	1706080.31	827528.59	3739635.39	3331800.16
Total	2556448.17	4218044.05	2582584.59	11815206.03	3399446.63	15728372.35	6980128.51
Tempo	1742309.51	2159992.09	981498.93	8171440.71	1404890.07	10712102.91	7678284.26

HAAIgRanSr > HAAIg > Gel > RanSr > CH

Tabela 9 - Distribuição das médias e desvios padrão (Dp) de AO de acordo com os grupos no tempo

Morfometria AO(μm^2)							
Tempo	CCDC	Gel	CH	HAAIg	RanSr	HAAIgRanSr	Total grupo
(dias)	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias
	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP
15	238800.79	3409648.49	764023.89	332966.62	661243.45	345046.03	1032440.46
	95245.69	2984188.79	306750.19	193292.74	704921.46	260216.95	1766117.45
45	257823.55	1145217.76	1305270.20	1605845.55	753195.35	1746081.14	1131612.35
	219330.85	585674.72	1049192.96	1664799.81	501008.15	891496.19	1015942.38
120	483382.43	2373251.19	1194551.34	2333908.01	1395699.28	1824480.30	1612633.47
	185391.66	1952446.30	733313.94	1218612.96	442362.94	1028874.21	1242512.61
Total	331837.64	2309372.48	1107330.82	1424240.06	936712.69	1332757.40	1267386.46
Tempo	203502.17	2179070.02	710630.46	1409585.14	619653.51	1019504.85	1376220.58

Gel > HAAIg > HAAIgRanSr > CH > RanSr

Tabela 10 - Distribuição das médias e desvios padrão (Dp) de %ELO de acordo com os grupos no tempo

Morfometria %ELO(%)							
Tempo	CCDC	Gel	CH	HAAIg	RanSr	HAAIgRanSr	Total grupo
(dias)	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias
	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP
15	10.71	73.66	73.39	24.01	35.68	8.28	35.99
	3.00	33.34	11.46	17.50	40.41	6.80	34.60
45	7.75	44.90	63.17	32.85	41.42	34.19	34.84
	2.67	35.73	23.60	22.77	24.85	16.04	26.36
120	9.97	73.08	56.06	68.49	70.49	33.33	51.78
	3.37	31.47	23.62	23.76	22.22	14.19	31.26
Total	9.40	63.88	62.73	41.78	49.20	25.83	41.08
Tempo	3.12	34.42	20.43	28.28	32.14	17.35	31.51

Gel > CH > RanSr > HAAIg > HAAIgRanSr

Tabela 11 - Distribuição das médias e desvios padrão (Dp) de %AO de acordo com os grupos no tempo

Morfometria %AO(%)							
Tempo	CCDC	Gel	CH	HAAIg	RanSr	HAAIgRanSr	Total grupo
(dias)	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias
	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP
15	5.12	52.92	30.62	2.19	17.95	1.64	18.20
	0.34	29.62	14.84	1.57	17.46	1.55	24.58
45	15.15		40.10	13.58	28.68	19.38	25.25
	8.21	11.84	16.78	6.37	14.91	13.37	15.81
120	27.52	45.26	48.44	42.10	42.81	18.09	37.46
	11.73	26.01	10.50	17.24	20.44	10.13	19.19
Total	16.57	46.93	41.30	19.29	29.82	13.43	27.26
Tempo	12.28	22.77	14.30	19.96	19.52	12.46	21.41

Gel > CH > RanSr > HAAIg > HAAIgRanSr

Tabela 12 - Distribuição das médias e desvios padrão (Dp) de C de acordo com os grupos no tempo

Morfometria C(μm)							
Tempo	CCDC	Gel	CH	HAAIg	RanSr	HAAIgRanSr	Total grupo
(dias)	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias	Médias
	DP	DP	DP	DP	DP	DP	DP
15	83.42	377.14	97.47	2908.99	145.58	3338.27	1261.52
	38.32	307.19	73.07	1093.65	39.54	1243.35	1580.40
45	73.12	169.95	175.28	1382.96	115.68	999.65	526.82
	31.99	182.49	138.87	885.98	119.67	689.82	707.70
120	66.57	255.94	118.99	573.33	172.11	1439.88	425.15
	40.05	224.41	96.17	360.70	156.74	400.05	521.36
Total	73.84	267.68	128.47	1621.76	144.46	1868.04	723.51
Tempo	35.17	244.97	98.06	1270.36	110.12	1302.62	1079.38

HAAIgRanSr > HAAIg > Gel > CH > RanSr

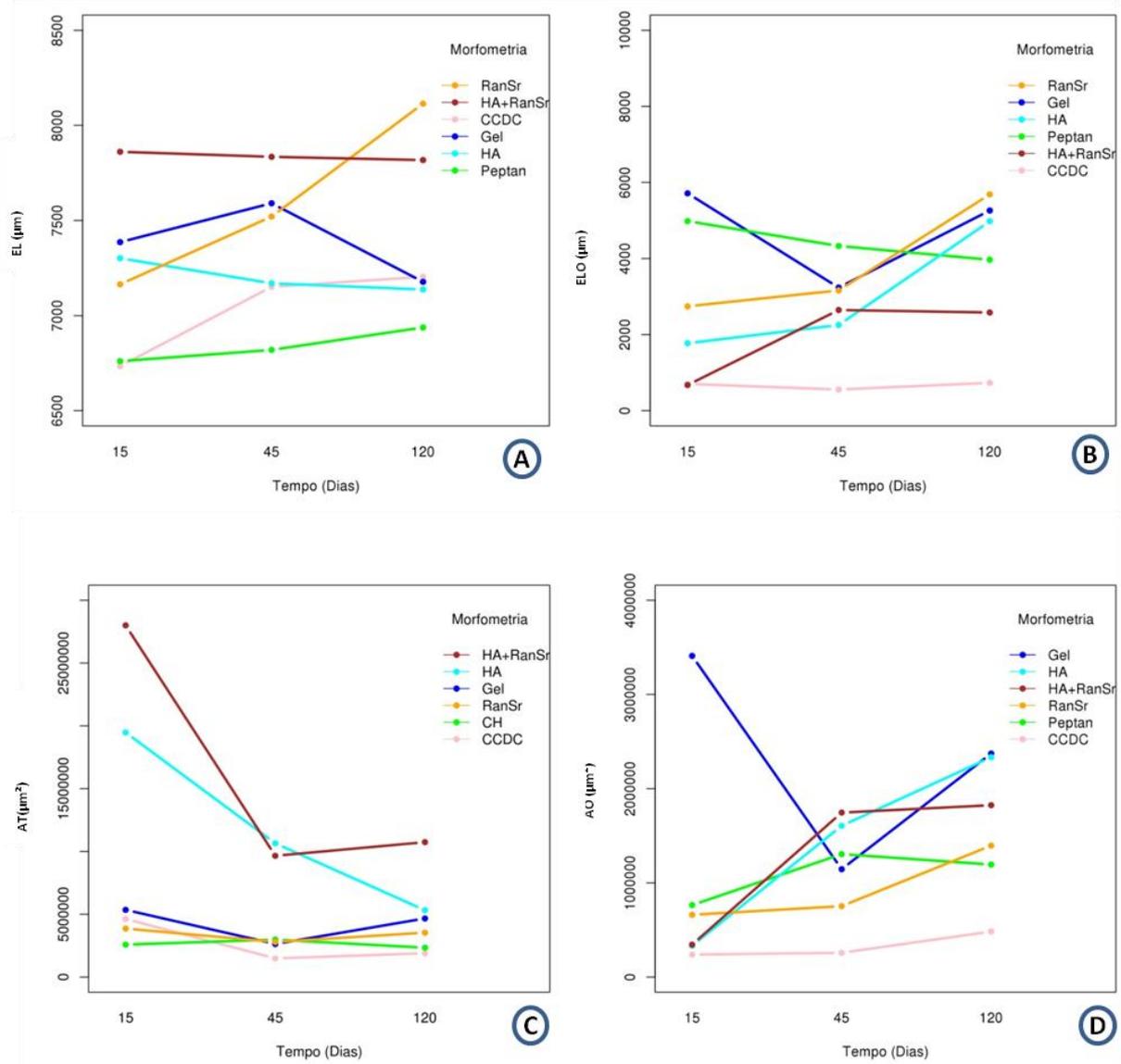
As porcentagens calculadas (%ELO e %AO) possibilitaram uma melhor avaliação do ganho clínico real após a implantação dos biomateriais.

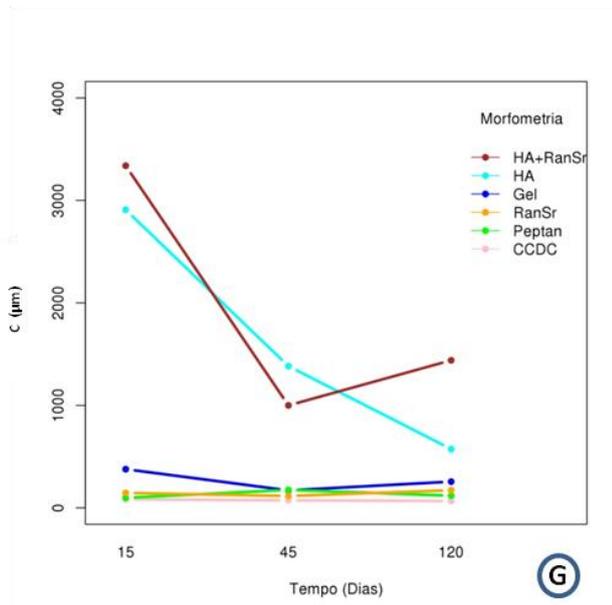
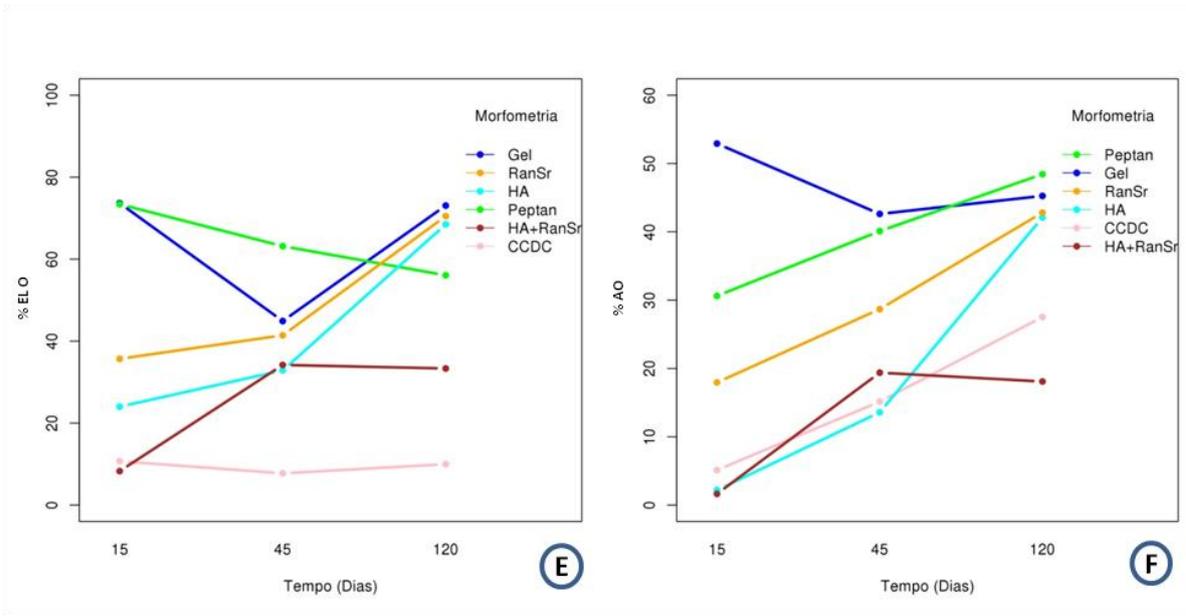
No gráfico 12, observa-se as interações entre os grupos e nos tempos biológicos. Para as variáveis analisadas, nota-se que os grupos foram diferentes entre si e no tempo.

A resposta biológica do grupo gelatina foi mais favorável, quando se avaliou o preenchimento do defeito em sua extensão linear (ELO e % ELO) e apresentou maior área da secção transversal de osso neoformado (AO e %AO). Embora a espessura central do defeito tenha sido maior nos grupos com HAAIlg, esta foi preenchida pelo biomaterial que atuou como um excelente arcabouço de preenchimento. O reparo ósseo na área central do defeito ósseo foi mais evidente no grupo gelatina (Gel). A espessura central em relação às bordas foi maior nos grupos HAAIlgRanSr e HAAIlg (Gráficos 12G, 13G e 13H).

Embora a % AO tenha sido maior, aos 120 dias, no grupo CH, observando a tabela 6 e os gráficos 12A e 13A, percebe-se que a extensão linear é menor do que nos demais grupos. O corte histológico obtido não estava no maior diâmetro do defeito em alguns animais, apresentava-se dentro da faixa de (6,6 a 8 mm).

Gráficos 12 - Interações entre os grupos com as variáveis analisadas. **A)** Extensão linear do defeito (EL); **B)** Extensão linear de osso neoformado (ELO); **C)** Área da seção transversal total do defeito ósseo (AT); **D)** Área da seção transversal de osso neoformado (AO); **E)** Porcentagem de ELO comparado à EL (%ELO); **F)** Porcentagem de AO comparado à AT (%AO); **G)** Espessura no centro do defeito sem incluir o seio sagital (c).





De acordo com a análise de variância, a partir das médias entre os grupos, nos tempos biológicos, da interação grupo e tempo e da análise do resíduo, observou-se que a maior explicação da variabilidade nas variáveis: EL, ELO, AT, AO e C deveu-se à variação entre os grupos, devido ao maior percentual (conforme sumarizado na tabela 13).

Na tabela 13, os cálculos para a análise do efeito foi realizado da seguinte forma:

$T = \text{médias dos grupos} + \text{médias dos tempos} + \text{média dos resíduos};$

$\%A = (\text{média dos grupos})/T;$

$\%B = (\text{média dos tempos})/T;$

$\%C = (\text{média da interação entre grupo e tempo})/T;$

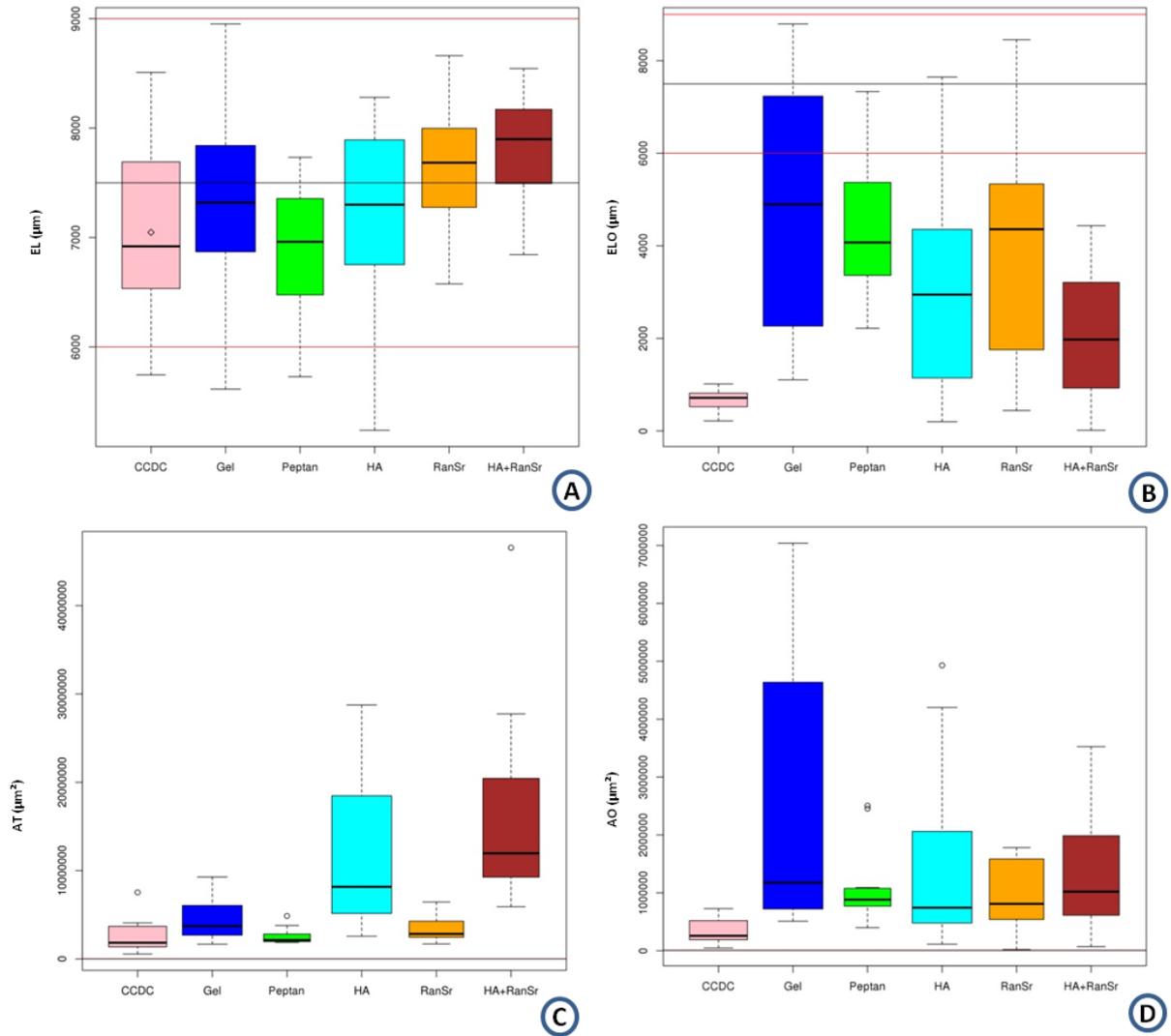
$\%R = (\text{média dos resíduos})/T$

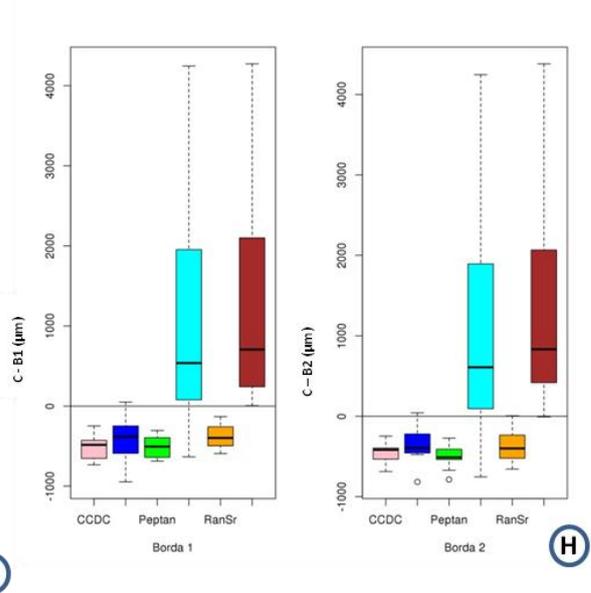
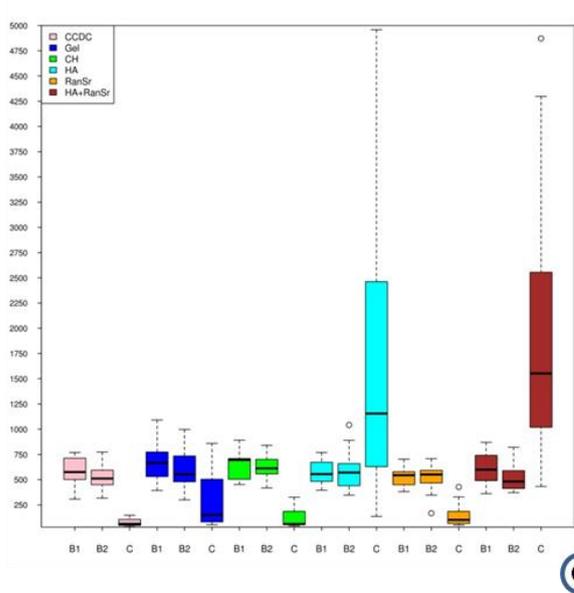
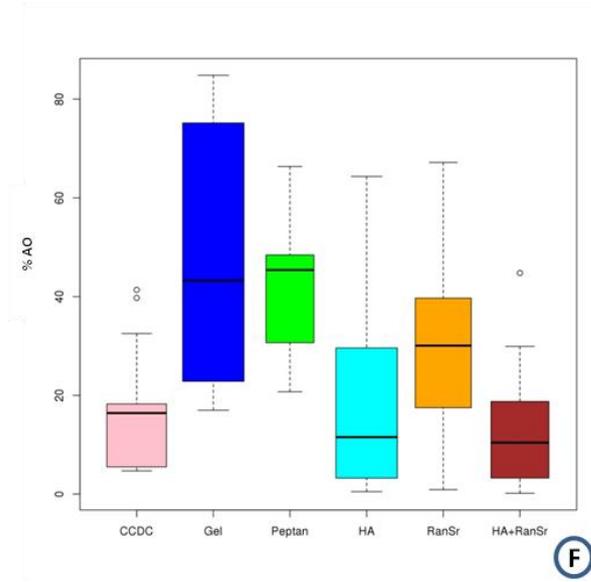
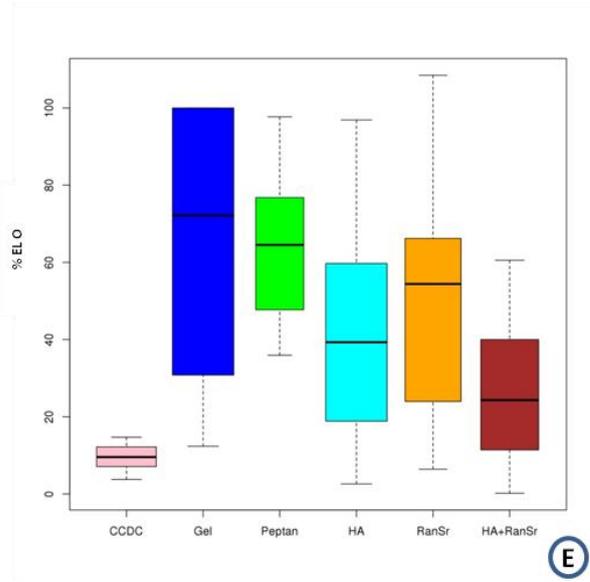
Tabela 13 Análise do efeito da interação nas variáveis: EL, ELO, AT, AO e C.

VARIÁVEL	GRUPO	TEMPO	GRUPO e TEMPO	RESÍDUO
	% A	% B	% C	% R
EL	62,22	9,14	10,37	18,24
ELO	60,65	23,86	10,42	5,05
AT	49,83	38,81	9,74	1,60
AO	48,47	22,75	19,88	8,88
C	56,80	30,90	10,90	1,39

No gráfico 13, observam-se diferenças entre os grupos e nos tempos biológicos. Para as variáveis analisadas, nota-se que os grupos foram diferentes entre si e no tempo.

Gráficos 13 - Boxplots dos grupos com as variáveis analisadas. **A)** Extensão linear do defeito (EL); **B)** Extensão linear de osso neoformado (ELO); **C)** Área da seção transversal total do defeito ósseo (AT); **D)** Área da seção transversal de osso neoformado (AO); **E)** Porcentagem de ELO comparado à EL (%ELO); **F)** Porcentagem de AO comparado à AT (%AO); **G)** Espessura no centro do defeito sem incluir o seio sagital (c) e das bordas (B1 e B2), em cada grupo; **H)** Comparativo entre a espessura central e as bordas B1 e B2.







6 DISCUSSÃO

Uma abordagem promissora na regeneração óssea consiste no desenvolvimento de protocolos para a engenharia de tecidos com materiais biomiméticos. O desenvolvimento desses materiais fornece microambientes naturais para as interações célula-matriz que mimetiza, em parte, o ambiente biológico do osso (STEVENS, 2008). Dentre os biomateriais implantados neste estudo, a gelatina e o colágeno hidrolisado mimetizam a matriz extracelular do tecido ósseo e se assemelham aos componentes orgânicos do osso além de atuarem como arcabouços tridimensionais e também na osteocondução através do controle da migração das células. Além disso, esses biomateriais proporcionam uma estrutura proteica favorável à adsorção, e a química bioativa desses polímeros à base de peptídeos favorece o reparo ósseo (STEVENS, 2008). O outro material biomimético de escolha foi a microesfera de HAAlg, por ser bioativa, ter alta interconectividade espacial e microporosidade de superfície.

Estes materiais biomiméticos implantados são também denominados de inteligentes, e sua composição, possivelmente, favoreceu a diferenciação das células progenitoras em osteoblastos, por promoverem uma invasão capilar precoce, com manutenção da atividade celular. Desse modo, esses arcabouços direcionaram a adesão, migração e proliferação celular. A sua taxa de degradação está correlacionada com as propriedades físico-químicas da hidroxiapatita, da gelatina e do colágeno hidrolisado. Todas essas características citadas são essenciais para uma regeneração óssea adequada, porém, essas vantagens podem ser perdidas caso o biomaterial não seja implantado de forma correta (ANDERSON; BURDICK; LANGER, 2004; FURTH; ATALA; VAN DYKE, 2007).

O desenvolvimento desses materiais inteligentes pelos pesquisadores da bioengenharia tecidual é essencialmente relevante para a aplicação em defeitos ósseos críticos caracterizados como um desafio à regeneração óssea espontânea. Essas características foram reproduzidas e ratificadas em nosso modelo de estudo em calvária de rato. Foi possível avaliar a regeneração óssea pela análise morfométrica, sendo este modelo bem aceito em pesquisas pela comunidade científica. No presente experimento, as calvárias de ratos adultos apresentavam, na área correspondente às bordas ósseas para todos os grupos avaliados, uma espessura média de 0,58 mm.

O grupo padrão ouro (CSDC), para a comparação da estrutura óssea da calvária íntegra, permitiu avaliar, na área correspondente à média dos defeitos ósseos (para $EL_{\text{média}} = 7,3$ mm), as dimensões da $AO_{\text{média}}$ ($4,43$ mm²) e a espessura média nas regiões correspondentes às bordas do defeito ($B_{\text{média}} = 0,54$ mm), bem como observar a dura máter e o perióstio.

No gráfico 12, observou-se que o tamanho do defeito (EL) e o reparo ósseo (AO e ELO) variaram entre os grupos e no tempo. Essas variações podem ser explicadas pelas diferenças nas repostas biológicas após a implantação dos diferentes biomateriais ou pela administração do ranelato de estrôncio. A linha para o corte das calvárias foi cuidadosamente mensurada. O sistema de confecção das lâminas não foi automatizado, e pequenas variações, desde a inclusão no desgaste do bloco de parafina e no corte histológico ou ainda na mensuração das imagens, podem ocorrer. Entretanto, no defeito confeccionado com 8,5mm obteve-se na mensuração morfométrica valores que variaram dentro de uma faixa de um defeito crítico (com média e desvio padrão, entre grupos e no tempo, de $7,3 \pm 0,77$ mm).

A variação entre os tempos avaliados ocorreu em função da composição dos grupos experimentais serem com grupos de animais distintos para cada ponto biológico avaliado. Além disso, estes animais não são isogênicos e apresentam variações também na resposta biológica.

Os defeitos ósseos foram confeccionados em sítios anatômicos em região estável, com reduzido risco de fratura, com a inclusão do osso cortical e do esponjoso (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986) da calvária e a remoção do perióstio.

Na presente pesquisa, utilizamos *Rattus norvegicus* da linhagem *wistar* albino, machos e adultos. A escolha por animais adultos foi em razão de o seu metabolismo ósseo ser mais lento e estável, diferentemente de animais jovens em que a neoformação e remodelação óssea é mais dinâmica para atender as demandas naturais do processo de crescimento esquelético do animal. Segundo Wan e colaboradores (2006), a dura máter, em ratos jovens, expressa quantidade significativamente maior de BMP-2, osteopontina (OP), proteínas da matriz extracelular (colágeno tipo III e fibronectina), marcadores de diferenciação de osteoblastos e fatores de crescimento. O ciclo estral das ratas fêmeas, com as variações hormonais, também pode influenciar no mecanismo de reparo ósseo e nas concentrações plasmáticas de Ca e Sr e, por esse motivo, apenas animais machos foram selecionados para compor a amostra (AUER et al., 2007). Não foi

administrado nenhum anti-inflamatório no pós-operatório, visto que estes interferem no mecanismo de reparo (AUER et al., 2007) porém, foram seguidas as condições éticas pré-estabelecidas.

O defeito ósseo com dimensões de 8,5 mm de extensão e aproximadamente 0,8 mm de espessura em calvárias de ratos é efetivamente crítico, conforme observado no grupo CCDC (Prancha 2). A trepanação com a broca trefina, com diâmetro interno de 8 mm e espessura de 0,5 mm favoreceu a confecção de defeitos de 8,5 mm. Entretanto, o diâmetro ósseo muitas vezes foi maior no plano coronal (Gráfico 12 A), que pode ser justificado pela anatomia convexa da calvária em sua superfície externa, que favoreceu movimentos de báscula durante a trepanação óssea (Figura 45).

O reparo ósseo permaneceu durante os 120 dias em observação, restrito às bordas no grupo CCDC (Prancha 2). O preenchimento linear centrípeto por osso neoformado foi em média de 9,4% (%ELO), conforme observado na tabela 10, para todos os pontos biológicos. Isso correspondeu a 16,57% da porcentagem de área seccional de matriz osteoide (%AO), conforme observado na tabela 11. Esta reparação restrita às bordas ósseas do defeito corroborou com resultados de outros autores, além disso, este tamanho e morfologia circular já estão bem consolidados em nosso grupo de pesquisa (BARRETO, E., 2006; BARRETO, I., 2008, 2011; CARVALHO, F., 2008; CARVALHO, A., 2010; MIGUEL et al., 2006, 2008; PAULA, 2008; ROLIM, 2010) e em outros trabalhos (CHESMEL et al., 1998; FERREIRA et al., 2004; HOLLINGER, 1986; KNESER et al., 2006; MARINS et al., 2004; PARK et al., 2009; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Esta matriz óssea neoformada ocorre pelos estímulos locais produzidos pelo ato cirúrgico, que favorecem a reparação, tais como: o deslocamento do periósteo adjacente, o extravasamento sanguíneo local e a reação inflamatória com a liberação das citocinas inflamatórias (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). Estas citocinas podem influenciar na velocidade do processo de reparo, especialmente os fatores angiogênicos, quimiotático, de proliferação e de diferenciação que atuam no processo de reparação tecidual. As células inflamatórias promovem a liberação de citocinas capazes de desencadear quimiotaxia e diferenciação de células osteoprogenitoras presentes no tecido ósseo remanescente da borda óssea (CARANO; FILVAROFF, 2003; LAURENT et al., 2004).

Além da divulsão do periósteo na superfície superior da calvária, o deslocamento da dura máter da borda óssea remanescente, durante a trepanação, também parece servir como estímulo ao reparo ósseo nas áreas adjacentes dessa superfície óssea. Isso foi encontrado em todos os grupos do experimento, exceto no CSDC.

O defeito ósseo crítico é definido como o menor tamanho de defeito em uma espécie animal que não se regenera espontaneamente por completo durante o período de vida do animal (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). A sua porção central cicatriza pela formação de um tecido conjuntivo (URIST, 1984) e isso foi confirmado em nossos resultados com preenchimento médio de 90,6% do defeito por tecido conjuntivo fibroso. Embora não haja consenso na literatura sobre o tamanho exato para considerar o defeito ósseo como sendo crítico, isto pode variar conforme o modelo animal, com suas distintas características metabólicas, anatômicas, fisiológicas, diferentes entre as espécies e a região em estudo (BOSCH; BOSCHMELSEN; VARGERVIK, 1998).

O presente modelo de incisão semilunar com sutura para posterior favoreceu o menor contato das patas do animal à área da sutura (Figura 46). Isso evitou o possível rompimento dos pontos e reduziu os riscos de infecção. Além disso, a área da ferida já suturada bem como as patas do animal foram degermadas com álcool iodado no pós-cirúrgico imediato para reduzir os riscos de contaminação. Entretanto, um processo inflamatório intenso foi encontrado no grupo com implantação de esferas de HAAG.

Com a finalidade de avaliar o potencial osteogênico, alguns biomateriais foram implantados e esses apresentaram potencial osteogênico. A gelatina mimetiza a mineralização no tecido ósseo, por favorecer a deposição de sais de cálcio e fosfato nas fibras de colágeno (LEE, C; SINGLA; LEE, Y., 2001; GOISSIS, 2007; MARTINS; GOISSIS, 1996).

Os grânulos secos de gelatina atuaram como agente hemostático (observado macroscopicamente) no momento da implantação, por ser um material bastante higroscópico e isso tornou a sua superfície mais quimioatrativa. Ao mesmo tempo em que os grânulos foram reidratados no próprio fluido biológico, isso pode ter favorecido o deslocamento de citocinas e fatores de crescimento e adsorção de proteínas no local de implantação do biomaterial. Esses aspectos foram relevantes para o mecanismo de reparo, pois os grânulos atuaram como arcabouço, que

favoreceu a migração e a adesão celular e ainda observou-se a formação de núcleos de mineralização (Prancha 4).

Outro fator importante ao reparo ósseo é a característica de superfície dos grânulos. Por mecanismos ainda desconhecidos no reparo ósseo, o organismo tende a regularizar as superfícies pontiagudas e irregulares. Os grânulos apresentam formatos irregulares com superfície rugosa e tamanho de aproximadamente 400 µm, dimensão similar às esferas de hidroxiapatita da presente pesquisa (Figura 35). O biomaterial, quando gelificado, pode ter favorecido a adesão celular, especialmente de macrófagos que fagocitaram o material ao mesmo tempo em que houve formação de tecido mineralizado muito semelhante ao tecido ósseo (Pranchas 4 e 5).

Na reconstrução da estrutura tridimensional do tecido ósseo, estes arcabouços colagênicos foram biocompatíveis, bioativos, como observado nos resultados do grupo Gel (Pranchas 3, 4 e 5) e apresentaram melhor potencial osteogênico, quando comparados aos demais grupos. A nanoestrutura da molécula de colágeno serviu de arcabouço com formação de matriz óssea semelhante à naturalmente formada durante o processo embrionário, onde nanocristais de HA são depositados em uma matriz orgânica de colágeno (ZHAI; CUI; WANG, 2005; ZHANG et al., 2010). Esse processo mimetiza o processo de mineralização que ocorre no tecido ósseo. Desse modo, esse material pode ser considerado como biomimético quanto aos aspectos de constituição química e no seu comportamento biológico. Observa-se, inclusive, a reconstituição de regiões que lembram áreas de sutura bem como áreas de região medular e deposição de lamelas circunscritas aos canais circulares, semelhantes aos ósteons (Prancha 5).

O colágeno e a fibronectina, proteínas da matriz extracelular, que se aderem às integrinas, presentes na membrana das células, possuem ação importante no mecanismo de adesão celular (AUBIN; LIU, 1996).

É possível que em sua composição, os peptídeos de colágeno, presentes na gelatina e no colágeno hidrolisado tenham atuado como fatores osteogênicos. Uma característica interessante é que várias moléculas da matriz extracelular do tecido ósseo contêm aminoácidos da sequência RGD (Arg-Gly-Asp) em suas estruturas, que lhes permitem ligar-se diretamente aos receptores da superfície das células (BALASUNDARAM; SATO; WEBSTER, 2006). Esses e outros aminoácidos estão presentes no colágeno tipo I e, possivelmente, na gelatina e no colágeno hidrolisado

que utilizamos na presente pesquisa.

Estas pequenas sequências de peptídeos, como o RGD, adsorvidos na superfície do polímero podem duplicar a adesão celular na interface do biomaterial (TAUBENBERGER et al., 2010).

Em alguns animais do GGel, aos 120 dias, se observou menor espessura óssea neoformada, quando comparada com o ponto biológico aos 15 dias. Possivelmente, o tecido mineralizado neoformado foi remodelado, ou ainda o biomaterial pode ter sido reabsorvido mais rapidamente em alguns animais de modo que, aos 120 dias, observou-se menor espessura óssea. Isso pode ocorrer devido aos animais da amostra não serem isogênicos, e variações biológicas entre os indivíduos do grupo podem ocorrer.

No grupo CH, com colágeno hidrolisado, a apresentação em forma de pó tem maior área de superfície. Este biomaterial não atuou como um bom arcabouço tridimensional, apesar de ter composição que mimetiza o componente orgânico do tecido ósseo em contato com os fluidos biológicos e células. De fato, a sua composição favoreceu a formação de matriz mineralizada muito semelhante a tecido ósseo sem, contudo, preencher a área do defeito crítico em sua totalidade (Pranchas 6, 7 e 8; Gráficos 12B e D).

De outro modo, a alta solubilidade do biomaterial pode ser explicada em parte pela baixa força de gel (bloom) e alta viscosidade. A hidrólise do colágeno modifica suas interações eletrostáticas e produz alterações na superfície das microfibrilas, com subsequente alteração da sua topografia (BET et al, 2003; GOISSIS; MAGINADOR; MARTINS, 2003; MIGUEL, 2008). Essa hidrólise favorece a deposição de íons, cálcio e fosfato por diferenças eletrostáticas e, conseqüentemente, promove a mineralização. Além disso, o CH apresenta cargas de superfície na molécula por ser hidrolisado e, segundo Goissis, Maginador e Martins, (2003), a presença de cargas na molécula altera as propriedades piezoelétricas e as características de solubilidade do colágeno.

Como os resultados obtidos foram promissores, este biomaterial polimérico (CH) pode ser investigado em trabalhos futuros, quando associado a outros arcabouços, tais como a microesfera de hidroxiapatita. Essa associação aprimoraria as propriedades de superfície da HA ou ainda, como aglutinante para evitar o deslocamento dessas microesferas.

A HAAlg apresentou deslocamento esperado observado também por outros

autores que utilizaram esse formato de microesferas (BARRETO, E., 2006; BARRETO, I., 2011; CARVALHO, A., 2010; PAULA, 2008). A quantidade de biomaterial, um pouco maior do que a necessária para o preenchimento do defeito, evitou que o mesmo ficasse com preenchimento irregular. Foram realizados pilotos prévios ao experimento para definir a quantidade necessária ideal. Dessa forma, em todos os animais as microesferas estavam preenchendo toda a extensão do defeito. Esse biomaterial apresentava-se estável já aos 15 dias. Essa estabilidade estava associada à presença de septos de tecido conjuntivo e vasos capilares de permeio às microesferas ou aos seus fragmentos (Prancha 9B e G). Algum deslocamento das esferas foi esperado em função da morfologia do biomaterial e da pequena profundidade do defeito ósseo em calvária e também em função dos hábitos observados no próprio animal. Os ratos têm o hábito de limpar os pelos com as patas dianteiras e de dormir com o dorso da cabeça em decúbito ventral. E ainda, pelo próprio estímulo da cicatrização da ferida, com a inflamação local e a contração dos tecidos que geram pruridos e, em resposta, o animal tende a manipular a área operada.

A HAAlg bioativa, não sinterizada, tem estrutura química compatível com a fração inorgânica do tecido ósseo. A solubilização desse biomaterial no microambiente tecidual promoveu 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 com o tecido ósseo. Essa solubilização das microesferas de HAAlg acompanhada pela maior concentração de cálcio na matriz extracelular estimula a produção de colágeno e BMPs, enquanto que a maior concentração de fosfato nesse meio leva ao estímulo e à produção da osteopontina (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008; AUBIN; LIU, 1996; LAURENT et al., 2004).

Segundo Stevens (2008), as características topográficas de superfície dos biomateriais (com variação de 10 μm a 100 μm) favorecem o comportamento biológico como a adesão de proteínas e a ação de células. A HA da presente pesquisa é nanoestruturada. Não medimos os grânulos ou partículas que compunham as microesferas, no entanto, foi observado por MEV (Figura 43) uma superfície irregular, com rugosidade e microporosidade de superfície e, histologicamente, observou-se que esses grânulos apresentavam-se em diversos tamanhos.

A não sinterização das microesferas permitiu que essa superfície porosa fosse mantida sem a fusão dos cristais que ocorre em microesferas de HA sinterizada (Figura 43).

A permanência do alginato na superfície e entre as micropartículas da esfera favoreceu a solubilidade. Esse alginato aprimorou as propriedades, enquanto arcabouço tridimensional osteocondutor e também apresenta propriedades poliméricas e hemostáticas.

Os interstícios entre as microesferas apresentaram tamanhos adequados que permitiram a angiogênese no interior desses arcabouços e, com a fragmentação e a solubilização do biomaterial, os mesmos foram incorporados na matriz osteoide em formação (Pranchas 9, 10, 13, 14 e 15).

Segundo o descrito na literatura, esses interstícios em um arcabouço permitem a passagem de moléculas sinalizadoras, e a manutenção da sua forma adequada com o sítio de implantação serve de molde para a formação de matriz osteoide (DIETMAR; GARCIA, 2005; MASTROGIACOMO et al., 2005). Os interstícios entre as microesferas de HA constituem um verdadeiro arcabouço tridimensional por favorecer a promoção da adesão, migração, proliferação e diferenciação celular. (BARRIAS et al., 2005, 2006; MARCACCI et al., 2007).

A HAAIlg do presente experimento é não calcinada e não sinterizada, portanto, é considerada um material não cerâmico, um compósito. O método de síntese desse biomaterial e sua caracterização o definem como uma HA estequiométrica com razão molar Ca/P de 1,67. A FTIR do gráfico 9 permitiu identificar os grupos químicos funcionais da hidroxiapatita (carbonatos, fosfatos e hidroxilas) através da oscilação de frequência de vibração em infravermelho, e a DRX permitiu investigar as fases presentes (Gráfico 8) e o alto grau de cristalinidade do material (picos estreitos e de alta intensidade). E a MEV com EDS confirmaram a presença de cálcio e fósforo na microesfera do biomaterial (Gráfico 7).

A HAAIlg, não sinterizada, utilizada no presente estudo, apresentou bandas de CO_3^{2-} que confirmaram a presença do alginato na superfície do biomaterial. Bandas de CO_3^{2-} são também encontradas na estrutura molecular da hidroxiapatita carbonatada do tipo B – apatita do esmalte dentário e do osso cortical (ELLIOT, 1994; LEGEROS, 1994).

Observa-se, em trabalhos, comparando-se HA sinterizada e HAAIlg não sinterizada, que este polímero (Alg) promove mudanças no comportamento biológico

da HA, quando implantado em defeitos críticos em calvária de rato. Nos trabalhos de E. Barreto (2006), I. Barreto (2008, 2011), A. Carvalho (2010), com HA sinterizada, houve maior encapsulamento do material por tecido conjuntivo fibroso e menor fragmentação do biomaterial em meio biológico. No entanto, em trabalhos de Paula (2008) e Rolim (2010) a implantação de microesferas de HAAIlg não sinterizadas foram mais biocompatíveis e promoveram mais fragmentação com presença de septos dentro das esferas e fragmentos englobados à matriz osteoide.

A proliferação dos vasos sanguíneos é uma condição básica para o crescimento tecidual e reparo ósseo, sendo observada aos 15 dias para todos os grupos experimentais avaliados. Em nossos resultados no grupo HAAIlg, observou-se a proliferação de vasos em outros pontos biológicos dentro das esferas parcialmente fragmentadas. Essa proliferação foi também observada, quando houve associação entre HAAIlg e RanSr.

A vascularização, além de fornecer nutrientes, coordena a atividade das células ósseas e sua migração para o sítio de implantação (MASTROGIACOMO et al., 2006). O Alg é um agente hemostático, que estabiliza o coágulo devido a sua propriedade de gelificação. Outro efeito é atribuído ao Sr, que tem ação local no defeito ósseo, região de maior metabolismo, sendo capaz de influenciar na liberação de citocinas responsáveis pela angiogênese local (SAIDAK, MARIE, 2012).

A HAAIlg, quando precipitada por via úmida, possui características similares às do tecido ósseo, por apresentar baixa cristalinidade e tamanho de cristais pequenos (COSTA et al., 2009).

A microesfera de HAAIlg do presente estudo é nanoestruturada (conforme observado pelas partículas que a compõem, pranchas 14B e 14D, figura 43). Desse modo, as suas propriedades físico-químicas, a dimensão dos cristais e a solubilidade do material são distintas de uma HA, que não é nanoestruturada. A maior solubilidade permite alcançar uma maior área de superfície e, como consequência, há maior interação entre a superfície do biomaterial e os tecidos adjacentes (NARAYAN et al., 2004, 2010). A redução do tamanho das partículas que compõem as microesferas aumenta a bioatividade, favorece a biodegradação e possibilita a proliferação, a migração celular, a vascularização tecidual e a difusão de nutrientes. Essas características são essenciais para a regeneração óssea (NAVARRO et al., 2008).

A HA não sinterizada desse experimento foi mais solúvel e apresentou melhor

potencial osteogênico em relação à HA sinterizada utilizada por I. Barreto (2011), sendo ambos os materiais confeccionados pelo mesmo meio precipitação e pH, com a mesma metodologia de implantação *in vivo*, com um mesmo tipo de defeito crítico e pontos biológicos. A menor dissolução em materiais sinterizados, ou com tratamento térmico, também é corroborado por outros estudos (BALASUNDARAM et al., 2006; FULMER et al., 2002; GASPERINI, 2010), entretanto, utilizaram meios, pH e tempos diferentes de avaliação.

O produto da reação por via úmida é um pó de partículas pequenas ($< 74 \mu\text{m}$) e cristalinidade similar aos tecidos naturais, porém, apresenta baixa cristalinidade, que favorece a textura porosa da superfície (conforme observado por MEV na figura 43). A HAAlg nanoestruturada apresentou porosidade adequada para que houvesse a proliferação vascular também dentro das esferas do biomaterial (Prancha 17E). Além disso, o processo de secagem do material removeu apenas parte da água adquirida no processo de síntese por via úmida. Esse material é higroscópico, quando comparado à HA sinterizada, aspecto que contribui com a fragmentação. Além disso, em sua composição, o alginato circunda as nanopartículas que compõem a esfera; favorece a maior adsorção de água, solubilização e fragmentação do biomaterial em meio biológico.

A HAAlg foi precipitada em solução aquosa a 90°C e com alta taxa de adição dos reagentes, sem que houvesse tempo para o crescimento dos grãos. Isso favoreceu a formação de cristais nanométricos menos cristalinos, quando comparados com hidroxiapatitas sinterizadas. O tamanho e a morfologia da partícula também são influenciados pela temperatura (RIGO et al., 2007).

O cuidadoso controle das condições da solução é crítico na precipitação via úmida. Caso contrário, uma diminuição do pH da solução abaixo de nove pode conduzir à formação da estrutura da HA deficiente em íons Ca. O método de síntese adotado para a obtenção de hidroxiapatita ou o seu tratamento posterior pode levar ao aparecimento, ou não, de outras fases de compostos de fosfato de cálcio. Essas fases podem modificar as propriedades biológicas do material (COSTA et al. 2009) entretanto, não foram identificadas por difratometria de raios-X, o que confirma que o biomaterial utilizado nesta pesquisa é, de fato, uma hidroxiapatita cristalina, pura.

A presença de carbonato na estrutura da apatita proporciona um aumento da solubilidade e da taxa de dissolução dos cristais da apatita. As bandas de carbonato encontradas no difratograma da HAAlg (Gráfico 8) não são relacionadas à adição de

carbonato na estrutura molecular; estas provavelmente provêm da decomposição do alginato na superfície do biomaterial. Esse carbonato presente favoreceu a solubilidade das microesferas, observado histologicamente, entretanto, o efeito na cristalinidade da estrutura e no tamanho de cristal são desconhecidos, pois não foram objetivos do presente trabalho. Entretanto, segundo Angelo (2008), a formação de cristais menores, detectados por um alargamento dos picos de difração, contribui para um aumento da área superficial e da taxa de dissolução.

O nosso grupo de pesquisa desenvolveu trabalhos prévios com microesferas de hidroxiapatita e alginato sinterizada (BARRETO, E., 2006; BARRETO, I., 2011; CARVALHO, A., 2010; NASCIMENTO, 2010) e hidroxiapatita e alginato não sinterizadas e não calcinadas (PAULA, 2008; ROLIM, 2010) com o mesmo modelo e metodologia da presente pesquisa. Observou-se que a HAAIg não sinterizada apresentou superfície mais porosa, que favoreceu a adsorção dos fluidos biológicos e a sua fragmentação. Essa fragmentação do biomaterial (Pranchas 9E e F; Prancha 14B, 15C, 15D) também incrementou a osteocondução, a ação dos macrófagos, a substituição do biomaterial por matriz osteoide neoformada para os grupos com microesferas de HAAIg não sinterizadas e não calcinadas, com diâmetros entre 400 a 600 μm , com 1% de alginato, que fragmentou-se em tamanhos menores já aos 15 dias (PAULA, 2009), microesferas de HAAIg com 425 a 600 μm 1% de alginato, que fragmentou-se em tamanhos diminutos aos 45 dias (ROLIM, 2010) e microesferas de HAAIg com 425 a 600 μm 2,5% de alginato na presente pesquisa.

Essa fragmentação ocorreu, pois a HAAIg tem alta capacidade de adsorver moléculas de água, pois algumas impurezas ou substituições parciais da hidroxila por ânions estabilizam a forma hexagonal da HA à temperatura ambiente. Por esse motivo, os monocristais naturais de HA geralmente exibem uma conformação hexagonal (COSTA et al. 2009).

Na presente pesquisa, os fragmentos do biomaterial apresentavam tamanhos variáveis e, já aos 15 dias, inúmeros fragmentos menores que 50 μm foram localizados (Pranchas 9E e F; Prancha 14B, 15C, 15D). A fragmentação do biomaterial com partícula com essas dimensões ou menores podem ser fagocitadas e induzem citotoxicidade (BEST et al., 2008; ROGERO; BRAGA; HIGA, 1999). O tamanho das partículas é um fator relevante e desejável para que haja reparo ósseo. Os osteoblastos ao fagocitarem estas partículas exibem maior atividade metabólica com aumento da transcrição gênica e na síntese de proteínas. Os biomateriais em

tamanhos nanométricos exibem melhor bioatividade e melhor adesão pelas células osteogênicas (GRÉGOIRE, ORLY, MENANTEAU, 1990).

Segundo A. Carvalho (2010) a hidroxiapatita com 1% de alginato, sinterizada até 1100°C, em formato de microesferas, com dimensões de 250 a 450 µm apresentou características apenas de preenchimento do defeito, como arcabouço. Porém, o biomaterial foi encapsulado por fibras colágenas e o reparo ósseo não foi satisfatório. Embora o tamanho das esferas avaliadas por A. Carvalho (2010) seja menor, aos 120 dias, estas não fragmentaram de forma satisfatória, quando comparado aos trabalhos de Paula (2008), Rolim (2010) e da presente pesquisa.

Observou-se uma cápsula fibrosa (Pranchas 9B, 13E e 13F) na área da lesão crítica entre as microesferas e os fragmentos do biomaterial, também corroborado por outros autores que utilizaram microesferas sinterizadas de HA (BARRETO, E., 2006; BARRETO, I., 2011; CARVALHO, A., 2010).

Algumas características físico-químicas dessa HA foram aprimoradas para serem utilizadas na presente pesquisa. As modificações na estrutura e na síntese do biomaterial proporcionaram novas habilidades biológicas. O Alg, em microesferas de HA não sinterizada, é um polímero promissor ao reparo ósseo (ROLIM, 2010). O efeito local da implantação de um arcabouço tridimensional bioativo, biodegradável, osteocondutor, tais como as microesferas de HAAlg, poderia favorecer o reparo, quando associado ao fármaco ranelato de estrôncio, que tem ação dual, tanto na osteogênese, quanto na redução da reabsorção óssea. Não tínhamos dados anteriores sobre o comportamento biológico da hidroxiapatita e alginato associados ao ranelato de estrôncio.

A HAAlg não sinterizada, quando associada à administração do ranelato de estrôncio, apesar de apresentar potencial osteogênico, não houve ganho adicional no reparo ósseo (Tabelas 10 e 11, gráficos 13E e 13F). A implantação de HAAlg não sinterizada isoladamente foi mais favorável à formação de matriz osteoide, quando comparado aos grupos HA sinterizada e ranelato isoladamente ou em associação (BARRETO, I., 2011; CARVALHO, A., 2010). Mostramos com os dados da presente tese que o fármaco RanSr atuou sistemicamente no metabolismo ósseo; promoveu regeneração parcial do defeito ósseo, sem o restabelecimento do volume ósseo original (Pranchas 11 e 12, tabelas 10, 11 e 12), o que corrobora como o trabalho de I. Barreto (2011).

Em um trabalho piloto prévio, microesferas de HAAlg entre (210 a 425 µm)

com 1% de Alg, secas em forno, esterilizadas por autoclavagem a 130°C durante 30 minutos foram implantadas em calvária de ratos. Na presente pesquisa, além de aumentamos a concentração de Alg de 1% para 2,5%, as esferas eram maiores, com dimensões entre 425 e 600 µm, secas em estufa e esterilização por raios gama. Este tamanho foi similar ao implantado por Rolim (2010), e o processo de secagem do material passou a ser mais rigorosamente controlado, tendo em vista que a HA é um material com capacidade de absorver impurezas devido às suas propriedades químicas (MAVROPOULOS, 1999). O método de esterilização foi modificado antes em autoclave a 130°C durante 30 minutos (ROLIM, 2010) para radiação gama, também para eliminar possíveis riscos de contaminação do biomaterial nas etapas de fracionamento e de esterilização. A HA com 2,5% de alginato apresentou-se mais solúvel e fragmentou-se mais, possivelmente, devido à presença do alginato em maior concentração, quando comparou-se com os resultados obtidos no piloto com HAAlg, com 1% de alginato (210 a 425 µm) e no obtido por Rolim (2010) com HAAlg com 1% de alginato (425 e 600 µm). Isso pode ter favorecido a adsorção de proteínas e estas, por sua vez, tornaram a superfície do biomaterial mais quimioatrativa às células fagocitárias como os macrófagos e PMN (Pranchas 14B, 14D, 15E, 15F, 16A, 16B).

A HAAlg, ao ser implantada no defeito crítico, a reação inflamatória inicial foi exacerbada com presença de exsudado fibrinoleucocitário (Pranchas 9C, 9D, 9E, 9F, 13A, 13B, 14B, 14D). Possivelmente, esta reação de corpo estranho exacerbada é decorrente da própria implantação do biomaterial e de características específicas deste biomaterial como, por exemplo, sua fragmentação.

Nos períodos iniciais de implantação de biomateriais dos grupos experimentais (Gel, CH) essa reação foi leve a inconspícua. Uma reação de corpo estranho, moderada a inconspícua, foi observada para a HA em outros trabalhos em nosso grupo de pesquisa (BARRETO, E., 2006; BARRETO, I., 2011; CARVALHO, A., 2010; PAULA 2008; ROLIM, 2010) e por outros pesquisadores (CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2011).

Observou-se, na presente pesquisa, aos 15 dias, uma reação inflamatória exacerbada, com presença de exsudato nos grupos com implantação de HAAlg. Em estudos preliminares com teste piloto, testando animais em pontos biológicos com 15 e 45 dias, suspeitou-se que a reação inflamatória intensa seria em decorrência da redução no tamanho das microesferas de tamanho entre 425 a 600 µm para 210 a

425 μm . O biomaterial com menor tamanho, ou seja, maior área de superfície, com maior taxa de degradação permite um maior aporte de células fagocitárias, maior estímulo local para o aporte destas células. O percurso e os efeitos das micropartículas do biomaterial em meio biológico ainda precisam ser rastreados.

No entanto, para o grupo HAAIlg, modificou-se a caracterização do biomaterial para um tamanho maior (425 a 600 μm) semelhante ao tamanho de microesferas pesquisado anteriormente (ROLIM, 2010). Este biomaterial, em dimensões maiores, também apresentou características inflamatórias e era bastante solúvel, já aos 15 dias, que se fragmentou especialmente na área próxima à região do retalho cutâneo (RRC), conforme visto nas pranchas 9G e 15A.

Outros aspectos que possivelmente expliquem a intensa reação inflamatória nos grupos com HAAIlg são a concentração e o tipo de alginato. Segundo Draget e colaboradores (1997), a produção do fator de necrose tumoral (TNF) de monócitos humanos pode variar como resposta a alginatos com diferentes conteúdos de resíduos de ácido manurônico. Possivelmente, a composição química do alginato variou conforme o lote ou ainda conforme o fabricante, quando comparado ao alginato presente nas microesferas implantadas anteriormente por Rolim (2010). O aumento da concentração de Alg de 1% para 2,5% também pode estar, possivelmente, associada à reação inflamatória exacerbada encontrada.

Em trabalho anterior de Rolim (2010), com microesferas de HAAIlg com tamanhos entre 425 a 600 μm e esterilização em autoclave durante 30 minutos a 120°C, quando implantados em defeito crítico, não foi observada reação inflamatória intensa, apenas a reação de corpo estranho incipiente à presença do biomaterial. No presente trabalho, com a mesma metodologia cirúrgica, houve uma reação inflamatória intensa aos 15 dias. Porém, no presente trabalho, houve modificação na esterilização das esferas, antes em autoclave e agora por radiação gama.

A autoclavagem das frações do biomaterial (ROLIM, 2010) pode ter modificado as propriedades químicas e biológicas das microesferas de HAAIlg, tornado-as mais biocompatíveis. Nesse experimento anterior, no microambiente dos tubos plásticos, contendo as microesferas, a condensação de água do meio pode ter sido incorporada à estrutura da hidroxiapatita. Isso ainda será investigado em futuras análises.

A gelatina e o colágeno hidrolisado foram esterilizados pelo processo UHT. Nesse processo a maioria das bactérias são eliminadas, conforme observado nos

anexos A e B. Entretanto, a radiação utilizada para a esterilização das microesferas de HAAlg foi de 15 kGy. Esse processo é mais eficaz para a eliminação de esporos e bactérias. Foram realizadas análises posteriores no biomaterial pelo CBPF e constatou-se que não houve alterações nas propriedades físico-químicas da HAAlg. Entretanto, segundo a literatura, a radiação- γ numa dose de 2-3 Mrad pode resultar numa degradação significativa de polímeros (RATNER et al., 2004) como, por exemplo, o alginato. Com doses a partir de 10 kGy já ocorrem alterações nas propriedades físico-químicas da molécula, tais como: alteração de cor, viscosidade, menor grau de gelificação, quebra de ligações glicosídicas, alteração na proporção dos radicais G/M (LEE, D. et al., 2003; NAGASAWA et al., 2000; RATNER et al., 2004; SEM et al., 2010).

A radiação ionizante por raios gama, a depender da dose, tempo de esterilização, tipo do biomaterial, tamanho e morfologia da partícula e tipo de síntese pode favorecer a incorporação ou a ligação de radicais, ânions, à superfície dos cristais de HA (HAJILOO; ZIAIE; MEHTIEVA, 2011). A radiação ionizante produz elétrons livres, alguns dos quais podem ser capturados por impurezas (COSTA et al., 2004). Segundo Costa e colaboradores (2004), a radiação gama em esmalte dental produz alterações na hidroxiapatita, sendo observados radicais derivados do carbonato (CO_2^- , CO_3^- , CO^- , CO_3^{3-}), do fosfato (PO_4^{2-}) e de oxigênio (O^- e O^{3-}). A HA é também uma absorvedora de íons metálicos e bastante higroscópica, portanto, se houve alguma impureza nesse biomaterial, os elétrons livres podem ter alteradas as suas propriedades biológicas, quando em meio biológico.

A fragmentação do biomaterial aumenta a área de superfície em contato com os fluidos biológicos e células, o que possivelmente favoreceu a adesão de células e a adsorção de fatores de crescimento. A deposição de colágeno entre os fragmentos do biomaterial pode ser observada com a formação de matriz osteoide de permeio a esses fragmentos. Por outro lado, essa fragmentação fez com que esse biomaterial fosse mais perceptível ao sistema biológico do hospedeiro. O aumento na concentração de alginato pode ter favorecido a maior reação inflamatória que resultou em maior fragmentação e solubilização do biomaterial. A inflamação tornou o pH do meio ácido e isso favoreceu a biodegradação do biomaterial em fragmentos diminutos. Esses fragmentos estimularam células inflamatórias com a presença de migração e ação fagocitária de macrófagos para o sitio do defeito (Pranchas 9E, 9F, 14B, 14D, 15E, 15F).

Observou-se, no corte histológico, a presença de inúmeros macrófagos espumosos com aspecto epitelióide, o que denota ampla ativação de células macrofágicas (Prancha 15E). Pela fusão de inúmeros macrófagos, observaram-se também as células gigantes multinucleares (Prancha 14B e 14D). Os macrófagos podem fagocitar microorganismos, células apoptóticas e de corpos estranhos ou agentes exógenos e endógenos. Os macrófagos são as células predominantes da inflamação crônica e são apenas um dos componentes do sistema mononuclear fagocitário (SMF) que liberam inúmeras citocinas inflamatórias. A inflamação granulomatosa, granulomas de corpo estranho, é um padrão diferenciado de reação inflamatória crônica na qual o tipo celular predominante é um macrófago ativado com o aspecto de uma célula epitelial modificada (epitelióide) (ABBAS et al., 2012).

A destruição tecidual é uma característica da inflamação crônica. Isso pode ser observado pela presença de exsudato fibrinoleucocitário e menor neoformação óssea, aos 15 dias, próximo às bordas ósseas do defeito para alguns animais do grupo HAAIlg (Prancha 13 A).

De uma forma geral, grandes defeitos teciduais apresentam, de início, uma quantidade maior de fibrina de restos necróticos e de exsudato a serem removidos. Conseqüentemente, a reação inflamatória é mais intensa. No entanto, a formação de exsudato não é observada nem no grupo controle, nem nos grupos experimentais da gelatina e do ranelato de estrôncio. Esses aspectos afastam a possibilidade de contaminação, visto que outros grupos foram operados em períodos coincidentes ao do grupo HAAIlg.

Embora tenha ocorrido reação inflamatória intensa, aos 15 dias, houve neoformação óssea nos grupos com HAAIlg, especialmente aos 120 dias, o que comprova o potencial osteogênico e osteocondutor do biomaterial, possivelmente mediada pela ação macrofágica observada (macrófagos espumosos e células gigantes multinucleares). Alguns autores citam que após o contato com diferentes superfícies de biomateriais, os macrófagos podem produzir fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), sendo também capazes de produzir citocinas anti-inflamatórias como fator de transformação de crescimento β (TGF- β) (WANG et al., 1996) e interleucina 10 (IL-10) (GRETZER et al., 2003), e sinais osteoindutores como a proteína morfogenética óssea 2 (BMP2), quando expostos a diferentes estímulos (MOURA, 2009).

A exposição a diferentes biomateriais (CIAPETTI et al., 2005) e a diferentes

rugosidades de superfície (RICE et al., 2003) influencia na adesão e na liberação de citocinas em culturas de macrófagos e, supostamente, pode influenciar na velocidade de neoformação óssea, ao ativar osteoblastos e células osteoprogenitoras (DAVIES, 2003).

A espessura central do defeito foi maior nos grupos em que houve implantação de esferas, quando comparados às formas pó do CH e grânulo dos demais materiais (Tabela 12, gráficos 12G, 13G, 13H). O formato e a composição destas esferas de HAAlg e a permanência destas por um período maior foram favoráveis ao preenchimento dos defeitos ósseos, enquanto arcabouço.

O ranelato de estrôncio apresentou potencial osteogênico no reparo ósseo com a dose de administração escolhida do medicamento, 900 mg/Kg/dia, sendo também monitorada a concentração dos íons cálcio e estrôncio no plasma sanguíneo. Estudos prévios também demonstraram o efeito positivo do ranelato de estrôncio no reparo ósseo em ratos com esta concentração (AMMANN et al., 2004; BARRETO, I., 2011) e com outras doses 50, 200, e 800 mg/Kg/dia (HOTT et al., 2003).

Em futuros estudos será necessária a avaliação com doses maiores de ranelato de estrôncio, sem, contudo, ultrapassar o limiar de toxicidade do estrôncio. Parte do fármaco já tem sua absorção comprometida pelo cálcio presente na composição da ração que corresponde à baixa concentração de Ca^{+2} , ao valor diário ingerido em dieta. O íon Ca^{+2} compete com o íon Sr^{+2} na absorção, no transporte plasmático e na excreção renal. Devido à baixa absorção intestinal de estrôncio em roedores, as doses eficazes de ranelato de estrôncio são mais elevadas do que nos seres humanos, a fim de alcançar as mesmas concentrações no sangue. Por conseguinte, uma exposição mais baixa do que a exposição clínica efetiva de estrôncio não conduz a efeitos benéficos sobre a massa e o volume ósseo em ratos (FUCHS et al., 2008), o que reforça a importância da utilização de dosagem de estrôncio apropriada para produzir um efeito eficaz no osso *in vivo* (MARIE, 2008; SAIDAK et al., 2012).

Ao comparar os grupos RanSr e HAAlgRanSr, observou-se menores concentrações plasmáticas de estrôncio e maior concentração de cálcio no grupo em que houve a implantação das microesferas de HA. Isso corrobora com o encontrado por Nascimento (2010), conforme observado nas tabelas 3, 4 e 5 e nos gráficos 10 e 11. Provavelmente, houve a incorporação de íons estrôncio na matriz

osteóide neoformada ou ainda a HA implantada localmente atuou como um absorvedor do metal estrôncio em excesso proveniente do sangue. A HA pode ter agido na depuração sanguínea, por apresentar a propriedade de atuar como absorvedor de metais (QIU et al., 2006; TIAN et al., 2009; WANG; YE, 2008).

Outro aspecto relevante ocorreu, quando comparou-se as microesferas de HAAlg com 2,5% de Alg não sinterizadas (HAAlgRanSr) do presente estudo, com a HA com 1% de alginato e sinterizada utilizadas por Nascimento (2010) (HARanSr), e o nosso piloto com HAAlg com 1% (HAAlgRanSr). A não sinterização e a maior concentração do alginato influenciaram as concentrações de estrôncio e cálcio. Estas concentrações de cálcio e estrôncio variaram da seguinte forma: HARanSr>HAAlgRanSr1%>HAAlgRanSr2,5%. As medianas das concentrações de cálcio e estrôncio para o grupo HAAlgRanSr com 2,5% de alginato foram as menores, quando comparadas com os outros dois grupos.

O ranelato de estrôncio promoveu aumento significativo de matriz osteóide. Isso se deve ao fato de o estrôncio possuir atuação no metabolismo ósseo por diversos mecanismos em células ósseas (FARLAY et al., 2005; MARIE, 2006; REGINSTER et al., 2008), conforme observado nas tabelas 7, 9, 10 11e 12. No entanto, no GRanSr, não houve restabelecimento completo da espessura óssea, e a associação com a HAAlg, um arcabouço tridimensional bioativo, favoreceu maior espessura de preenchimento do defeito ósseo (Tabela 12, gráficos 12G, 13G e 13H).

Nos grupos CCDC, RanSr e HAAlgRanSr para todos os pontos biológicos, a concentração de cálcio foi sempre maior do que a do estrôncio (Tabelas 3, 4,e 5, gráficos 10 e 11). No entanto, houve correlação fraca e inversa entre a concentração plasmática de cálcio e estrôncio.

O platô biológico do Sr^{+2} no grupo RanSr ocorreu aos 15 dias e reduziu gradativamente, conforme ocorreu o reparo ósseo e pela regulação fisiológica da homeostase em que tende a manter os níveis desse elemento-traço próximos aos encontrados no grupo CCDC (Gráfico 10).

No grupo HAAlgRanSr, as esferas de HA podem ter promovido a depuração plasmática do estrôncio, aos 15 e 45 dias, para o local do defeito crítico onde estavam implantadas. Isso pode ser verificado com uma maior concentração plasmática de estrôncio, aos 120 dias, quando as microesferas implantadas localmente já estavam fragmentadas e incorporadas à matriz mineralizada neoformada (Gráfico 10).

A HA apresenta uma alta capacidade de adsorção dos metais pesados e, dentre os alcalinos terrosos, o estrôncio (MA et al., 1995). Portanto, o estrôncio pode ter se depositado no tecido ósseo. No estudo de I. Barreto (2011), detectou-se, na análise por MEV com EDS, pequeno pico de estrôncio em regiões de borda óssea e de osso neoformado em defeito crítico em calvária de rato, aos 120 dias. Desse modo, observou-se que a concentração plasmática de Sr no grupo HAAlgRanSr foi muito baixa e semelhante à encontrada no grupo CCDC, quando comparado ao grupo RanSr.

No grupo RanSr, a concentração plasmática de cálcio foi menor, quando comparada à do grupo CCDC. Possivelmente, a alta concentração de Sr^{+2} no sangue (“hiperestroncemia”) ativou o mecanismo hormonal regulatório que fez reduzir a concentração plasmática do cálcio. Ou ainda, houve um aporte maior de Ca^{+2} no sítio do defeito, região de maior metabolismo ósseo, pelo estímulo à osteogênese promovido pela administração do ranelato de estrôncio para que houvesse a reparação óssea (Gráfico 11).

No grupo CCDC, há uma redução progressiva de Ca^{+2} no sangue, pois esse cálcio possivelmente está sendo incorporado ao osso neoformado. E, no grupo HAAlgRanSr, a concentração de cálcio no sangue tornou-se progressivamente maior e, aos 120 dias, observa-se que essa concentração é superior ao do grupo RanSr e ao do grupo CCDC (Gráfico 11). Possivelmente, após a fragmentação das microesferas implantadas no defeito crítico, houve aporte de íons cálcio para a circulação sanguínea. Além disso, deve-se ressaltar os mecanismos hormonais fisiológicos no controle da calcemia.

Por outro lado, uma associação da gelatina com o ranelato de estrôncio pode ser favorável, visto que ambas as terapias isoladamente apresentaram potencial osteogênico no reparo, conforme observado nas pranchas 5 e 12, respectivamente. A gelatina, como arcabouço local, e o ranelato, atuando nos mecanismos metabólicos, poderão trazer novas perspectivas na avaliação do reparo de defeitos ósseos. Entretanto, estudos prévios para verificar o comportamento biológico da gelatina e do colágeno hidrolisado como arcabouços ou como modificadores de superfície da hidroxiapatita são importantes antes de associá-los a outros biomateriais. O planejamento estratégico e preliminar desses materiais direciona a pesquisa de acordo com as qualidades ou limitações encontradas por cada biomaterial avaliado.



7 CONCLUSÕES

- Todos os biomateriais implantados apresentaram potencial osteogênico para o reparo ósseo.
- Os materiais implantados atuaram como um arcabouço tridimensional osteocondutor e, dentre estes, o polímero gelatina atuou como o melhor arcabouço bioativo para o reparo ósseo, com melhor restabelecimento anatômico da calvária.
- O maior restabelecimento ósseo da altura central do defeito foi obtido com a implantação de HAAI_g, entretanto, nesta matriz óssea neoformada havia fragmentos do biomaterial.
- Os biomateriais foram biocompatíveis. Entretanto, as microesferas de HAAI_g produziram inicialmente um processo inflamatório intenso, sem contudo, impedir a neoformação óssea.
- O fármaco ranelato de estrôncio, embora tenha tido um comportamento osteogênico, não possibilitou o restabelecimento completo da calvária, tanto no seu comprimento, quanto na sua espessura.
- A associação HAAI_gRanSr desfavoreceu o reparo ósseo pela redução da concentração plasmática de estrôncio e cálcio.



1. ABBAS, A. K. et al. **Fundamentos de Patologia – Robbins & Cotran**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
2. ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical-size calvarial defects. **The Journal of Materials Science**, London, v. 22, n. 4, p. 997-1004, 2011.
3. ALBERIUS, P. et al. Regeneration of cranial suture and bone plate lesions in rabbits. Implications for positioning of osteotomies. **Journal Craniomaxillofacial Surgery**, [S.l.], v.18, n. 6, p. 271-279, 1990
4. ALEXANDER, D. A.; HYUN, J. K.; DAVID, J. M. Alginate hydrogels as biomaterials. **Macromolecular Bioscience**, Weinheim, Germany, v. 6, n. 8, p. 623-633, 2006.
5. ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, A. J. Cross-linked alginate-gelatine beads: a new matrix for controlled release of pindolol. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 97, p. 431-439, 2004.
6. ALMEIDA, P. F. et al. FTIR Characterization of Gelatin from Chicken Feet. **Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, Libertyville, v. 6, p.1029-1032, 2012.
7. 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**, New York, v. 19, n.12, p. 2012-2020, 2004.
8. _____. Strontium ranelate treatment improves trabecular and cortical intrinsic bone tissue quality, a determinant of bone strength. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 22, p. 1419-1425, 2007.
9. AMSTUTZ, H. C. New advances in bone research. **Western Journal of Medicine**, v. 141, n. 1, p. 71-87, 1984.
10. ANDERSON, D. G.; BURDICK, J. A.; LANGER, R. Smart biomaterials. **Science**, Washington, v. 305, n. 5692, p.1923-1924, 2004.
11. ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, London, v. 20, n. 2, p. 86-100, 2008.
12. ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Bone tissue: morphological and histophysiological aspects. **Revista de Odontologia da UNESP**, São Paulo, v. 35, n. 2, p.191-98, 2006.
13. ANGELO, L. C. **Síntese e caracterização de nanocompósitos hidroxiapatita-gelatina obtidos pelo método de precipitação utilizando o método de Rietveld e IVTF**. 2008.122 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada)– Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.
14. ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 21, n. 7, p. 667-681, 2000.
15. APARECIDA, A. H. et al. Estudo da influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 892-896, 2007.

16. ARAÚJO, T. S.; SANTOS-FILHO, J. B. **Hidroxiapatita pura e dopada com Cr³⁺⁺: produção, propriedades e aplicação em biossensores**. 1. ed. Aracaju: [s.n.], 2008. Cap. 2, p.13-16.
17. ARLOT, M. E. et al. Histomorphometric and microCT analysis of bone biopsies from postmenopausal osteoporotic women treated with strontium ranelate. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 23, n. 2, p. 215-22, 2008.
18. ARONIN, C. E. P. et al. Comparative effects of scaffold pore size, pore volume, and total void volume on cranial bone healing patterns using microsphere-based scaffolds. **Journal Biomedical Materials Research A**, Hoboken, v. 89, n. 3, p. 632–641, 2009.
19. AUBIN, J. E.; LIU, F. The osteoblast lineage. In: BILIZEKIAN, J.; RAISZ, L.; RODAN, G., (Editors). **Principles of Bone Biology**. San Diego: Academic press: 1996, p. 39-50.
20. AUER, J. A. et al. Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. **BMC Musculoskeletal Disorders**, 2007. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2474/8/72>>. Acesso em: 30 jul. 2009.
21. AZAMI, M.; RABIEE, M.; MOZTARZADEH, F. A porous Gelatin/hydroxyapatite Nanocomposite Scaffolds for Bone Repair: In Vitro and In Vivo Evaluation. **Journal of biomaterial science. Polymer edition**, Utrecht, v. 31 n. 12, p. 2112-20, 2010.
22. BALASUNDARAM, G.; SATO, M.; WEBSTER, T. J. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 27, p. 2798-2805, 2006.
23. BARRETO, E. C. **Avaliação *in vivo* do reparo de defeito ósseo com biomaterial do tipo microesferas cerâmicas**. 2006.103 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia)–Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.
24. BARRETO, I. C. **Utilização de microesferas de hidroxiapatita no reparo de defeitos críticos em calvária de rato**. 2008.104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas)–Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro/Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.
25. _____. **Utilização de ranelato de estrôncio associado à biomateriais para regeneração óssea**. 2011. 182 f. Tese (Doutorado em Processos interativos dos Órgãos e Sistemas)–Universidade Federal da Bahia Instituto de Ciências de Saúde, Salvador, 2011.
26. BARRIAS, C. C. et al. Calcium Phosphate Microsphere for Localised Delivery of a Therapeutic Enzyme. **Key Engineering Materials**, Aedermannsdorf, v. 309-311, p. 903-906, 2006.
27. _____. Effect of calcium phosphate addition to alginate microspheres: modulation of enzyme release kinetics and improvement of cell adhesion. **Key Engineering Materials**, Aedermannsdorf, v. 284-286, p. 689-692, 2005.

28. BATISTA, T. M. **Mineralização *in vitro* de matrizes de colágeno aniônico derivadas de tecidos biológicos**. 2008. Tese (Doutorado em Química Analítica)–Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
29. BAUM, B. J.; MOONEY, D. J. The impact of tissue engineering on dentistry. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, [S.l.], v. 131, n. 3, p. 309-18, 2000.
30. BENTHAN. **Collagen Molecule**. [S.l.]: Disponível em: <<http://www.benthan.org/cgt1-1/ochiya/Ochiya-fig/f2-p35.gif>>. Acesso em: 12 dez. 2012.
31. BERNAL, V. M.; STANLEY, D.W. Stability of Bovine Muscle Connective Tissues. **Journal of Food Science**, Dallas, v. 52, n. 4, p. 876–878, July 1987.
32. BEST, S. M. et al. Bioceramics: past, present and for the future. **Journal of European Ceramic Society**, Barking, v. 28, p.1319-1327, 2008.
33. BET, M. R. et al. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 24, n.1, p.131-137, 2003.
34. BLAKE, G. M.; FOGELMAN, I. Long-term effect of strontium ranelate treatment on BMD. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 20, n. 11, p. 1901- 1904, 2005.
35. BONNELYE, E. et al. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption *in vitro*. **Bone**, New York, v. 42, 129-138, 2008.
36. BOROJEVIC, R. Terapias celulares e bioengenharia. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 78, supl. 1, p. 42-46, 2008.
37. BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. **Journal of Craniofacial Surgery**, Boston, v. 9, n. 4, p. 310-316, 1998.
38. BOYCE, B. F. et al. Recent advances in bone biology provide insight into pathogenesis of bone diseases. **Laboratory investigation**, Baltimore, v. 79, p. 83-94, 1999.
39. BRENNAN, T. C. et al. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 157, n. 7, p.1291-300, 2009.
40. BROWN, E. M. et al. G-protein-coupled, extra-cellular Ca (2+)-sensing receptor: a versatile regulator of diverse cellular functions. **Vitam Horm**, [S.l.], v. 55, p.1-71, 1999.
41. BROWN, E. M. Extracellular Ca²⁺ sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca²⁺ and other ions as extracellular (first) messengers. **Physiological reviews**, Bethesda, v. 71, p. 371-411, 1991.
42. BROWN, E. M.; CHATTOPADHYAY, N.; YANO, S. Calcium-sensing receptors in bone cells. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interact**, Kifissia, v. 4, p. 412-413, 2004.

43. BROWN, E. M.; MacLeod, R. J. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. **Physiological reviews**, Bethesda, v. 81, p. 239–297, 2001.
44. BROWN, E. M. Is the calcium receptor a molecular target for the actions of strontium in bone? **Osteoporosis international**, London, v. 14 p. S25-34, 2003. (Suppl 3).
45. BRUNEL, G. et al. Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking. **Journal of Periodontology**, [S.l.],v. 67, p. 1342-1348, 1996.
46. BURG, K. J. L.; PORTER, S.; KELAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 21, n. 23, p. 2347-2359, 2000.
47. CABRERA et al. Strontium and Bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v. 14, n. 5, 661-668, 1999.
48. CACCIAFESTA, V. et al. Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects. **European Journal of Orthodontics**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 733-740, 2001.
49. CARANO, A. D.; FILVAROFF, E. H. Angiogenesis and bone repair. **Drug discovery today**, Oxford, v. 8, n. 21, p. 980-984, 2003.
50. CARDOSO, A. K. et al. Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. **Cells Tissues Organs**, New York, v. 184, n. 3-4, p. 128-137, 2006.
51. CARVALHO, A. A. **Reparo ósseo de defeito crítico em calvária de rato com microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas)– Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2010.
52. CARVALHO, F. A. A. **Avaliação *in vivo* de matrizes tridimensionais de quitosana para a bioengenharia tecidual óssea**. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia)–Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia. 2008.
53. CAUDRILLIER, A., et al. Strontium ranelate decreases RANKL-induced osteoclastic differentiation *in vitro*: involvement of the calcium sensing receptor. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, v. 78, n. 4, p. 569-576, 2010.
54. CERRI, P. S. Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. **The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, Hoboken, v. 286, p. 833-40, 2005.
55. CIENCIA CON BUEN GUSTO. Gelatina. **[Artigos publicados]**, [S.l.: s.n.] Disponível em: <<http://www.telefonica.net/web2/cienciaconbuengusto/Novena/gomiciencias.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2011.
56. CHANG, W, et al. The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development. **Science Signaling**, Washington, v.1, n. 35, p. ra1, 2008.
57. CHAPLIN. Alginate – Water Structure and Science. **[Artigos publicados]**, [S.l.: s.n.], 2012. Disponível em: <<http://www.lsbu.ac.uk/agua/hyalg.html>>. Acesso em: 16 fev. 2013.

58. CHAVASSIEUX, P. et al. Bone histomorphometry of transiliac paired bone biopsies after 6 or 12 months of treatment with oral strontium ranelate in 387 osteoporotic women: randomized comparison to alendronate. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v. 29, n. 3, p. 618-628, 2014.
59. CHEN, Y. S.; KUO, S. M.; YAO, C.H. A review for gelatin used for artificial nerve and bone implants – 10-year retrospection. **Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications**, Singapore, v. 21, n. 4, p. 233-238, 2009.
60. CHESMEL, K. D. et al. Healing response to various forms of human desmineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 56, n. 7, p. 857-863, 1998.
61. CHIARA et al. Nanostructured Biomaterials for Tissue Engineered Bone Tissue Reconstruction. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.13, p. 737-757, 2012.
62. CHOUDHARY, S. et al. Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 22, p. 1002-1010, 2007.
63. CIAPETTI et al. Quantitative assessment of the response of osteoblast – and macrophage – like cells to particles of Ni-free Fe-base alloys. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 26, n. 8, p. 849-59, 2005.
64. 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**, Bauru v. 19, n. 4, p. 337-342, 2011.
65. COSTA, A. C. F. M. et al. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, [S.l.], v. 4.3, p. 29-38, 2009.
66. COSTA, A. M. et al. An experimental model for the study of craniofacial deformities. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, vol. 25, n. 3, p. 264-268, 2010.
67. COSTA, Z. M.; PONTUSCHKA, W. M.; CAMPOS, L. L. Study of the ESR signal of gamma irradiated hydroxyapatite for dose assessment. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, Amsterdam, v. 218, p. 283-288, 2004.
68. COVIELLO, T. et al. Hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 119, n. 1, p. 5-24, 14 May 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.01.004>>. Acesso em: 30 jul. 2012.
69. CROCI, A. T. et al. Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de formação óssea: estudo experimental. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v.11, n. 4, p. 230-239, 2003.
70. CROCI, A.T. Retarde de consolidação e pseudoartrose. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 26-34, 1997.
71. DAHL, S. G. et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. **Bone**, New York, v. 28, n. 4, p. 446-453, 2001.

72. DALCUSI, G., PASSUTI, N. Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 86-89, 1990.
73. DATTA, H. K. The cell biology of bone metabolism. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 61, n. 5, p. 577-87, 2008.
74. DAVIES, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. **Journal of Dental Education**, Washington, v. 67, n. 8, p. 932-949, 2003.
75. DEMBCZYNSKI, R.; JANKOWSKI, T. Characterisation of small molecules diffusion in hydrogel-membrane liquid-core capsules. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, p. 41-44, 2000.
76. D'HAESE et al. Measurement of strontium in serum, urine, bone, and soft tissues by Zeeman atomic absorption spectrometry. **Clin. Chem.**, Baltimore, v. 43, n. 1, p. 121-128, 1997.
77. DIETMAR, W. H.; GARCIA, A. J. Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells. **Gene**, Amsterdam, v. 347, n.1, p.1-10, 2005.
78. DIMITRIOU, R.; GIONNOUDIS, P.V. Discovery and development of BMPs. **International Journal of the Care of the Injured**, Bristol, v. 36, p. S28-S33, 2005.
79. DOROZHKIN, S. V.; EPPLE, M. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphate. **Angewandte Chemie**, New York, v. 41, n. 17, p. 3130-3146, 2002.
80. DOUBLIER, A. et al. Distribution of strontium and mineralization in iliac bone biopsies from osteoporotic women treated long-term with strontium ranelate. **European Journal of Endocrinology**, Bristol, v.165, n. 3, p. 469-476, 2011.
81. DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginate based new materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 21, p. 47-55, 1997.
82. _____. Alginates from algae. **Biopolymers Onlin**. [S.l.: s.n], 2005. Disponível em: <http://media.johnwiley.com.au/product_data/excerpt/51/35273134/3527313451-1.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2013.
83. DUCHEYNE, P.; QIU, Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 20, n. 23-24, p. 2287-2303, 1999.
84. EL-ADL, G. et al. Biphasic ceramic bone substitute mixed with autogenous bone marrow in the treatment of cavitary benign bone lesions. **Acta Orthopaedica Belgica**, Bruxelles, v. 75, n.1, p.110-118, fev. 2009.
85. ELLIOTT, J. C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. In: **Studies in Inorganic Chemistry**, Amsterdam, v. 18, Elsevier Sci., 1994.
86. EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). 2012. **Osseor** – procedural steps taken and scientific information after the authorization. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Procedural_steps_taken_and_scientific_information_after_authorisation/human/000561/WC500051122.pdf>. Acesso em: 24 maio 2013.

87. ENCYCLOPAEDIA BRITÂNICA *Online*. 2010. **Bone remodeling**. Disponível em: <<http://global.britannica.com/EBchecked/topic/684133/bone-remodeling>>. Acesso em: 15 jan. 2013.
88. ESCANERO, J. F.; CORDOVA, A. Effects of glucagon on serum calcium, magnesium and strontium levels in rats. **Mineral and Electrolyte Metabolism**, Basel, v. 17, n. 3, p.190-3, 1991.
89. FARIA, M. A. et al. Análise histológica da lesão óssea de mandíbula de coelho após aplicação local de cloreto de estrôncio. **Revista Gaúcha de Odontologia**. Porto Alegre, [S.l.], v. 58, n. 4, p. 487-490, 2010.
90. 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 Mineral Research**, Washington, v. 20, n. 9, p.1569-78, 2005.
91. FASSINA, L. et al. Use of a gelatin cryogel as biomaterial scaffold in the differentiation process of human bone marrow stromal cells. **Conference proceedings : Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference**, Piscataway, p. 247-50, 2010.
92. FERREIRA, G. R.; CESTARI, T. M.; GRANJEIRO, J. M.; TAGA, R. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v.15, p.175-180, 2004.
93. FLECKENSTEIN, K. B. et al. Effect of a hydroxyapatite tricalcium phosphate alloplast on osseous repair in the rat calvarium. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 77, n. 1, p. 39-45, 2006.
94. FIALLOS et al. Estudo histológico e imunohistoquímico do ranelato de estrôncio em defeitos críticos na calvária de ratos. In: V Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará, 2012. [Fortaleza]. [**Trabalhos apresentados**], [S.l.: s.n.]. 2012. Disponível em: <<http://www.prppg.ufc.br/eu2012.ufc.br/Resumos/wrappers/MostrarResumo.php?cpf=37846795368&cod=116>>. Acesso em: 24 maio 2013.
95. FOURNIER, C. et al. Reduction by strontium of the bone marrow adiposity in mice and repression of the adipogenic commitment of multipotent C3H10T1/2 cells. **Bone**, New York, v. 50, n. 2, p. 499-509, 2012.
96. FRAME, J. W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. **Journal Oral Surgery**, Chicago, v. 38, n 3, p.176-180, 1980.
97. FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p.113-136, 1998.
98. FUCHS, R. K. et al. Strontium ranelate does not stimulate bone formation in ovariectomized rats. **Osteoporosis International**, London, v.19, n. 9, p.1331-1341, 2008.

99. FUKUSHIMA, O.; BEKKER, P.J, GAY, C. Characterization of the functional stages of osteoclasts by enzyme histochemistry and electron microscopy. **The Anatomical Record**, New York, v. 231, p. 298-315, 1991.
100. FULMER, M. T. et al. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 751-755, 2002.
101. FURTH, M. E.; ATALA, A.; VAN DYKE, M. E. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. **Biomaterials**, Surrey, Amsterdam, v. 28, n. 34, p. 5068-5073, 2007.
102. GARCIA-MORENO, C. et al. Modulation of survival in osteoblasts from postmenopausal women. **Bone**, New York, v. 35, p.170-7, 2004.
103. GAROFALO, G. S. Autogenous, allogenic and xenogenetic grafts for maxillary sinus elevation: literature review, current status and prospects. **Minerva Stomatologica**, Torino, v. 56, n. 7-8, p. 373-392, 2007.
104. GASPERINI, F. M. **Avaliação da biocompatibilidade de nanohidroxiapatitas no reparo ósseo de tíbias de coelhos**. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas)–Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.
105. GÓES, J. C. et al. On the piezoelectricity of anionic collagen films. **Journal Physics Chemical Solids**, [S.l.], v. 63, n. 3, p. 465-470, 2002.
106. GOISSIS, A. P. A. **Análise estrutural do colágeno do tipo I – correlação estrutura: atividade biológica**. 112 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia)–Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
107. GOISSIS, G.; MAGINADOR, S. V. S.; MARTINS, V. C. A. Biomimetic mineralization of charged collagen matrices: *in vitro* and *in vivo* study. **Artificial Organs**, Cambridge, v. 27, p. 437-443, 2003.
108. GOMÉZ-GUILLÉN, M. C. et al. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. **Food Hydrocolloids**, Madrid, v. 16, p. 25-34, 2002.
109. GOUVEIA, D. S. **Obtenção de pós nanométricos de hidroxiapatita sintetizados com magnésio utilizando ultrassom**. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Materiais)–Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
110. GUIDE for the Care and Use of Laboratory Animals. 8. ed. 2011, 211 p. Science. Disponível em: <<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-Use-of-Laboratory-Animals.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2010.
111. GREEN, D. et al. The potential of biomimesis in bone tissue engineering: lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons. **Bone**, New York v. 30, n. 6, p. 810-815, 2002.
112. GRÉGOIRE, M.; ORLY, I.; MENANTEAU, J. The influence of calcium phosphate biomaterials on human bone cell activities. An *in vitro* approach. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken v. 24, n. 2, p.165-77, 1990.

113. GROSS, J.; FETTO, J.; ROSEN, E. Exame musculoesquelético. 2. ed. São Paulo: ARTMED, 2005, p.15.
114. HAJILOO, N.; ZIAIE, F.; MEHTIEVA, S. I. Gamma-irradiated EPR response of nano-structure hydroxyapatite synthesised via hydrolysis method. **Radiation Protection Dosimetry**, [S.l.], p.1-5, 2011.
115. HAO, X. J. et al. Angiogenic effects of sequential release of VEGFA (165) and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction. **Cardiovascular Research**, London, v. 75, p.178-185, 2007.
116. HILL, P. A.; ORTH, M. Bone remodeling. **British Journal of Orthodontics**, Oxford, v. 25, p.101-107, 1998.
117. HOBAR, P.C. et al. J.The importance of the dura in craniofacial surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Hagerston, v. 98, n. 2, p. 217-25, 1996.
118. HOLME, D.; PECK, H. Proteins. In: _____ (Org.). **Analitical Biochemistry**, 3. ed., cap.11, p. 381, 1998.
119. HORNEZ, J. C. et al. Biological and physico-chemical assessment of hydroxyapatite (HA) with different porosity. **Biomolecular Engineering**, Amsterdam, v. 24, p. 505-509, 2007.
120. HOTT, M. et al. S12911-2 reduces bone loss induced by short-term immobilization in rats. **Bone**, New York, v. 33, n.1, p.115-123, 2003.
121. HUGHES, J. M.; CAMERON, M.; CROWLEY, K. D. Structural variations in natural F, OH, and Cl apatites. **American Mineralogist**, Holly Springs, v. 74, p. 870-876, 1989.
122. HULBERT, S. F. et al. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 4, n. 3, p. 433-437, 1970.
123. 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. **The Journal of Biology and Chemistry**, Baltimore, v. 284, p. 575-584, 2009.
124. 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**, Chicago, v. 79, n. 7, p. 1217-1224, 2008.
125. IVANOVA, T. I. et al. Crystal Structure of Calcium-Deficient Carbonated Hydroxyapatite. Thermal Decomposition. **Journal of Solid State Chemistry**, [S.l.], v.160, n. 2, p. 340-349, 2001.
126. JUNQUEIRA, L. C. U. **Colágeno**: a molécula de múltiplas funções. São Paulo: USP, 2008. Disponível em:<<http://www.portaleducacao.com.br/biologia/artigos/1453/colageno-a-molecula-de-multiplas-funcoes>>. Acesso em: 10 out. 2011.
127. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: _____. (Org.) **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008. p. 111-128.

128. KAJIMA, K.; IMAI, M. Advanced Membrane Material from Marine Biological Polymer and Sensitive Molecular-Size Recognition for Promising Separation Technology. **Chemical Engineering**, [S.l.], 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/50734>>. Acesso em: 15 jan. 2013.
129. KARIM, A. A.; BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. **Food Hydrocolloids**, Boca Raton, v. 23, p. 563-576, 2009.
130. KATCHBURIAN, E.; CERRI, P.S. Formação e destruição óssea. In: CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A. N. (Org.). **Cirurgia para implantes**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. p. 437-45.
131. KAUFMAN, J. M. et al. Efficacy and safety of strontium ranelate in the treatment of osteoporosis in men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Chevy Chase, v. 98, n. 2, p. 592-601, 2013.
132. KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 518-522, 2000.
133. KNESER, U.; SCHAEFER, D. J.; POLYKANDRIOTIS, E.; HORCH, R. E. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Oxford, v.10, p. 7-19, 2006.
134. KOLAMBKAR, Y. M. et al. An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 32, p. 65-74, 2011.
135. KONSOUOLA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules α -amylase from *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 41, n. 2, p. 343-349, 2006.
136. KORCZAK, K. et al. The Crystal Structure of distrontium salt of 5-[bis (carboxymethyl) amino]-3-carboxymethyl-4-cyano-2-thiophenecarboxylic acid. **Book of Abstracts: The Sixth Multidisciplinary Conference on Drug Research**, [S.l.], p. 39-40, 2008. Disponível em: <<http://science24.com/paper/14814>>. Acesso em: 30 jan. 2013.
137. KUMAR, S. et al. An orally active calcium-sensing receptor antagonist that transiently increases plasma concentrations of PTH and stimulates bone formation. **Bone**, New York, n. 46, p. 534-542, 2010.
138. LAURENT, J. J. et al. The use of bone morphogenetic protein-6 gene therapy for percutaneous spinal fusion in rabbit. **Journal of Neurosurgery**, Princeton, v.1, n.1, p. 90-94, 2004.
139. LAWSON, A. C.; CZERNUSZKA, J. T. Collagen-Calcium phosphate composites. **Journal of Engineering in Medicine**, London, v. 212, n. 6, p. 413-425, 1998.
140. LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical Applications of Collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, vol. 221, p. 1-22, 2001.
141. LEE, D. W. et al. Effect of Irradiation on Degradation of Alginate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 4819-4823, 2003.

142. LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate. Properties and biomedical applications **Progress in Polymer Science**, Oxford, v. 7, n.1, p. 106-126, 2012.
143. LEE, K. Y.; ALSBERG, E.; MOONEY, D. J. Degradable and injectable poly (aldehyde guluronate) hydrogels for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Material Research**, Hoboken, v. 56, p. 228–233, 2012.
144. LEGEROS, R. Z. Biological and Synthetic Apatites. In: BROWN, P.W.; CONSTANTZ, B. (Org.). **Hydroxyapatite and Related Materials**, Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 3-28.
145. _____. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. **Chemical Reviews**, Washington, v. 108, p. 4742-4753, 2008.
146. _____. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. **Monographs in Oral Science**, Basel, Switzerland, v. 15, 1991.
147. _____. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, New York, n. 395, p. 81-98, 2002.
148. LEHNINGER, A. L.; NELSON, L. D.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: SARVIER, 2002, 1009 p.
149. LEO, W. J.; MCLOUGHLIN, A. J.; MALONE, D. M. Effects of sterilization treatments on some properties of alginate solutions and gels. **Biotechnology Progress**, [S.l.], v. 6, n.1, p. 51, 1990.
150. LI, J. et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, n. 4, p.1566-1571, 2000.
151. LI, X. et al. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 24, p. 578-588, 2009.
152. LI, Y. et al. Effects of strontium on proliferation and differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 418, n. 4, p. 725-730, 2012.
153. LIM, S. C.; LEE, M. J.; YEO, H. H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. **Pathology International**, Carlton South, v. 50, n. 8, p. 594-602, 2000.
154. LIMA, A. P. S. **Atividades antirreabsortiva e anti-inflamatória do ranelato de estrôncio na periodontite induzida em ratos**. 83 f. il. Dissertação (Mestrado em Odontologia)–Universidade Federal do Ceará, 2010.
155. LIN, K. I. K. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. **Biometrics**, Alexandria, v. 45, n.1, p. 255-268, 1989.
156. LIN, H. R.; YEH, Y. J. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and *in vitro* studies. **Journal Biomedical Materials Research - Part B**, New York, v. 71, p. 52-65, 2004.

157. LIU, D. M. et al. Structural evolution of sol-gel derived hydroxyapatite. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 23, n. 7, p.1679-1687, 2002.
158. LIU, B.; LEI, Y. T.; YANG, S. L. Structure Analysis of a Highly Hydrophilic Recombinant Human-Source Gelatin. **Chemistry Science Transaction**, [S.I.], v.1, n. 2, p. 347-354, 2012.
159. LOGEART-AVRAMOGLU, D. et al. Engineering bone: challenges and obstacles. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Oxford, v. 9, n.1, p. 72-84, 2005.
160. LONG, P. H. Medical devices in orthopedic applications. **Toxicologic Pathology**, Thousand Oaks, v. 36, n.1, p. 85-91, 2008.
161. LÓPEZ GARCÍA, J. A. **Surface Treatment of Collagen-based Biomaterials in Medical Applications**. 104 f. Thesis. (Doctoral in Chemistry and materials technology)–Tomas Bata University in Zlín, Faculty of Technology, Zlín, 2012.
162. LUDWIG, D. A. Use and Misuse of p-Values in Designed and Observational Studies: Guide for Researchers and Reviewers. **Aviation, Space, and Environmental Medicine**, Alexandria, v. 76, n. 7, p. 675-680, 2005.
163. MCCORMACK, P. Bone of contention: I didn't know... [S.I.]. Posted in 2010. Disponível em: <<http://www.petemccormack.com/blog/?p=5767>>. Acesso em 12 jan. 2012.
164. MACKIE, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **Internacional Journal Biochemistry Cell Biology**, Amsterdam, v. 35, n. 9, p. 1301-1305, 2003.
165. 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**, New York, v. 13, n. 5, p. 947-955, 2007.
166. MARIE et al. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. **Calcified Tissue International**, New York, v. 69, n. 3, 2001.
167. MARIE, P.J. Optimizing bone metabolism in osteoporosis: insight into the pharmacologic profile of strontium ranelate. **Osteoporosis International**, London, n. 14, p. 9-12, 2003. Suppl. 3.
168. _____. Effective doses for strontium ranelate. **Osteoporosis International**, London, v.19, p. 1815-1817, 2008.
169. _____. Strontium ranelate in osteoporosis and beyond: identifying molecular targets in bone cell biology. **Molecular Interventions**, [S.I.], v.10, p. 305-312, 2010.
170. _____. Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. **Current Opinion in Rheumatology**, Philadelphia, v. 18, S11-15, 2006. Suppl. 1.
171. MARINS, L. V. et al. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organicraft material. **Journal of Appl Oral Science**, Bauru, v. 12, p. 62-69, 2004.

172. MARKS, J. R. S. C.; POPOFF, S. N. Bone cell biology: the regulation of development, structure and function in the skeleton. **American Journal of Anatomy**, New York, v. 183, p.1-44, 1988.
173. MARTIN, R. M.; CORREA, P. H. S. Bone quality and osteoporosis therapy. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, São Paulo, v. 54, n. 2, p.186-199, 2010.
174. MARTINS, V. C. A.; GOISSIS, G. Colágeno aniônico como matriz para deposição orientada de minerais de fosfato de cálcio. **Polímeros: ciência e tecnologia**, São Carlos, p. 30-37, 1996.
175. MASTROGIACOMO, M. et al. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. **Orthodontics Craniofacial Research**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 277-284, 2005.
176. MAVROPOULOS, E. **A hidroxiapatita como absorvedor de metais**. 105 f. Dissertação (Mestrado em)–Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 1999.
177. MAXWELL, S. E.; DELANEY, H. D. **Designing experiments and analyzing data**. [S.l.]: Lawrence Erlbaum Associates, 2004. ISBN 0805837183, 9780805837186.
178. MEINEL, L. et al. Silk implants for the healing of critical size bone defects. **Bone**, New York, v. 37, n. 5, p. 688-698, 2005.
179. MENDES FILHO, A. A. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita e compósitos a partir de matéria-prima reciclada** 181 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais)–Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Minas. Rede Temática em Engenharia de Materiais, Ouro Preto, 2006.
180. MENTAVERRI, R., et al. The calcium sensing receptor is directly involved in both osteoclast differentiation and apoptosis. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 20, p. 2562-2564, 2006.
181. 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**. 158 f. Tese (Doutorado em Patologia Humana)–Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2008.
182. MIGUEL, F. B. et al. Morphological assessment of the behavior of three dimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, New York, v. 78, n. 2, p. 334-339, 2006.
183. MILLER, P. D. et al. Clinical use of teriparatide in the real world: initial insights. **Endocrine Practice**, Jacksonville, v.10, n. 2, p.139-48, 2004.
184. MILLER, S. C.; JEE, W. S. S. The bone lining cell: a distinct phenotype? **Calcified Tissue International**, New York, v. 41, p.1-5, 1987.
185. MILOVANOVIC, A.; BOZIC, N.; VUJCIC, Z. Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads. **Food Chemistry**, Norwich, v.104, p. 81-86, 2007.

186. MISCH, C. E. **Contemporary implant dentistry**. 3. ed. St. Louis: Mosby; 2007
187. MOTA, N. L. et al. Embriologia e histofisiologia do tecido ósseo: revisão de literatura e bases histofisiológicas das principais doenças ósseas metabólicas. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora de Fora, v. 27, n.1/2, p.27-32, 2008.
188. MOURA, C. C. G. **A influência do nano-recobrimento de cálcio e fósforo no processo de osteogênese *in vitro***. 71 f. Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia aplicadas)–Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.
189. MULLIKEN, J. B.; GLOWACKI, J. Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Hagerstown, v. 65, n. 5, p. 553-60, 1980.
190. MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**, Barking, v. 65, p. 2385-2406, 2005.
191. NAGASAWA, N. et al. Radiation-induced degradation of sodium alginate. **Polymer Degradation and Stability**, London, v. 69, p. 279-285, 2000.
192. NARAYAN, R. J. The next generation of biomaterial development. **A Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v. 368, p. 1831-1837, 2010.
193. NARAYAN, R. J. et al. Nanostructured ceramics in medical devices: applications and prospects. **JOM: Journal of the Minerals, metals, and Materials Society**, Warrendale, v. 56, n.10, p. 38-43, 2004.
194. 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.
195. NAVARRO, M. et al. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of the Royal Society Interface**, London, v. 5, p.1137-1158, 2008.
196. NIELSEN, S. P. The biological role of strontium. **Bone**, New York, v. 35, n. 3, p. 583-588, 2004.
197. NOAH, E. M. et al. Impact of sterilization on the porous design and cell behavior in collagen spongs prepared for tissue engineering. **Biomaterials**, Amesterdam, v. 23, p. 2855-2861, 2002.
198. NOBLE, B. Microdamage and apoptosis. **European Journal of Morphology**, [S.l.], v. 42, p. 91-98, 2005.
199. OESSER, S. et al. Oral administration of (14) C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.129, n. 10, p.1891-1895, 1999.
200. OLIVEIRA, S. H. S.; SOARES, M. J. G. O.; ROCHA, P. S. Uso de cobertura com colágeno e *aloe vera* no tratamento de ferida isquêmica: estudo de caso. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, [S.l.], v. 44, n. 2, p. 346-345, 2010.

201. ORIVE, G. et al. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 23, p. 3825-3831, 2002.
202. OTTERLEI, M. et al. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. **Journal of Immunotherapy**, New York, v.10, p. 286-91, 1991.
203. PARK, J. W. et al. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 20, n. 4, p. 372-378, 2009.
204. PAULA, F. L. **Avaliação *in vivo* de um compósito de hidroxiapatita e alginato no reparo ósseo**. 138 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia)– Universidade Federal do Rio de Janeiro/Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Odontologia, Salvador, 2008.
205. PESCHEL, G.; DASHE, H .M.; KANRAD, A. Growth of keratinocytes on porous films of poly (3-hydroxybutyrate) and poly(4-hydroxybutyrate) blended with hyaluronic acid and chitosan. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, New York, v. 85, p.1072-81, 2007.
206. PUBCHEM. **Alginato**. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6850754>>. Acesso em: 06 nov. 2012a.
207. _____. **Ranelato de estrôncio**. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6918182>>. Acesso em: 06 nov. 2012b.
208. QIU, K. et al. Effect of strontium ions on the growth of ROS 17/ 2.8 cells on porous calcium polyphosphate scaffolds. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 27, p. 1277-1286, 2006.
209. RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. Embriology and cellular biology of bone. In: AVIOLI, L. V.; KRANE, S. M.(Org.). **Metabolic bone diseases and clinically related disorders**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 1-22.
210. RAISZ, L. G. Screening for osteoporosis. **The New England Journal of Medicine** 3, Chicago, v. 53, n. 2, p.164-71, 2005.
211. RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa: UFV, 2009, 599 p.
212. RATNER, B. D. et al. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. 2nd. ed. [S.I.]: Elsevier Academic Press, p.125, 2004. Disponível em: <<http://www.efn.uncor.edu/escuelas/biomedica/Plandeestudios/materias%20completas/biomateriales/Biomaterials%20Science%20-%20An%20Introduction%20to%20Materials%20in%20Medici.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2012.
213. R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2013. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 30 jul. 2012.
214. REGINSTER, J. Y.; SAWICKI, A.; ROCES-VARELA , A. Strontium Ranelate: Long-term efficacy over 8 years in Post menopausal osteoporotic women. **Arthritis & Rheumatism**, [S.I.], v. 58, p. S941, 2008.

215. REGINSTER, J. Y. et al. Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis with strontium ranelate: results at 8 years. **Bone**, New York, v. 45, n. 6, p.1059-1064, 2009.
216. _____. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, Chevy Chase, v. 90, n. 5, p.2816-22, 2005.
217. RESENDE, C.X. **Estudo Teórico - Experimental de duas Soluções para Testes de Bioatividade e Revestimento de Metais**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, 2007.
218. RHO, J. Y.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical Properties and the Hierarchical Structure of Bone, **Medical Engineering; Physics**, London, v. 20, p. 92-102, 1998.
219. RICE et al. J. Quantitative assessment of the response of primary derived human osteoblasts and macrophages to a range of nanotopograph surfaces in a single culture model *in vitro*. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 24, n. 26, p. 4799-18, 2003.
220. RIGO, E. C. S.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. **Revista Dental Press Periodontia Implantology**, Maringá, v.1, n. 3, p. 39-50, 2007.
221. RIPAMONTI, U.; FERRETTI, C.; HELIOTIS, M. Soluble and insoluble signals and the induction of bone formation: molecular therapeutics recapitulating development. **Journal of Anatomy**, Oxford, v. 209, p. 447-468, 2006.
222. RIZZOLI, R. Beneficial effects of strontium ranelate compared to alendronate on bone micro structure: a 2-year study. **Osteoporosis International**, London, v. 21, p. S25-S388, 2010. Suppl. 1.
223. RIZZOLI, R. et al. Effects of strontium ranelate and alendronate on bone microstructure in women with osteoporosis. Results of a 2-year study. **Osteoporosis International**, London, v. 23, p. 305-315, 2012.
224. ROCHA, L. B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M. A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 23, p. 449-456, 2002.
225. RODRIGUES, V. **Análises dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)–Inter-unidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
226. RODRÍGUEZ-LORENZO, L. M.; VALLET-REGÍ, M. Controlled crystallization of calcium phosphate apatites. **Chemistry of Materials**, [S.I.], v. 12, p. 2460-2465, 2000.
227. ROGERO, S. O.; BRAGA, F. J. C.; HIGA, O. Z. Cytotoxicity test for bioceramics of calcium phosphate. **Material Science Forum**, [S.I.], v.299-300, n.1, p. 44-47, São Paulo, 1999.

228. ROLIM, A. E. H. **Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito crítico, em calvária de rato.** 91 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia)—Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2010.
229. ROSE, F. R. A. et al. *In vitro* assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 25, n. 24, p. 5507-14, 2004.
230. ROUSSELOT® Gelatinas – dedicada ao seu sucesso. Disponível em: <<http://www.rousselot.com.cn/.../brochures/?>>. Acesso em: 10 jan. 2013.
231. ROUSSENOVA, M. et al. A nanostructural investigation of glassy gelatin oligomers: molecular organization and interactions with low molecular weight diluents. **New Journal of Physics**, [S.l.], v. 14, p.1-18, 2012.
232. ROWLEY, J. A. et al. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 20, p. 45- 53, 1999.
233. SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, J. T. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **European Cells and Materials**, Glasgow, v. 5, p. 29-40, 2003.
234. SAGMA, 2004 - Associação dos Fabricantes de Gelatina da América do Sul. Disponível em: <<http://www.sagma-gelatina.com/gelatina.asp>>. Acesso em: 06 nov. 2012.
235. SAIDAK, Z. et al. Agonists and allosteric modulators of the calcium-sensing receptor and their therapeutic applications. **Molecular Pharmacology**, [S.l.], v. 76, p.1131-1144, 2009.
236. _____. Strontium ranelate rebalances bone marrow adipogenesis and osteoblastogenesis in senescent osteopenic mice through NFATc/Maf and Wnt signaling. **Aging Cell**, Bethesda, v.11, p. 467-474, 2012.
237. SAIDAK, Z.; MARIE, P. J. Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. **Pharmacology Therapeutics**, Oxford, v.136, n. 2, p. 216-26, 2012.
238. SAIDAK, Z.; MENTAVERRI, R.; BROWN, E. M. The role of the calcium-sensing receptor in the development and progression of cancer. **Endocrine Reviews**, Chevy Chase, v. 30, p.178-195, 2009.
239. SANO, A. et al. Atelocollagen for protein and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 55, n.12, p.1651-1677, 2003.
240. SANT'ANNA, G. R. **Efeito da radiação infravermelha próxima associada a creme fotoabsorvante em esmalte dentário decíduo.** 195 p. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica)—Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2009.
241. SANTOS, L. A. **Desenvolvimento de cimentos de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médica-odontológica.** 242 p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica)—Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2002.

242. SARTORIS, D. J. et al. Coralline hydroxyapatite bone-graft substitutes in a canine metaphyseal defect model. Radiographic-histometric correlation. **Investigative Radiology**, Hagerstown, v. 21, n.11, p. 851-857, 1986.
243. SCHLIEPHAKE, K.; NEUKAM, F. G.; KLOSA, D. Influence of pore dimensions on bone ingrowth into porous hydroxyapatite blocks used as bone graft substitutes: A histometric study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 20, n.1, p. 53-58, 1991.
244. SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, New York, n. 205, p. 299-308, 1986.
245. SCULEAN, A. et al. Effect of an enamel matrix protein (Emdogain[®]) on ex vivo dental plaque vitality. **Journal of Clinical Periodontology**, Malden, v. 28, p. 1074–1078, 2001.
246. SEN, M. et al. Effect of G/M ratio on the radiation-induced degradation of sodium alginate. **Radiation Physics and Chemistry**, New York, v. 79, p. 279-282, 2010.
247. SENA, L. A. **Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita – colágeno para aplicações biomédicas**. 107 f. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais)–Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto Alberto Luiz Coimbra, Rio de Janeiro, 2004.
248. SHEKARAN, A.; GARCIA, A. J. Nanoscale engineering of extracellular matrix-mimetic bioadhesive surfaces and implants for tissue engineering. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1810, p. 350-360, 2011.
249. SHEPPARD, E.; HOUCK, R. C. The structure of gelatin sols and gels. Part V. The Insolubilization of Gelatin by Heat **The Journal of Physical Chemistry**, [S.I.], v. 34, n. 273, p. 2885- 2900, 1930.
250. SHIMAZAKI, K.; MOONEY, V. Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute. **Journal of Orthopaedic Research**, Hoboken, v. 3, n. 3, p. 301-310, 1985.
251. SHIMOKOMAKI, M. Cross-links in cartilage collagen fibers. In: Brazilian Congress on Protein, 1990, Campinas. **Proceedings**. Campinas: Ed. UNICAMP, 1991. p. 422-432.
252. SHIN, M. H. et al. Modulation of collagen metabolism by the topical application of dehydroepiandrosterone to human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, New York, v. 124, n. 2, p. 315-23, 2005.
253. SIVAKUMAR, M.; RAO, K. P. Preparation, Characterization and *In Vitro* Release of Gentamicin from Coralline Hydroxyapatite-Gelatin Composite Microspheres, **Biomaterials**, Amsterdam, v. 23, p. 3175-3181, 2002.
254. SILVA, S. V. **Mineralização biomimética in vivo e in vitro de matrizes de colágeno aniônico**: modelo de biomineralização. 2005. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências, Química Analítica)–Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

255. SILVERMAN, S. L. et al. Effectiveness of bisphosphonates on nonvertebral and hip fractures in the first year of therapy: the risedronate and alendronate (REAL) cohort study. **Osteoporosis International**, London, v.18, n.1, p. 25-34, 2007.
256. SIMÕES, R. D. et al. Aspectos do Metabolismo Ósseo: Osteoporose. In: Rodrigues L. G; Baracat E. C. **Ginecologia Endócrina**, 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 272-282. 1995.
257. SIRIS, E. S. et al. The effect of age and bone mineral density on the absolute, excess, and relative risk of fracture in postmenopausal women aged 50-99: results from the National Osteoporosis Risk Assessment (NORA). **Osteoporosis International**, London, v.17, n. 4, p. 565-74, 2006.
258. SMITH, J. W. Molecular pattern in native collagen. **Nature**, Londres, v. 219, p. 157-63, 1968.
259. SODEK, J, MCKEE, M. E. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 24, p. 99-126, 2000.
260. SOUZA, M. P. G. Diagnóstico e tratamento da osteoporose. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 220-229, 2010.
261. STEVENS, M. M.; GEORGE, J. H. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. **Science**, Washington, v. 310, n.18, p.1135-1138, 2005.
262. STEVENS, M. M. Biomaterials for bone tissue engineering. **Materials today**, [S.l.], v.11, n. 5, p.18-25, 2008.
263. SUN, J. Y. et al. Highly stretchable and tough hydrogels. **Nature**, London, v. 489, p.133-136, 2012.
264. TADIC, D.; EPPLER, M. A thorough physicochemical characterization of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 25, p. 987-994, 2004.
265. TAKAGI, K.; URIST, M. R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. **Annals of Surgery**, [S.l.], v.196, p.100-109, 1982.
266. TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **Journal Periodontal Research**, Malden, v. 40, p. 287-93, 2005.
267. 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
268. TANIWAKI, N. N.; KATCHBURIAN, E. Ultrastructural and lanthanum tracer examination of rapidly resorbing rat alveolar bone suggests that osteoclasts internalize dying bone cells. **Cell Tissue**, Berlim, v. 293, p.173-6,1998.
269. TAUBENBERGER, A. V. et al. The effect of unlocking RGD-motifs in collagen I on pre-osteoblast adhesion and differentiation. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 31, p. 2827-2835, 2010.
270. TEIXEIRA, L. J. C. **Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos**. 71 f. 2009. Dissertação (Mestrado em Odontologia)–Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2009.

271. TERRA, J. et al. The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v.11, p. 574, 2009.
272. 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**, Norwell, v. 20, n. 7, p. 1505-1512, 2009.
273. TURNBULL, R. S.; FREEMAN, E. Use of wounds in the parietal bone of the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects. **Journal of Periodontal Research**, Malden, v. 9, n.1, p. 39-43, 1974.
274. UCHIDA, A. et al. The use of ceramics for bone replacement. A comparative study of three different porous ceramics. **Journal of Bone and Joint Surgery**, London, v. 66, n. 2, p. 269-274, 1984.
275. VAN BLITTERSWIJK, C. A. et al. Macropore tissue ingrowth: a quantitative and qualitative study on hydroxyapatite ceramic. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 7, n. 2, p.137-143, 1986.
276. VARANI, J. et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. **The American Journal of Pathology**, New York, v.168, n. 6, p. 861-8, 2006.
277. WAN, D. C. et al. Differential Gene Expression between Juvenile and Adult Dura Mater: A Window into What Genes Play a Role in the Regeneration of Membranous Bone. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Hagerstown, v.118, p. 851-861, 2006.
278. WANG, X. et al. The Role of Collagen in Determining Bone Mechanical Properties. **Journal of Orthopaedics Research**, Hoboken, v. 19, p. 1021-1026, 2001.
279. 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**, Norwell. v.19, n. 3, p.1183-1186, 2008.
280. WELCH, W.; HAMAR, W.; FETTMAN, J. Method comparison for calcium determination by flame atomic absorption spectrophotometry in the presence of phosphate. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 36, n. 2, p. 351-354, 1990.
281. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Strontium and strontium compounds. Concise International Chemical Assessment Document 77**. 2010, 1-35. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad77.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2010.
282. YANG, D.; JONES, K. S. Effect of alginate on innate immune activation of macrophages. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, New York, v. 90, n. 2, p. 411-418, 2009.
283. ZABEU, J. L. A.; MERCADANTE, M. T. Substitutos ósseos comparados ao enxerto ósseo autólogo em cirurgia ortopédica: revisão sistemática da literatura. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 59-68, mar. 2008.

284. ZANABONI, G. et al. Stability and Networks of Hydrogen Bonds of the Collagen Triple Helical Structure: Influence of pH and Chaotropic Nature of Three Anions. **Matrix Biology**, Amsterdam, v.19, p. 511-520, 2000.
285. ZHAI, Y., CUI, F. Z.; WANG, Y. Formation of Nano-Hydroxyapatite on Recombinant Human-Like Collagen Fibrils. **Current Applied Physics**, Amsterdam, v. 5, p. 429-432, 2005.
286. ZHANG, L. et al. Effects of Crystalline Phase on the Biological Properties of Collagen-Hydroxyapatite Composites. **Acta Biomaterialia**, Kidlington, v. 6, p. 2189-2199, 2010.
287. ZHANG, Y. F. et al. Three-dimensional nanohydroxyapatite/ chitosan scaffolds as potential tissue-engineered periodontal tissue. **The Journal of Biomaterials Applications**, London, v. 21, n. 4, p. 333-349, 2007.
288. ZHU, L. L. et. al. Induction of a program gene expression during osteoblast differentiation with strontium ranelate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 355, n. 2, p. 307-311, 2007.
289. ZIMMERMANN, U. et al. Production of mitogen contamination free alginates with variable ratios of mannuronic to guluronic acid by free flow electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v.13, p. 269-74, 1992.



ANEXO A- Certificado de análise da gelatina comestível



Gelatina Comestível - Certificado de Análise

Lote N°: 5090546/1	Tipo: Rousselot 225 H 30
Data de fabricação: AGO-2009	Data de validade: AGO-2014

Esta gelatina atende o RIISPOA - DECRETO nº 30.691 - Art. 433 Ministério da Agricultura do Brasil

ANÁLISES	UNIDADES	RESULTADOS
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS		
BLOOM (Sol. 6,66%)	g	228
VISCOSIDADE (Sol. 6,66%)	mPa.s	3.39
ODOR		Característico
COR		<=3.5
CINZAS	%	<= 2.00
UMIDADE	%	11.7
pH		5.3
SO2	ppm	<= 40.00
CROMO (***)	ppm	<= 5.00
ARSÊNICO (*)	ppm	<= 1.00
NITROGÊNIO (**)	%	>= 15.00
PROPRIEDADES MICROBIOLÓGICAS		
CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS	UFC/g	<=1000
COLIFORMES TOTAIS EM 1g		Ausente
COLIFORMES FECAIS EM 1g		Ausente
<i>Salmonella sp em 25g</i>		Ausente
<i>E. coli em 1g</i>		Ausente

* Esta característica é monitorada a cada dois meses em laboratório externo qualificado.

** Esta característica se considera como qualidade assegurada.

*** Esta característica é monitorada semanalmente.

**** Esta característica é analisada em laboratório externo qualificado.

***** Esta característica é analisada semestralmente em laboratório externo qualificado.

-Validação da qualidade

Assinatura:

Rousselot Gelatinas do Brasil SA
Rua Santo Agostinho, 280 - Cx. Postal 11
Distrito de Arcadas - Amparo - SP - Brasil
CEP: 13908-080

Tel.: +55 (19) 3907.9000
Fax.: +55 (19) 3907.9010

Rousselot is a VION Ingredients company

ANEXO B - Certificado de análise do colágeno hidrolisado



Colágeno Hidrolisado - Certificado de Análise

Lote N°: 1132416X	Tipo: Peptan B
Data de fabricação: OUT-2010	Data de validade: OUT-2015

Esta gelatina atende o RIISPOA - DECRETO nº 30.691 - Art. 433 Ministério da Agricultura do Brasil

ANÁLISES	UNIDADES	RESULTADOS
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS		
VISCOSIDADE (Sol. 20% - 25 °C)	mPa.s	4.13
CLARIDADE	NTU	<=10
DENSIDADE APARENTE	g/ml	0.46
ODOR		Característico
COR		<=3,5
CINZAS	%	<= 2.00
UMIDADE	%	7,2
pH		5.9
SO ₂	ppm	<= 40.00
CROMO (***)	ppm	<= 5.00
ARSÊNICO (*)	ppm	<= 1.00
PROTEÍNA	%	>= 90.00
PROPRIEDADES MICROBIOLÓGICAS		
CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS	UFC/g	<=1000
COLIFORMES TOTAIS EM 1g		Ausente
COLIFORMES FECAIS EM 1g		Ausente
<i>Salmonella</i> sp em 25g		Ausente
<i>E. coli</i> em 1g		Ausente

* Esta característica é monitorada a cada dois meses em laboratório externo qualificado.

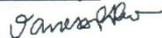
** Esta característica se considera como qualidade assegurada.

*** Esta característica é monitorada semanalmente.

**** Esta característica é analisada em laboratório externo qualificado.

***** Esta característica é analisada semestralmente em laboratório externo qualificado.

-Validação da formulação

Assinatura: 

Rousselot Gelatinas do Brasil SA
Rua Santo Agostinho, 280 - Cx. Postal 11
Distrito de Arcadas - Amparo - SP - Brasil
CEP: 13908-080

Tel.: +55 (19) 3907.9000
Fax.: +55 (19) 3907.9010

Rousselot is a VION Ingredients company

ANEXO C - Frequências de vibração ativa em infravermelho da HA e OCP

Tabela - Frequências de vibração ativa em infravermelho da HA e OCP

Bandas (cm⁻¹)	Interpretação
3568-3574, 3550, 3536	OH (v ₁)
3500	H ₂ O
2400-3200	PO-H
1635-1640	H ₂ O
1534-1548, 1455	CO ₃ ²⁻ (v ₃) sítio A
1515	CO ₃ ²⁻ AB
1350-1540, 1498-1500, 1470-1471, 1465-1467, 1449- 1460, 1414-1430, 1417-1419, 1410-1412, 1321	CO ₃ ²⁻ sítio B
1143-1145	HPO ₄ ²⁻ (v ₃)
1138, 1126, 1108, 1105, 1075	HPO ₄ ²⁻ (OCP)
1090-1100, 1096, 1088-1092, 1085, 1077-1081, 1052-1065, 1064, 1057-1061, 1048-1053, 1034-1046, 1041-1045, 1032- 1034, 1036, 999-1004, 1095, 960-1200	PO ₄ ³⁻ (v ₃)
1038, 1022, 1025, 920	PO ₄ ³⁻ (OCP)
1020	HPO ₄ ²⁻ (HA deficiente em Ca)
950-1000, 980-982, 959-966	PO ₄ ³⁻ (v ₁)
878-883	CO ₃ ²⁻ (v ₂) sítio A
872-877, 870	CO ₃ ²⁻ (v ₂) sítio B
866-870	Vibração P-OH em HPO ₄ ²⁻
629-635, 342	OH ⁻
629-633, 614-615, 600-608, 590-592, 580-581, 573-574, 568	PO ₄ ³⁻ (v ₄)
540-550, 520-535	HPO ₄ ²⁻
467-472, 446-450, 431-433	PO ₄ ³⁻ (v ₂)

Fonte: Resende, 2007.

ANEXO D - Ofício de aprovação do projeto de pesquisa pelo CEUA- UEFS

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

Ofício: 57/2012

Feira de Santana, 08 de dezembro de 2012.

DE: Iraci Gomes Bonfim
CEUA/UEFS

PARA: Fabiana Paim Rosa
Prezada Senhora,

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

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, reading "Iraci Gomes Bonfim", is written over a horizontal line. Below the line, the name "Iraci Gomes Bonfim" is printed in a standard font.

Coordenadora em exercício na CEUA-UEFS

ANEXO E - Parecer final do projeto de pesquisa pelo CEUA- UEFS



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

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

Protocolo nº 004/2010

Pesquisador Responsável: Prof.^a Fabiana Paim Rosa

PARECER FINAL

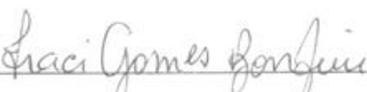
O parecerista foi **FAVORÁVEL** à execução do projeto por considerar que:

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

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

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

Feira de Santana, 08 de dezembro de 2012.



Itaci Gomes Bonfim
Coordenadora em exercício da CEUA-UEFS



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>