

# UFBA

Universidade Federal da Bahia  
Instituto de Ciências da Saúde

SUELEN CRISTINA DA SILVA



## **Avaliação biológica de compósitos de hidroxiapatita e alginatodopados com estrôncio no reparo ósseo**

Salvador  
2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**SUELEN CRISTINA DA SILVA**

**Avaliação biológica de compósitos de hidroxiapatita e alginato  
dopados com estrôncio no reparo ósseo**

Salvador  
2015

**SUELEN CRISTINA DA SILVA**

**Avaliação biológica de compósitos de hidroxiapatita e alginato dopados com estrôncio no reparo ósseo**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Paim Rosa

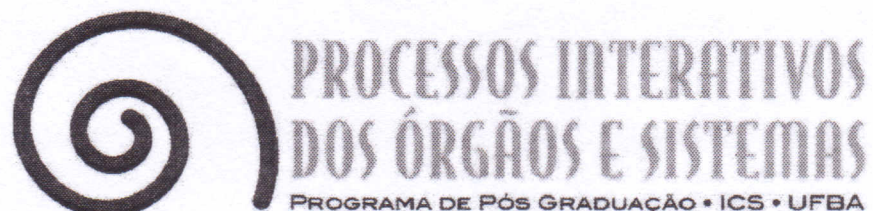
Salvador  
2015

Silva, Suelen Cristina  
Avaliação biológica de compósitos de hidroxiapatita e alginato  
dopados com estrôncio no reparo ósseo / Suelen Cristina Silva. --  
Salvador, 2015.  
58 f. : il

Orientador: Fabiana Paim Rosa.  
Dissertação (Mestrado - Processos Interativos dos Órgãos e  
Sistemas) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto Ciências  
da Saúde, 2015.

1. Biomateriais. 2. Estrôncio . 3. Hidroxiapatita. 4.  
Regeneração Óssea. I. Paim Rosa, Fabiana. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



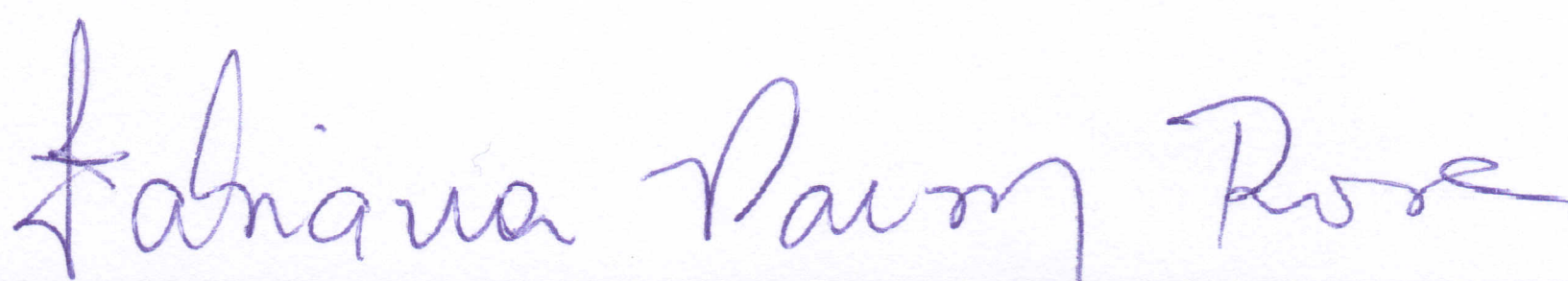
**TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO**

SUELEN CRISTINA DA SILVA

**AValiação BIOLÓGICA DE COMpÓSITOS DE HIDROXIAPATITA E ALGINATO DOPADO COM  
ESTRôNCIO NO REPARO ÓSSEO**

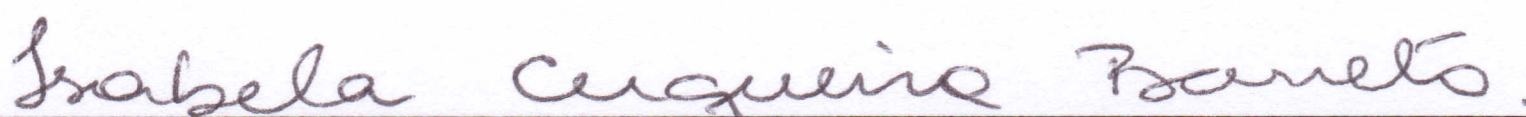
**Salvador, Bahia, 15 de dezembro de 2015**

COMISSÃO EXAMINADORA:



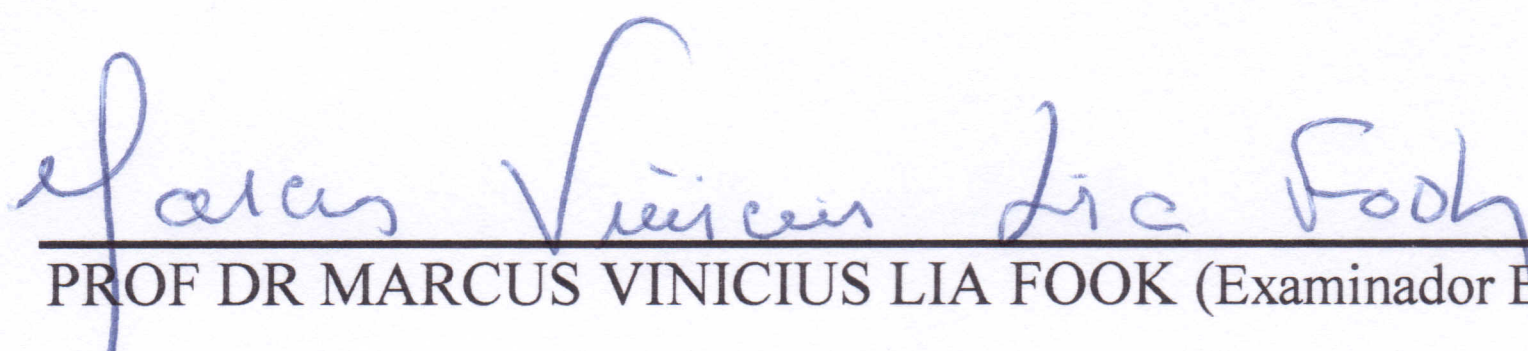
---

PROFA DRA FABIANA PAIM ROSA (Orientador)



---

PROFA DRA ISABELA CERQUEIRA BARRETO (Examinador Interno)



---

PROF DR MARCUS VINICIUS LIA FOOK (Examinador Externo)

Aos meus pais, Nazário (*in memoriam*) e Clementina, por sempre acreditarem no meu potencial. Obrigada por tudo!

Mãe, todo amor do mundo pra você.

**Pai, gostaria muito que você estivesse aqui!**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo cuidado e força, pela presença constante em minha vida e por guiar meus passos.

Ao meu pai, Nazário (*in memoriam*), sei que sempre estará comigo. Obrigada, Pai, pelos ensinamentos, por me dar forças nos momentos difíceis e principalmente por ter apoiado meus sonhos, mesmo sabendo que eu ficaria longe de você.

A minha mãe Clementina, por me apoiar, entender minha ausência e acreditar em mim em todos os momentos. Mãe, espero um dia te orgulhar, você e o pai sempre serão minha inspiração.

Aos meus queridos irmãos Cláudio, Wilson, Gilson e Silmara, por todo apoio e incentivo constantes.

Aos meus sobrinhos Caio, Kelvin, Murilo e Leonardo, por compreenderem minha ausência. Vocês me impulsionam a ser uma pessoa e profissional melhor. Amo muito vocês.

A Cecília, por acreditar em mim, pelo companheirismo, cuidado e pelo apoio em todos os momentos. Obrigada Pre, por toda paciência e incentivo.

À minha querida prima Júlia, por estar comigo em todos os momentos, por sempre me apoiar e incentivar. Prima, amo muito você.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Paim Rosa, pela confiança, pelos ensinamentos, dedicação e paciência. Aprendi muito com você.

Ao Prof. Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior, pelo tempo dedicado a análise das lâminas.

Às técnicas do laboratório do Instituto de Patologia Geral e Cutânea (IPAC), Cristina Elisângela, por todo cuidado com o processamento das amostras e confecção das lâminas.

Ao Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo, coordenador do programa de Pós-Graduação, pela compreensão nos momentos difíceis.

Ao pesquisador Alexandre Malta Rossi e à técnica Silvia Albuquerque, do Centro Brasileiro de Pesquisa Física, pela síntese, caracterização e concessão do biomaterial utilizado neste estudo, e por toda atenção e respeito.

Ao meu amigo Fúlvio Miguel, por todo ensinamento e toda ajuda na formatação desse trabalho. Serei sempre grata a você.

À minha amiga Vanessa Castro, pelo apoio e pela ajuda com a esterilização dos equipamentos cirúrgicos. Muito obrigada, Van.

A todos os meus amigos que sempre me impulsionam: Flávia, Alzira, Fernanda Jora, Diego, Tatiana Marla, Tatiana Pacheco, Anderson e Veridiana.

A todos os familiares que torcem por mim, em especial a Euzemi Aquino e Jaqueline Paes.

Aos colegas do grupo LBTB, Renata, Luciana, Tamaiara, Saniele, em especial, Iorrana e Anderson. Obrigada por toda ajuda.

Aos meus amigos e irmãos que a vida me deu, Luísa e George, por trilharem esse caminho comigo e por tornar tudo mais leve.

Aos secretários do PIOS: Marcelo, Célia e Oelma, por todo cuidado, respeito e destreza em realizar suas funções.

A todos os professores do PIOS: foi uma honra aprender com vocês.

Aos colegas do PIOS, pela convivência e aprendizado.

Ao Junior, funcionário do biotério, pela dedicação e cuidado com os animais. Sem você este trabalho não teria acontecido. Muito obrigada.

À FAPESB, pela bolsa concedida.

À CAPES e FAPESB, pelo apoio financeiro ao desenvolvimento do projeto.

Aos animais: sem eles esse trabalho não seria possível.

A todas as pessoas que direta e indiretamente me ajudaram neste caminho e torcem por minha vitória.



“Comece fazendo o necessário, depois o que é possível e de repente você estará  
fazendo o impossível.”

**Chico Xavier**

SILVA, Suelen Cristina. **Avaliação biológica de compósitos de hidroxiapatita e alginato dopados com estrôncio no reparo ósseo**. Salvador, 2015. 58 f. il. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O aumento populacional pode ter diferentes consequências, tais como doenças degenerativas por senescência, aumento do número de acidentes automobilísticos, dentre outras. Nesse pressuposto, o aperfeiçoamento dos biomateriais tem se destacado e representa alternativas para reparar lesões consideradas críticas. Um dos principais biomateriais utilizados é a hidroxiapatita sintética, pura ou associada a metais ou polímeros, como o objetivo de aperfeiçoar suas propriedades físico-químicas. **OBJETIVOS:** 1) Avaliar o comportamento osteogênico de microesferas de compósitos de hidroxiapatita nanoestruturada, dopada com estrôncio em diferentes concentrações, associada ao alginato, após a implantação em defeito ósseo crítico em rato. 2) Analisar o efeito biológico das diferentes concentrações do estrôncio. **METODOLOGIA:** Utilizaram-se 15 ratos, distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais, com 5 animais em cada grupo, avaliados com 15 dias de pós-operatório: **Grupo nHASr2-alg** – defeito ósseo crítico, preenchido com microesferas de hidroxiapatita nanoestruturada dopada com estrôncio 2%, associada ao alginato a 1,5%. **Grupo nHASr5-alg** – defeito ósseo crítico, preenchido com microesferas de hidroxiapatita nanoestruturada, dopada com estrôncio a 5% associada ao alginato a 1,5%. **Grupo Controle (GC)** – defeito ósseo crítico sem implantação de biomaterial. **RESULTADOS:** Os resultados histológicos evidenciaram, nos **Grupos nHASr2-alg** e **nHASr5-alg**, reação inflamatória crônica granulomatosa e angiogênese. No grupo **nHASr2-alg**, as microesferas preencheram toda a extensão do defeito com múltiplas camadas e a formação de matriz osteoide se limitou às bordas do defeito, enquanto que no grupo **nHASr5-alg** as microesferas se limitaram às bordas e à região intermediária do defeito, porém, foi possível observar ilhotas de matriz osteoide por toda a extensão do defeito. No **Grupo Controle**, notou-se resposta inflamatória crônica discreta, formação óssea reacional próxima às bordas ósseas e preenchimento da área remanescente com tecido conjuntivo frouxo. **CONCLUSÃO:** No Grupo Controle, a neoformação óssea foi reparativa. Nos grupos que receberam biomaterial, as microesferas foram osteocondutoras e as diferentes concentrações do estrôncio foram biocompatíveis.

**Palavras-chave:** Biomateriais. Estrôncio. Hidroxiapatita. Regeneração óssea.

SILVA, Suelen Cristina. **Biological evaluation of hydroxyapatite composite and alginate doped with strontium on bone healing.** Salvador, 2015. 58 s. ill. Dissertation (Master's Degree in Interactive Processes of Systems and Organs) – Health Science Institute, Federal University of Bahia, Salvador.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The population increase can have different consequences such as: degenerative diseases due to senescence, Increase in the number of auto accidents, among others. In this assumption, the improvement of biomaterials has been highlighted and represent alternatives to repair injuries considered as critical. One of the main biomaterials used is synthetic hydroxyapatite, pure or associated with metals or polymers, as the objective of improving its physico-chemical properties. **OBJECTIVES:** 1) To evaluate the osteogenic behavior of nanostructured HA doped with strontium composite microspheres in different concentrations, associated with alginate after implantation in a critical bone defect in rats. 2) To analyze the effect biological analysis of the different concentrations of strontium. **METHODOLOGY:** Fifteen rats randomly distributed in three experimental groups with 5 animals in each group were evaluated 15 days postoperatively: **nHASr2-alg group** - critical bone defect filled with hydroxyapatite microspheres nanostructured doped with 2% strontium associated with 1.5% alginate. **nHASr5-alg group** - critical bone defect filled with microspheres of nanostructured HA doped with 5% strontium associated with 1.5% alginate. **Control group** - critical bone defect without implantation of biomaterial. **RESULTS:** Histological results showed, in the **nHASr2-alg** and **nHASr5-alg groups**, chronic granulomatous inflammatory reaction and angiogenesis. In the **nHASr2-alg group**, the microspheres filled the entire extent of the defect with multiple layers and formation of the osteoid matrix limited the edges of the defect, while in the **nHASr5-alg group** the microspheres limited the borders and intermediate region of the defect, however It is possible to observe islets of osteoid matrix throughout the extent of the defect. In **Control Group**, a discrete chronic inflammatory response, reactional bone formation near the bone edges and filling of the remaining area with loose connective tissue were noted. **CONCLUSION:** In the Control Group, bone neoformation was reparative. In the groups that received biomaterial, as microspheres were osteoconductors and as different concentrations of strontium were biocompatible.

**Keywords:** Biomaterials. Strontium. Hydroxyapatite. Bone regeneration.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura</b>	<b>1</b>	Célula unitária da hidroxiapatita, evidenciando a interação entre os elementos químicos	20
<b>Figura</b>	<b>2</b>	<b>a</b> – Estrutura polimérica do alginato. <b>b</b> – Mecanismo de interação entre o alginato e cátion divalente	21
<b>Figura</b>	<b>3</b>	Estrutura da Hidroxiapatita dopada com estrôncio	22
<b>Figura</b>	<b>4</b>	Representação esquemática da disposição das microesferas (M) e formação dos poros intersticiais (In) após implantação <i>in vivo</i> em defeito ósseo crítico	24
<b>Figura</b>	<b>5</b>	Ilustração esquemática, com as dimensões do defeito ósseo crítico localizado entre a sutura anterior e posterior, na calvária de rato	25
<b>Quadro</b>	<b>1</b>	Distribuição dos números de animais por ponto biológico	27
<b>Figura</b>	<b>6</b>	Eppendorf com microesferas de <b>nHASr2-alg</b> <b>nHASr5-alg</b>	29
<b>Figura</b>	<b>7</b>	Etapas realizadas no procedimento cirúrgico	30
<b>Quadro</b>	<b>2</b>	Composição do formol 4%	32
<b>Figura</b>	<b>8</b>	Calvária reduzida e a porção posterior utilizada	33
<b>Quadro</b>	<b>3</b>	Composição do EDTA, solução para 1 litro	33
<b>Figura</b>	<b>9</b>	<b>nHASr2-alg15D</b>	34
<b>Figura</b>	<b>10</b>	<b>nHASr5-alg 15D</b>	35
<b>Figura</b>	<b>11</b>	<b>GC15D</b>	35
<b>Figura</b>	<b>12</b>	<b>nHASr2-alg 15D</b>	36
<b>Figura</b>	<b>13</b>	<b>nHASr5-alg15D</b>	37
<b>Figura</b>	<b>14</b>	<b>GC 15D</b>	37
<b>Figura</b>	<b>15</b>	<b>nHASr2-alg 15D</b>	30
<b>Figura</b>	<b>16</b>	<b>nHASr2-alg15D</b>	39
<b>Figura</b>	<b>17</b>	<b>NHASr2-alg15D</b>	40
<b>Figura</b>	<b>18</b>	<b>nHASr5-alg15</b>	40
<b>Figura</b>	<b>19</b>	<b>nHASr5-alg 15D</b>	41

<b>Figura</b>	<b>20</b>	<b>nHASr5-alg15D</b>	<b>41</b>
<b>Figura</b>	<b>21</b>	<b>GC 15D</b>	<b>42</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
Ø	Diâmetro
<	Menor
µm	Micrômetro
15D	15 Dias
<i>ad libitum</i>	Expressão latina que significa “à vontade”
Alg	Alginato
BO	Borda Óssea
Ca	Cálcio
Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	Fórmula Química da HÁ
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
EDTA	Etileno-diamino-tetracético
g	Gramas
GC	Grupo Controle
Gold	Masson Goldner
HA	Hidroxiapatita
HASr	Hidroxiapatita dopada com estrôncio
HE	Hematoxilina e Eosina
IC	Inflamação crônica
ICS	Instituto Ciências da Saúde
In	Interstício
IPAC	Instituto de Patologia Geral e Cutânea
M	Microesferas
MAT	Materiais Alcalinos Terrosos

MEC	Matriz Extracelular
mL	Mililitro
Mm	Milímetros
MO	Matriz Osteoide
N°	Número
nHA	Hidroxiapatitananoestruturada
nHASr	Hidroxiapatitananoestruturada dopada com estrôncio
nHASr2-alg	Hidroxiapatitananoestruturada dopada com estrôncio a 2%
nHASr5-alg	Hidroxiapatitananoestruturada dopada com estrôncio a 5%
Nm	Nanômetro
NO	Neoformação óssea
O	Oxigênio
OH	Hidroxila
P	Fosfato
Pifg	Picosírius Red
p/v	Relação peso e volume
RDm	Região da dura-máter
Rpm	Repetições por minuto
Sr	Estrôncio
SrCO <sub>3</sub>	Estroncianita
SrSO <sub>4</sub>	Celestina
TC	Tecido conjuntivo
Tcf	Tecido conjuntivo frouxo
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VC	Veia Central
Vs	Neovascularização

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	18
2.1	BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA E BIOMATERIAIS	18
2.2	DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	26
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	27
4.1	AMOSTRA	27
4.2	BIOMATERIAIS	28
4.2.1	<b>Preparação do pó HASr</b>	28
4.2.2	<b>Preparação das microesferas</b>	28
4.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	28
4.4	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	34
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	43
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	47
	<b>REFERÊNCIAS</b>	48
	<b>ANEXOS</b>	54
	<b>ANEXO A</b>	55
	<b>ANEXO B</b>	57



## 1 INTRODUÇÃO

O aumento populacional, bem como a elevação da expectativa de vida, podem ter como consequências diferentes doenças degenerativas por senescência, incremento no número de acidentes automobilísticos, lesões extensas após ressecções tumorais, dentre outras. Essas intercorrências são desafiadoras para a área biomédica e demandam alternativas que estimulem, favoreçam ou acelerem os mecanismos de regeneração, especialmente no caso de perdas teciduais críticas ao reparo. Neste pressuposto, o desenvolvimento de biomateriais tem sido aperfeiçoado nas últimas décadas, na tentativa de desenvolver substitutos teciduais adequados para auxiliar no reparo de diferentes lesões e com custo acessível a toda população.

Dentre os diversos tipos de biomateriais utilizados para a regeneração óssea, a hidroxiapatita (HA) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) sintética é um dos principais materiais, visto que se trata de um composto inorgânico que possui similaridade com a fase mineral do tecido ósseo, não apresenta toxicidade, é biocompatível e osteocondutora. Alguns estudos têm evidenciado que a utilização de HA nanoestruturada (nHA) apresenta melhor potencial osteogênico devido à similaridade com as apatitas biológicas.

Nos últimos anos, alguns pesquisadores têm associado o estrôncio (Sr) à HA, tendo em vista que esse metal estimula a proliferação de osteoblastos e inibe a ação dos osteoclastos, dificultando a reabsorção óssea. Essa associação é possível devido à similaridade química do Sr ao cálcio (Ca), o que possibilita sua substituição parcial na estrutura da HA, tornando-a menos cristalina e, conseqüentemente, mais solúvel (BIKRAMJIT; SABAREESWARAN; SHENOY, 2014). Em estudos *in vivo*, a concentração de Sr utilizada acarretará diferentes efeitos biológicos, como por exemplo, em concentrações baixas, o Sr reduz a reabsorção óssea e eleva a formação óssea, porém, em concentrações altas, pode apresentar toxicidade.

Outro material utilizado é um componente orgânico, o alginato (alg), que tem características favoráveis para a regeneração óssea e pode ser preparado em forma de gel, esponjas ou fibras (VENKATESAN et al., 2015). Outra característica do alg é favorecer o desenvolvimento de biomateriais em formato de microesferas. Além disso, esse polímero é biocompatível e biodegradável e favorece a migração e

adesão celulares.

Esta temática inovadora almeja buscar novos biomateriais com propriedades osteocondutoras e concentração ideal do metal utilizado para auxiliar na regeneração óssea, com o intuito de, posteriormente, aplicá-los na área biomédica. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos osteogênicos dos compostos de nHA dopada com Sr em diferentes concentrações, associados ao alg, após a aplicação em defeitos ósseos críticos em calvária de rato.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta seção aborda a bioengenharia tecidual óssea, os biomateriais com ênfase na HA, Sr e Alg, bem como o defeito ósseo crítico utilizado em experimentação com ratos *wistar*.

### 2.1 BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA E BIOMATERIAIS

Em 1988, o termo Bioengenharia Tecidual foi usado pela primeira vez na primeira reunião da National Science Foundation, onde foram discutidos conceitos de engenharia e ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos biocompatíveis, capazes de estimular regeneração tecidual (SHALAK; FOX, 1988; CARVALHO et al., 2010). Assim, a Bioengenharia Tecidual surgiu como uma alternativa para o tratamento de lesões teciduais extensas e falências de órgãos (CARVALHO et al., 2010).

Já a Bioengenharia Tecidual Óssea desenvolve pesquisas multidisciplinares com a participação de profissionais de diferentes áreas para produzir biomateriais ou tecidos artificiais capazes de estimular a regeneração ou substituir o tecido danificado (OLIVEIRA et al., 2010; PALONE; SILVA; DALBEN, 2015).

Essa área tem grande importância social, uma vez que o aumento da população urbana necessita de expansão tecnológica, pois há um maior número populacional vivendo em aglomerados, por vezes, mais expostos a lesões traumáticas, tornando-se necessário o desenvolvimento de terapias que preservem ou melhorem as funções teciduais (OLIVEIRA et al., 2010).

Uma das vertentes da Bioengenharia Tecidual Óssea, amplamente utilizada, é conhecida como biomateriais. Estes são definidos como quaisquer materiais cuja finalidade é formar arcabouços que permaneçam em forma temporária ou permanente no local implantado para restaurar ou substituir o tecido lesionado (LAVIK; LANGER; 2004). Os biomateriais semicondutores podem ser de origem sintética ou natural e são classificados em metálicos, poliméricos, cerâmicos e compósitos - que representam a associação de dois ou mais materiais (LAVIK; LANGER; 2004; RIBEIRO, 2013).

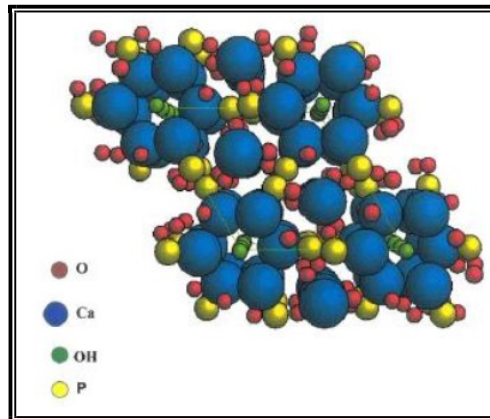
Os biomateriais de origem natural se dão pelo isolamento de diferentes organismos como algas, corais, invertebrados, bactérias, mamíferos, entre outros.

Tem-se como exemplo a HA o colágeno, a quitosana, o alginato (alg), o ácido hialurônico. Já os biomateriais sintéticos podem ser derivados do petróleo, misturas de compostos químicos; metais ou ligas metálicas (ALSBERG et al., 2001; CHUNG, et al., 2002; ANDRADE, 2006), a exemplo de hidroxiapatita, polímeros, biovidros, titânio, dentre outros. Os biopolímeros naturais formam consistência de geis que se destacam em relação aos outros, devido às suas propriedades macromoleculares similares às aquelas observadas na matriz extracelular (MEC) (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008). O alg melhora de forma expressiva a adesão celular dos biomateriais, a difusão de nutrientes e a distribuição de célula por meio do hidrogel formado (ANDRADE, 2006), o que evidencia o interesse dos pesquisadores em associá-lo a outros materiais (MAZUMDER et al., 2009; ROLIM, 2010; RIBEIRO, 2013).

Para obter-se sucesso na terapia clínica com a utilização de biomateriais é importante escolher adequadamente o material, de acordo com suas características físico-químicas, pois fatores como composição química, biocompatibilidade, tempo de degradação, propriedades mecânicas e forma de apresentação interferem diretamente no resultado final, visto que, além de serem biocompatíveis, os biomateriais necessitam induzir uma resposta celular adequada que favoreça adesão, proliferação e diferenciação celular, além da síntese de moléculas específicas do tecido estudado (ANDRADE, 2006). Se os biomateriais forem projetados para formar tecido ósseo, além das características descritas anteriormente, necessitam apresentar uma taxa de biodegradação proporcional à formação tecidual (PORTER; RUCKH; POPAT, 2009; BHARATHAM et al., 2014).

Dentre os biomateriais mais utilizados para a regeneração do tecido ósseo destaca-se a HA e o tricálcio-fosfato (MACHADO et al., 2010) devido à similaridade da estrutura desses materiais com a porção inorgânica do tecido ósseo. A HA, cuja célula unitária está representada pela Figura 1 (KAY; YOUNG; POSNER, 1964), é biocompatível, atóxica, não carcinogênica, adsorve proteínas, fatores de crescimento e metais em sua estrutura e após implantação *in vivo* desencadeia reação tecidual discreta (WONG et al., 2009).

**Figura 1** – Célula unitária da hidroxiapatita, evidenciando a interação entre os elementos químicos.



Fonte: Kay e colaboradores (1964).

A HA pode ser utilizada no preenchimento de cavidades, a exemplo de alvéolos dentários, no recobrimento de implantes metálicos, no aumento de seio maxilar e em outras situações clínicas. Contudo, a aplicação desse biomaterial pode ser restrita devido à falta de propriedades mecânicas satisfatórias (BENAQQA et al., 2005; MACHADO, 2010) e à sua limitada fragmentação e pouca biodegradação, quando sinterizada (BARRETO, 2008).

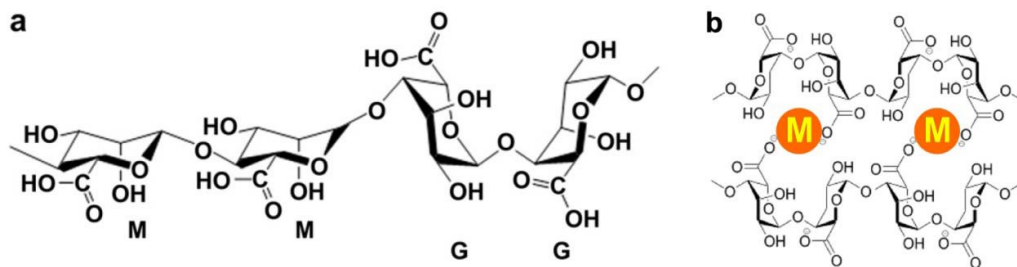
Os avanços científicos dos últimos anos sugerem que, para uma melhor osteocondução e osteointegração, a estrutura dos arcabouços tridimensionais compostos por HA sintética deve ter características similares à apatita biológica, a qual se apresenta nanoestruturada (ZAKARIA et al., 2013; VENKATESAN et al., 2014). Esse mimetismo favorece o desenvolvimento de respostas celulares e teciduais adequadas à regeneração tecidual, após a implantação *in vivo* (CHAE; YANG; LEUNG, 2013). Para considerar um material nanoestruturado, suas partículas devem apresentar diâmetro inferior a 100nm (MACHADO et al., 2010).

Recentemente, a utilização de compósitos de HA e de polímeros está sendo desenvolvida com o propósito de melhorar o comportamento mecânico e biológico, especialmente a biodegradação da HA (BARRETO, 2008; PAULA, 2008; ROLIM, 2010; BARRETO, 2011; BHARATHAM et al., 2014).

O alg é um polímero natural, caracterizado por uma sequência repetitiva de unidades de monossacarídeos do tipo ácido gulurônico e manurônico (Figura 2 – a), encontradas especificamente em algas pardas e algumas bactérias (KLOAREG; QUATRANO, 1988; ANDRADE, 2006). Esse material tem sido utilizado em associação com a HA no preparo de compósitos, no formato de microesferas as

quais podem ser implantadas por meio de técnica minimamente invasiva (BARRIAS; RIBEIRO; RODRIGUES, 2005). Para tanto, o gel de alg é misturado com o pó de HA nanoestruturada e, em seguida, essa pasta é gotejada no cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) para formar as esferas (BARRETO, 2008; PAULA, 2008; ROLIM, 2010, BARRETO, 2011). Isto ocorre porque na presença de íons divalentes o alg pode estabelecer ligações cruzadas e formar hidrogéis (Figura 2 – b) (SUN; THAN, 2013). O cálcio é o cátion mais utilizado para este fim (BOONTHEEKUL; KONG; MOONEY, 2005).

**Figura 2** – a – Estrutura polimérica do alg. b – Mecanismo de interação entre o alg e cátion divalente.



Fonte: Sun e Than (2013).

A utilização de HA com polímeros tem evidenciado resultados favoráveis à regeneração óssea (BARRETO, 2008; PAULA, 2008; ZHANG; WANG; WANG, 2010; ROLIM, 2010; BARRETO, 2011; BHARATHAM et al., 2014). Todavia, esse compósito pode ser enriquecido com metais que contribuam com a neoformação óssea, como o Sr (VALIENSE et al., 2015), o zinco (CALASANS-MAIA et al., 2014) e o magnésio (LAFISCO et al., 2014).

O Sr foi encontrado em uma mina perto da aldeia escocesa *Strontian*. Esse metal não existe livremente na natureza e está presente nos compostos minerais estroncioanita ( $\text{SrCO}_3$ ) e celestina ( $\text{SrSO}_4$ ), encontrados no solo e na água (VESTERMARK, 2011). O Sr é um elemento químico da família 2A da tabela periódica e compõe o grupo de metais alcalinos terrosos (MAT) (ROMER, 2012).

Quando encontrado na fase mineral do tecido ósseo (MACHADO et al., 2010) e se utilizado em associação aos biomateriais, ele tem capacidade de estimular a diferenciação osteoblástica e inibir a ação dos osteoclastos (BONNELYE et al., 2008; ROMER et al., 2012), além de ter capacidade de penetrar nas células através dos canais de Ca e ligar-se a determinados sítios intracelulares e interferir na homeostasia intracelular do Ca e nos processos de mineralização (FARIA et al.,

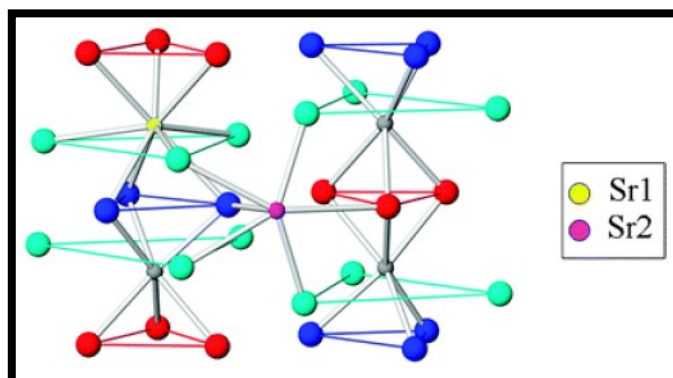
2010). Segundo Chen e colaboradores (2008), os íons de Sr aumentam a proliferação e migração de células endoteliais, favorecendo a angiogênese e, conseqüentemente, a regeneração óssea.

O Sr pode estar presente em diferentes concentrações nos biomateriais os quais podem ser apresentados em diferentes formatos, como cimento, gel, esponjas, pó e microsferas (FARIA et al., 2010; VERTERMARCK et al., 2011; BAIER et al., 2013; WEI et al., 2014; RAUCCI et al., 2015; ZHAO et al., 2015). Esse metal pode, também, estar presente em fármacos, como ranelato de Sr, com o intuito de ser administrado via oral (BARRETO, 2011; ROSSI et al., 2014).

No estudo de Faria e colaboradores (2010), esponjas de colágeno foram embebidas em solução gelatinosa de cloreto de Sr a 2% e implantadas em defeitos ósseos críticos em mandíbulas de coelhos. Os resultados evidenciaram grande número de osteoblastos e matriz osteoide de permeio às esponjas tratadas com o Sr no defeito. E, no estudo de Wei e colaboradores (2014), com o Sr a 5% incorporado ao biovidro, a combinação favoreceu a neoformação óssea e inibiu a ação dos osteoclastos.

Durante a síntese da HA, o Sr pode substituir alguns íons de Ca (Figura 3), devido à semelhança química desses dois metais alcalinos terrosos. A taxa dessa substituição depende das condições físico-químicas utilizadas durante a síntese dos biomateriais.

**Figura 3-** Estrutura da Hidroxiapatita dopada com estrôncio.



Fonte – Terra e colaboradores, 2009.

No estudo realizado por Machado e colaboradores (2010), as microsferas de n-HA dopadas com Sr a 1%, implantadas em defeito ósseo crítico em tíbias de

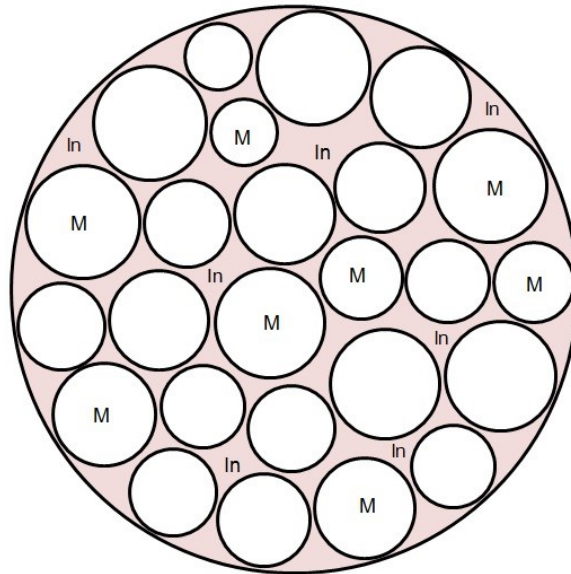
ovelha, demonstraram biocompatibilidade e potencial osteocondutor, favorecendo o reparo ósseo . A presença do Sr na estrutura da HA torna o material menos cristalino e mais solúvel, conseqüentemente, com maior biodegradação (WU et al., 2007).

A HA dopada com Sr (HASr) foi desenvolvida com o intuito de estimular a atividade dos osteoblastos e inibir a proliferação de osteoclastos, além de fornecer um arcabouço adequado à regeneração óssea (VERBERCKMOES et al., 2004; CAPUCCINI et al., 2008; LI et al., 2015). Estudos *in vivo* evidenciaram efeitos promissores do uso de HASr no reparo de tecido ósseo esponjoso de rato (WONG et al., 2004; NI et al., 2006). Li e colaboradores (2010) utilizaram HASr no revestimento de implantes metálicos e observaram que a microarquitetura tecidual circunjacente ao biomateriais apresentou maior densidade óssea.

Em relação ao formato dos biomateriais, a implantação *in vivo* de microesferas em defeitos ósseos críticos forma um arcabouço tridimensional, permeado por poros intersticiais entre as esferas (Figura 4), os quais favorecem o fluxo de fluidos tissulares, nutrientes e fatores de crescimento, a angiogênese, a migração, diferenciação e proliferação celulares, bem como a síntese de nova MEC, auxiliando o reparo tecidual (MARCACCI et al., 2007). O reparo depende do tamanho e da distribuição das esferas, que, se for muito discrepante, não formará um interstício tão favorável a ele, uma vez que as partículas menores ocuparão os espaços existentes entre as microesferas maiores (VOGEL et al., 2001; RIBEIRO, 2013).



**Figura 4** – Representação esquemática da disposição das microesferas (M) e formação dos poros intersticiais (In) após implantação *in vivo* em defeito ósseo crítico.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

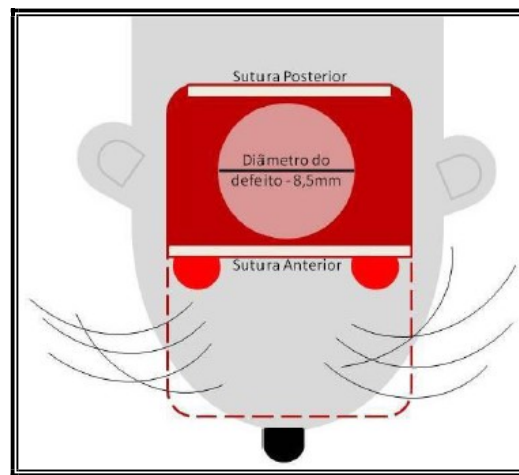
Antes da aplicação clínica desses materiais, são realizados estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* para avaliar, respectivamente, a citotoxicidade e a biocompatibilidade, bem como a velocidade de degradação dos biomateriais e o potencial osteogênico, o que atesta a possibilidade de aplicação clínica futura. Esses experimentos podem ser realizados em diversas espécies animais, como coelhos, cães, ovelhas, camundongos e ratos. Estes últimos são animais de fácil manejo e disponibilidade de aquisição, bem como alimentação (TUFIK et al., 2004) e baixo custo.

## 2. 2 DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO

Partindo do pressuposto de Schmitz e Hollinger (1986), um defeito ósseo adequado para avaliar o potencial osteogênico de biomateriais deve ter dimensões que limitem o reparo espontâneo. Assim, um defeito ósseo crítico é definido como aquele que não se regenera espontaneamente ao longo da vida do animal (Figura 5). Este modelo experimental tem sido amplamente utilizado nas pesquisas com

novos biomateriais, tendo em vista que os materiais implantados formam um arcabouço de preenchimento do defeito ósseo e, assim, asseguram a manutenção do volume ósseo perdido, bem como favorecem a osteocondução e osteoindução (BARRETO, 2011).

**Figura 5** – Ilustração esquemática com as dimensões do defeito ósseo crítico localizado entre a sutura anterior e posterior, na calvária de rato.



Fonte: Barreto (2011).

### 3 OBJETIVOS

- Avaliar o comportamento osteogênico de microesferas de compósitos de HA nanoestruturada (nHASr), dopada com estrôncio (Sr) em diferentes concentrações, associada ao alginato (alg), após a implantação em defeito ósseo crítico em rato
- Analisar o efeito biológico das diferentes concentrações do Sr.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Abordam-se, de forma detalhada, os procedimentos aplicados para cumprimento dos objetivos deste estudo, enfocando os materiais e os métodos adotados.

### 4.1 AMOSTRA

Os procedimentos cirúrgicos deste estudo foram realizados no Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Para tanto, preliminarmente, o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), da Universidade Federal da Bahia (UFBA), sob os protocolos 063/2014 e 064/2014 (Anexos A e B). Ao longo de todas as etapas experimentais, seguiram-se as normas éticas em experimentação animal (Lei nº. 11.794, de 2008) e as normas Nacionais de Biossegurança.

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, para compor três grupos experimentais, cada qual com cinco animais, avaliados após 15 dias de estado pós-operatório: **Grupo nHASr2-alg** – defeito ósseo crítico preenchido com microesferas de HA nanoestruturada, dopada com 2% de Sr associada ao alg a 1,5%; **Grupo nHASr5-alg** – defeito ósseo crítico preenchido com microesferas de HA nanoestruturada, dopada com 5% de Sr associada ao alg a 1,5%; **Grupo GC** – defeito ósseo crítico sem implantação de biomaterial.

**Quadro 1** – Distribuição dos números de animais de acordo com o grupo experimental.

GRUPO EXPERIMENTAL	NÚMERO DE ANIMAIS
nHASr2-alg	5
nHASr5-alg	5
GC	5
<b>Total de Animais</b>	<b>15</b>

Fonte: Elaborado pela autora

## 4.2 BIOMATERIAIS

Os biomateriais utilizados neste estudo foram sintetizados, caracterizados e fornecidos pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), sob a responsabilidade do Prof° Dr. Alexandre Malta Rossi.

### 4.2.1 Preparação do pó HASr

Para o preparo do pó de HASr, a síntese realizada foi baseada no trabalho de Nounah, Szilagy, Lacout (1990), utilizando-se soluções de nitrato de cálcio e nitrato de estrôncio (teores molares de estrôncio de 2 e 5%) e fosfato dibásico de amônio. Preparou-se uma solução de nitrato de cálcio  $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  e nitrato de estrôncio  $(\text{Sr}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ , com concentração total de cátions de 0,20mol/1000mL e com auxílio de uma bomba peristáltica, com fluxo de 4,5mL/min, gotejou-se sobre uma solução de fosfato dibásico de amônio,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  com concentração 0,12mol/600mL, mantendo-se o pH 9,0 com hidróxido de amônio concentrado  $(\text{NH}_4\text{OH})$ , temperatura de 90°C e agitação mecânica de 240rpm. Após gotejamento, a mistura permaneceu em digestão por 3h nas mesmas condições, sendo então filtrada em funil de Buckner e ressuspendida em água MilliQ a 90°C por três vezes, até obter pH 7,0 na água de lavagem. O sólido obtido foi liofilizado por 24h. Esse procedimento foi realizado na preparação de todas as amostras. Finalmente, o sólido foi macerado e separado, utilizando-se peneira com o *mesh* de < 74µm.

### 4.2.2 Preparação das microesferas

Para o preparo das microesferas, utilizaram-se 15g de pó de SrHA (2% ou 5%)  $\varnothing < 74\mu\text{m}$ , que foi misturado a uma solução de alginato de sódio 1,5% com leve agitação magnética para a formação de uma pasta cerâmica. Posteriormente, 10mL dessa pasta cerâmica foi transferida para uma seringa e, por extrusão, ela foi gotejada em uma solução de cloreto de cálcio dihidratado  $(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$  a 0,15M, onde imediatamente foram formadas as esferas.

O procedimento foi repetido até que toda a pasta cerâmica fosse utilizada. As esferas ficaram em solução de cloreto de cálcio durante 24h e, após esse período,

foram lavadas com água MilliQ e secas em estufa a 60°C por um período de 24h.

Por fim, as esferas obtidas foram peneiradas, utilizando-se peneiras com diâmetro de 250 a 425µm; em seguida, foram aliquotadas em recipientes de plástico do tipo *ependorfs* (Figura 6) e esterilizadas com raios gama.

**Figura 6 – A – Eppendorf com microesferas de nHASr2-alg.  
B – Eppendorf com microesferas de nHASr5-alg.**



**Fonte:** Elaborado pela autora.

#### 4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

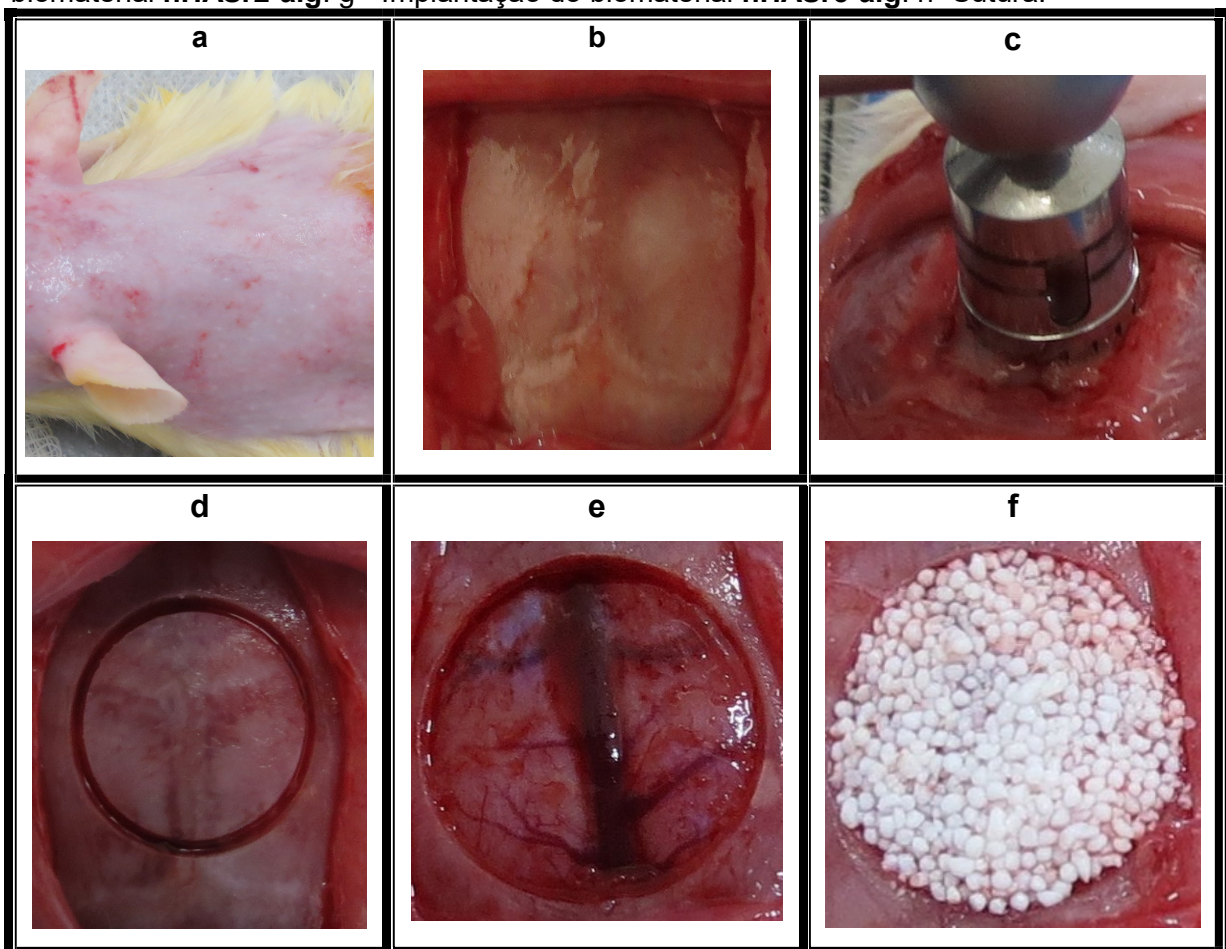
Como mencionado anteriormente, os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Biotério da UEFS, sob a supervisão da Professora Dr<sup>a</sup>. Fabiana Paim Rosa e do Professor Dr. Fúlvio Borges Miguel, do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

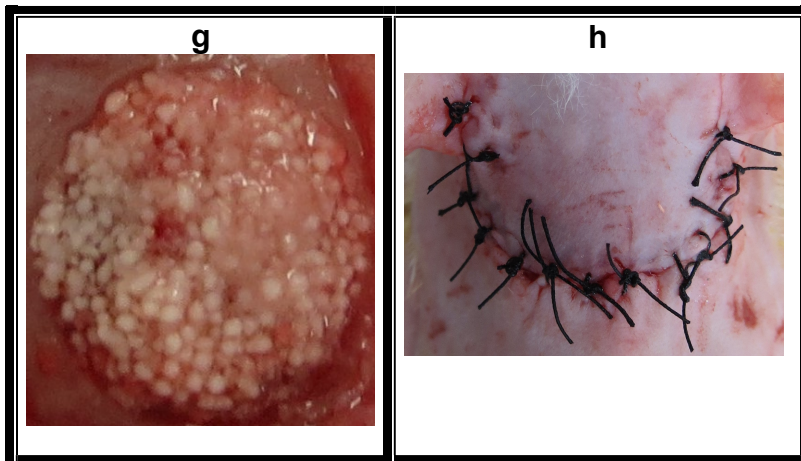
Foram utilizados 15 ratos *Novergicus Albinus Wistar*, machos adultos, com massa corpórea de 350 a 400g e idade aproximada de 4 a 5 meses.

Antes da cirurgia, separaram-se os animais, individualmente, em caixa plástica autoclavada, com maravalha autoclavada. A seleção foi de acordo com o seu peso corporal. Após a pesagem, os animais foram submetidos à sedação e anestesia geral com injeção intramuscular de cloridrato de xilazina (0,04mL/100g de

peso corporal) e cloridrato de quetamina (0,1mL/100g de peso corporal), respectivamente. Após a sedação, os ratos foram posicionados em decúbito ventral em uma área esterilizada, foi realizada tricotomia para facilitar o acesso ao local de confecção do defeito; após essa etapa, realizou-se a antissepsia com álcool iodado (Figura 7-a).

**Figura 7-** Etapas realizadas no procedimento cirúrgico. a - Tricotomia na região da calvária e antissepsia. b - Tecido ósseo exposto. c - Confecção do defeito com a fresa trefina. d - Demarcação do defeito ósseo. e - Defeito ósseo crítico confeccionado. f - Implantação do biomaterial **nHASr2-alg**. g - Implantação do biomaterial **nHASr5-alg**. h- Sutura.





**Fonte:** Elaborado pela autora.

Após a tricotomia e antissepsia direcionou-se o animal à sala cirúrgica e foi colocado em decúbito ventral no campo cirúrgico. Para ter acesso ao periósteo, uma incisão cutânea semilunar foi feita utilizando lâmina de bisturi nº 15. Em seguida, o periósteo foi exposto, retirado e o tecido ósseo visualizado (Figura 7-b).

Para a confecção do defeito ósseo circular transfixado com 8,5 mm de diâmetro e aproximadamente 0,5 mm de espessura na porção mediana da calvária, foi utilizada uma fresa trefina com 8 mm de diâmetro interno, montada em contra-ângulo (Figura 7-c) com redução de 16:1, acoplado em motor para implante, a 1500 rpm. Feito isto, delimitou-se o local do defeito com uma marcação cirúrgica (Figura 7-d) e logo após, confeccionou-se o defeito e as microesferas de **nHASr2-alg** e **nHASr5-alg** foram implantadas de acordo com seus respectivos grupos experimentais, exceto para o grupo GC (Figuras- 7- e; f; g). Por fim, o retalho foi reposicionado e suturado com fio de seda 4.0 (Figura 7- h).

Os animais foram mantidos em caixas de propileno, forradas com maravalha autoclavada, as mesmas foram identificadas conforme o grupo, ponto biológico, data da cirurgia e eutanásia, e o nome da pesquisadora. Os animais receberam ração sólida e água *ad libitum* durante todo o experimento.

#### 4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após 15 dias de pós-operatório, os animais foram eutanasiados, com injeção de dose letal de anestésico. Logo após, a porção superior da calvária foi removida e



o tecido mole excisado. Os espécimes foram fixados em formaldeído tamponado a 4% (Quadro 2), por no mínimo 72 horas.

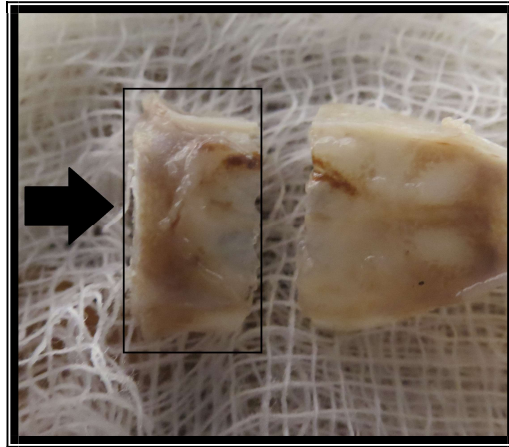
**Quadro 2** – Composição do formol tamponado a 4%.

<b>Solução</b>	<b>Quantidade</b>
Formol	100 mL
Água destilada	900mL
Fosfato de sódio monobásico	4g
Fosfato de sódio bibásico	6,5g

**Fonte:** Elaborado pela autora

Após a fixação, as calvárias foram reduzidas com discos de *carburundum*, conectados a motor rotativo e divididos com o maior diâmetro de 8,5 mm (Figura 8). Posteriormente a esse processo, a porção posterior foi descalcificada durante sete dias com etileno-diamino-tetracético (EDTA) (Quadro 3) e as amostras foram incluídas em parafina. Logo após, os cortes foram corados por hematoxilina e eosina (HE), Masson Goldner (Gold) e Picrosírius Red (Pifg), e analisados histologicamente em microscopia de luz. Essas etapas foram desenvolvidas no Instituto de Patologia Geral e Cutânea IPAC sob supervisão do Professor Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior.

**Figura 8-** Calvária reduzida com destaque da porção posterior, utilizada para inclusão em parafina.



**Fonte:** Elaborado pela autora

**Quadro 3 -** Composição do EDTA.

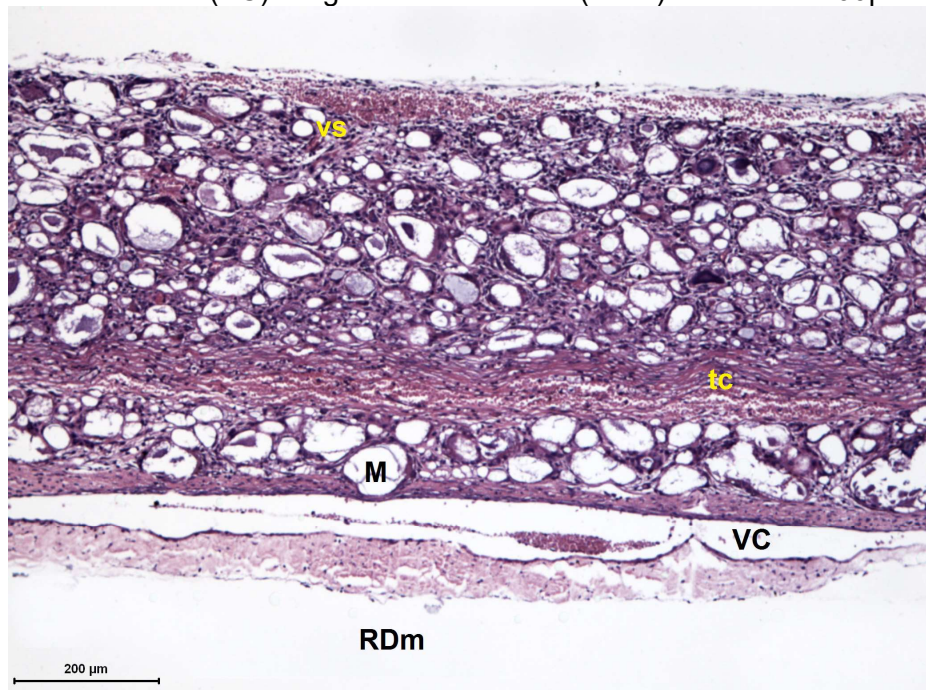
<b>Solução</b>	<b>Quantidade</b>
EDTA	50 g
Cloreto de sódio	8,5 g
Água destilada	1000 mL

**Fonte:** Elaborado pela autora

## 5 RESULTADOS

Aos 15 dias, no grupo **nHASr2-Alg**, observou-se a presença de grande quantidade de biomaterial (microesferas) que se dispuseram em múltiplas camadas com uma discreta variação entre os tamanhos das esferas. Esses biomateriais foram visualizados por toda a extensão do defeito (Figura 9).

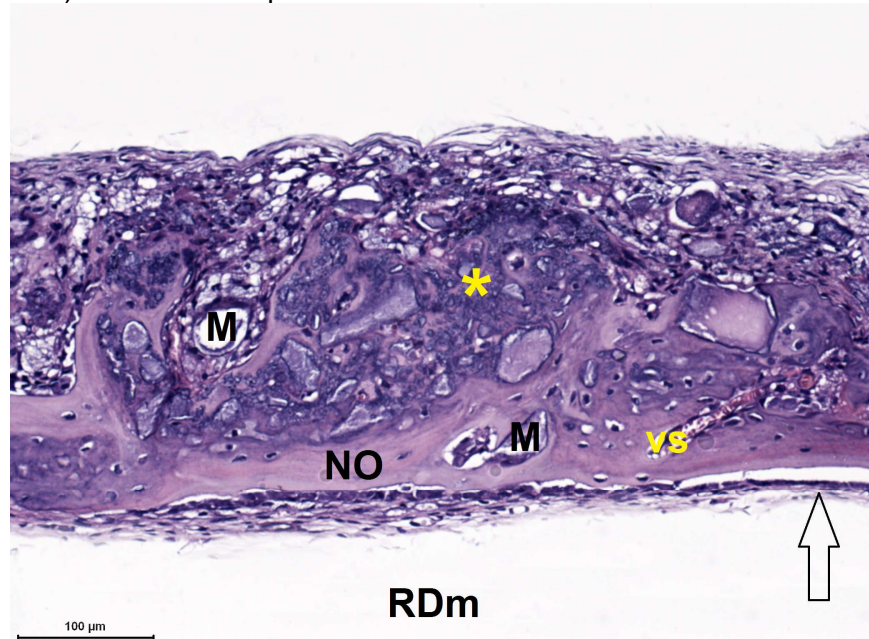
**Figura 9 - nHASr2-Alg 15D.** Disposição das microesferas (M) e tecido conjuntivo (tc) próximo as microesferas. Formação de vasos sanguíneos (VS). Região da veia central (VC). Região da dura-máter (RDm). HE. Barra 200µm.



Fonte: Foto da autora.

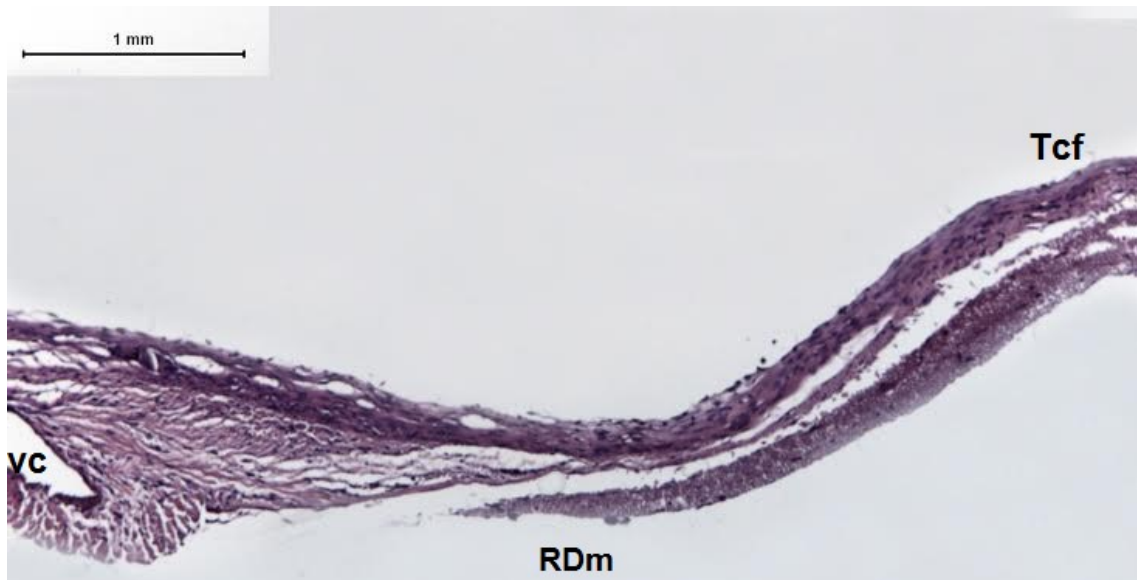
Diferentemente do grupo anterior, no grupo **nHASr5-Alg**, as microesferas se limitaram à periferia e à região intermediária do defeito, constituídas de formações esferoides pequenas e discreta variação de tamanho entre elas (Figura 10). No grupo **GC** houve presença discreta de tecido conjuntivo frouxo em toda extensão do defeito (Figura 11).

**Figura 10 - nHASr5-Alg 15D.** Microesferas (M) restritas as bordas do defeito crítico, permeada por matriz osteoide. Osteoblastos ativos (  $\Rightarrow$  ) matriz osteoide (\*), presença de vasos sanguíneos (vs). Região da dura-máter (RDm).HE. Barra 100 $\mu$ m.



Fonte: Foto da autora.


**Figura 11- GC 15D.** Tecido conjuntivo frouxo (Tcf) por toda a extensão do defeito. Veia central (VC). Região da dura-máter (  $\Rightarrow$  ). HE. Barra 1mm.

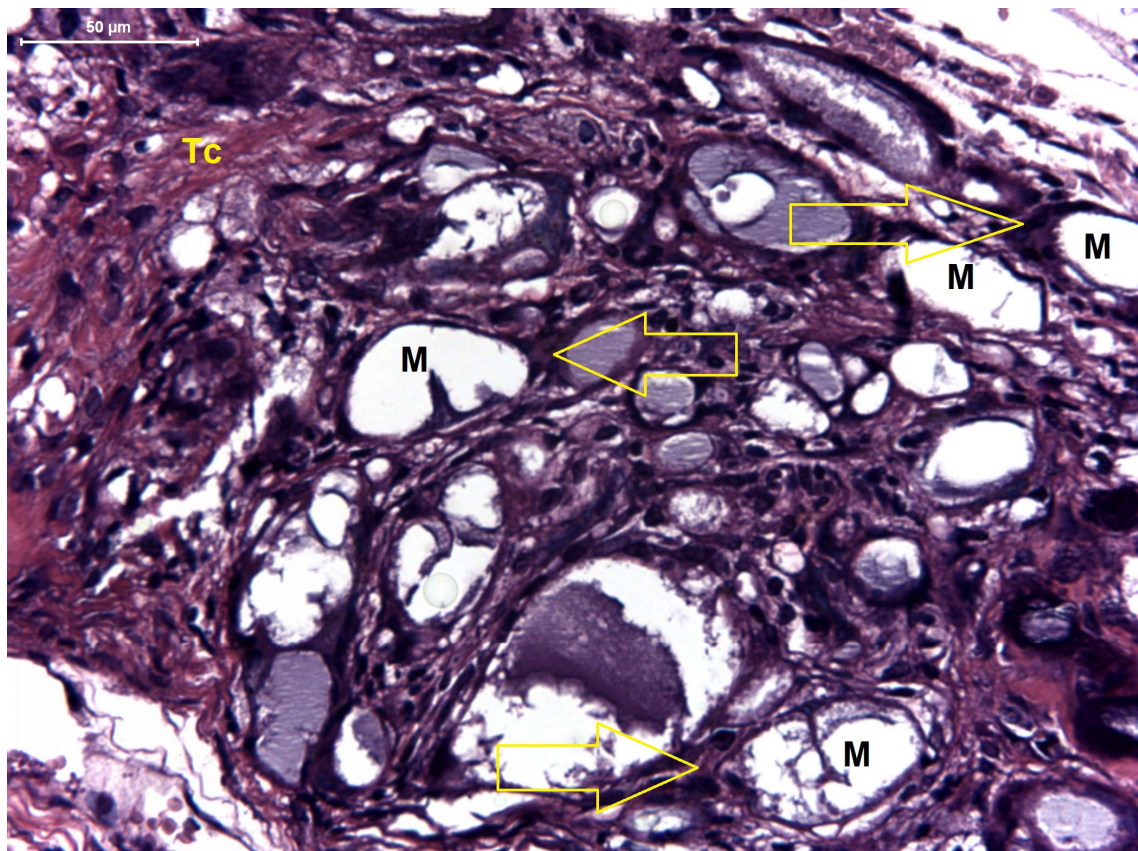


Fonte: Foto da autora.

Ambos os grupos experimentais **nHASr2-Alg** e **nHASr5-Alg** apresentaram inflamação crônica granulomatosa acentuada, no entorno dos biomateriais,

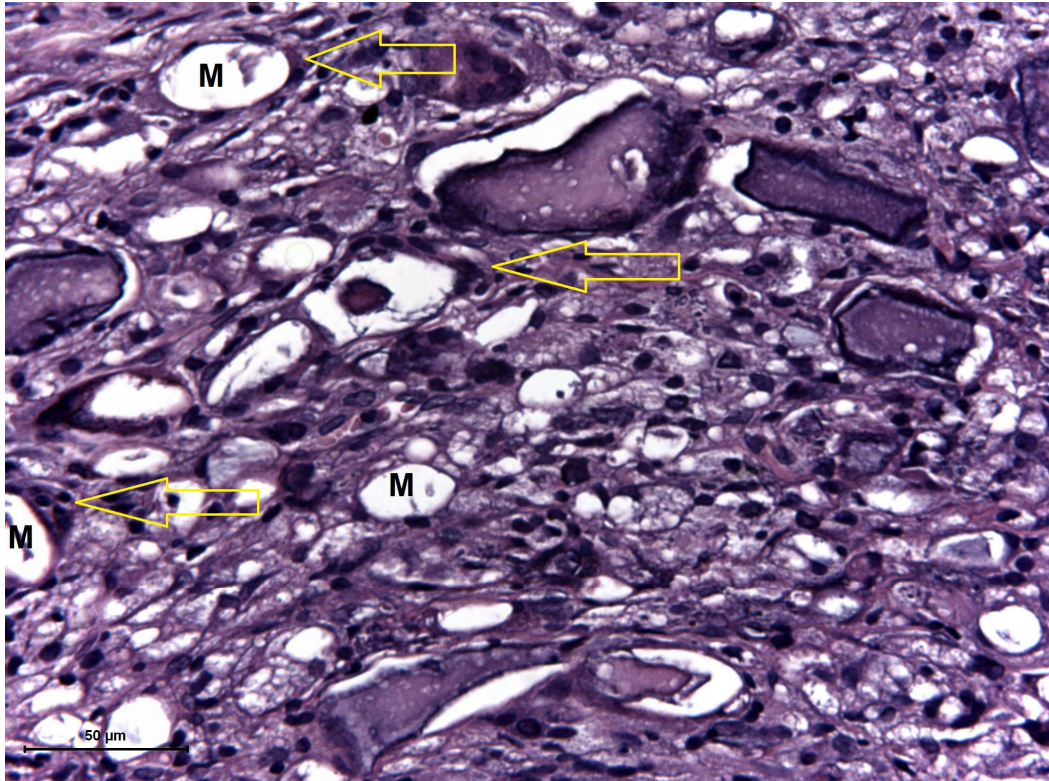
caracterizada pela presença de células gigantes multinucleadas, circundadas por tecido conjuntivo frouxo, proliferação vascular e discreto número de infiltrado linfocitário (Figuras 12 e 13). No grupo **GC** houve presença discreta de infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 14).

**Figura 12- nHASr2-Alg 15D.** Microesferas circundada por inflamação crônica granulomatosa caracterizada por células gigantes multinucleadas (  circundadas por tecido conjuntivo frouxo (Tcf), proliferação de vasos sanguíneos. HE. Barra 50 µm.



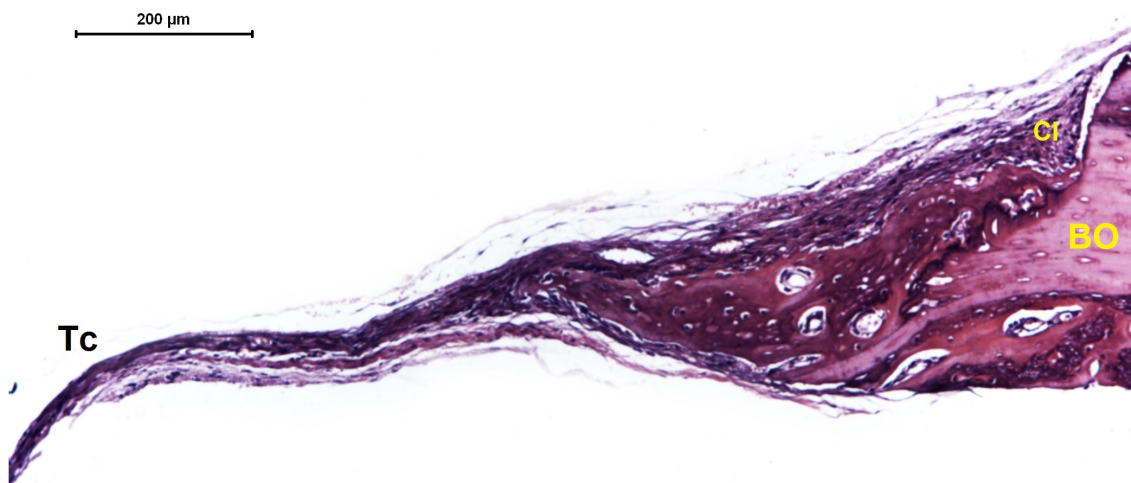
**Fonte:** Foto da autora.

**Figura 13 - nHASr5-Alg 15D.** Microesferas (M) circundadas por inflamação crônica granulomatosa caracterizada por células gigantes multinucleadas (⇔) HE. Barra 50  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Foto da autora.

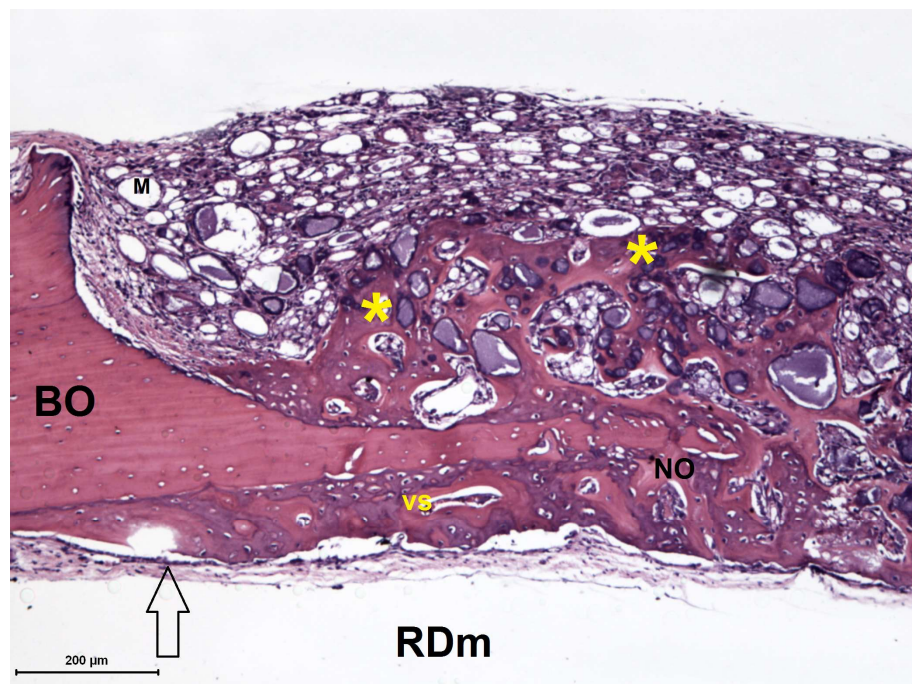
**Figura 14 - GC 15D.** Borda óssea (BO). Infiltrado inflamatório mononuclear (CI). Tecido conjuntivo (Tc). HE. Barra 200  $\mu\text{m}$ .




Fonte: Foto da autora.

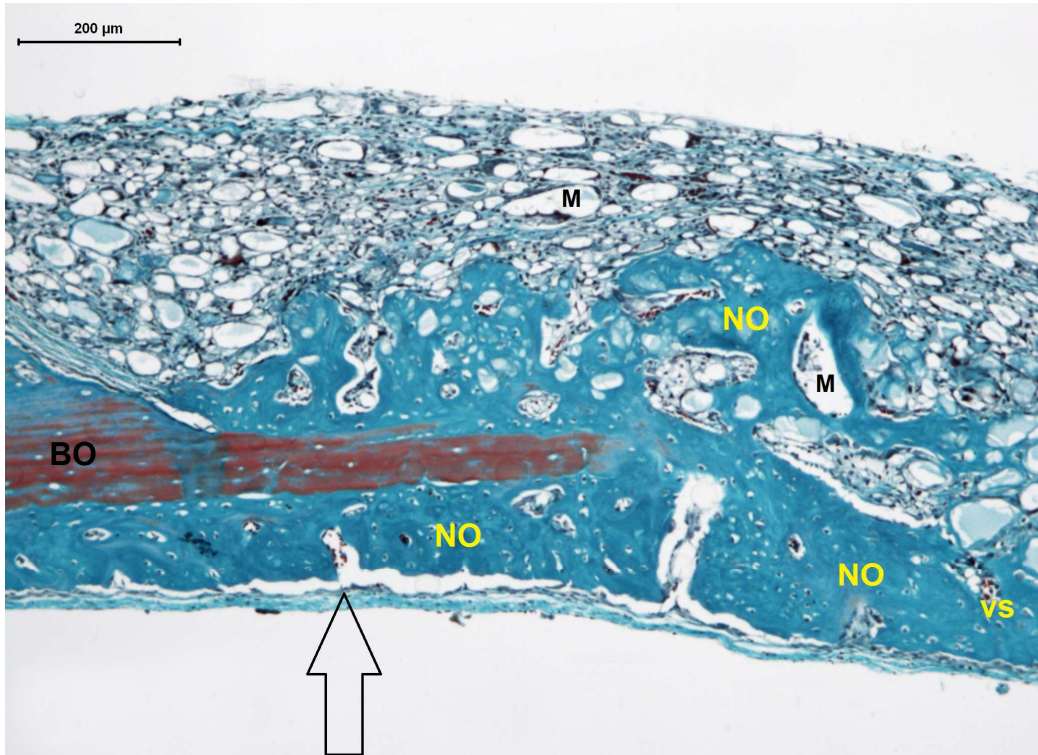
A neoformação de matriz osteoide foi vista no grupo **nHASr2-Alg** com alcance de aproximadamente 20% do defeito; essa neoformação está restrita à periferia com extensão para a dura-máter (Figuras 15, 16 e 17), enquanto no grupo **nHASr5-Alg**, por toda a extensão do defeito, é possível visualizar formações isoladas de (ilhotas) matriz osteoide, envolvendo os biomateriais; esta matriz se origina das bordas em direção ao centro do defeito (Figuras 18, 19 e 20). No grupo controle vazio, **GC**, a neoformação óssea é reacional e se limita às bordas do defeito, com matriz osteoide ocupando aproximadamente 20% do defeito (Figura 21).

**Figura 15 - nHASr2-Alg 15D.** Borda óssea (BO). Microesferas (M). Matriz osteoide restrita a periferia do defeito (\*). Neovascularização (vs). Neoformação óssea (NO), osteoblastos (⇨). Região da dura-máter (RDm). HE. Barra 200µm.



Fonte: Foto da autora.

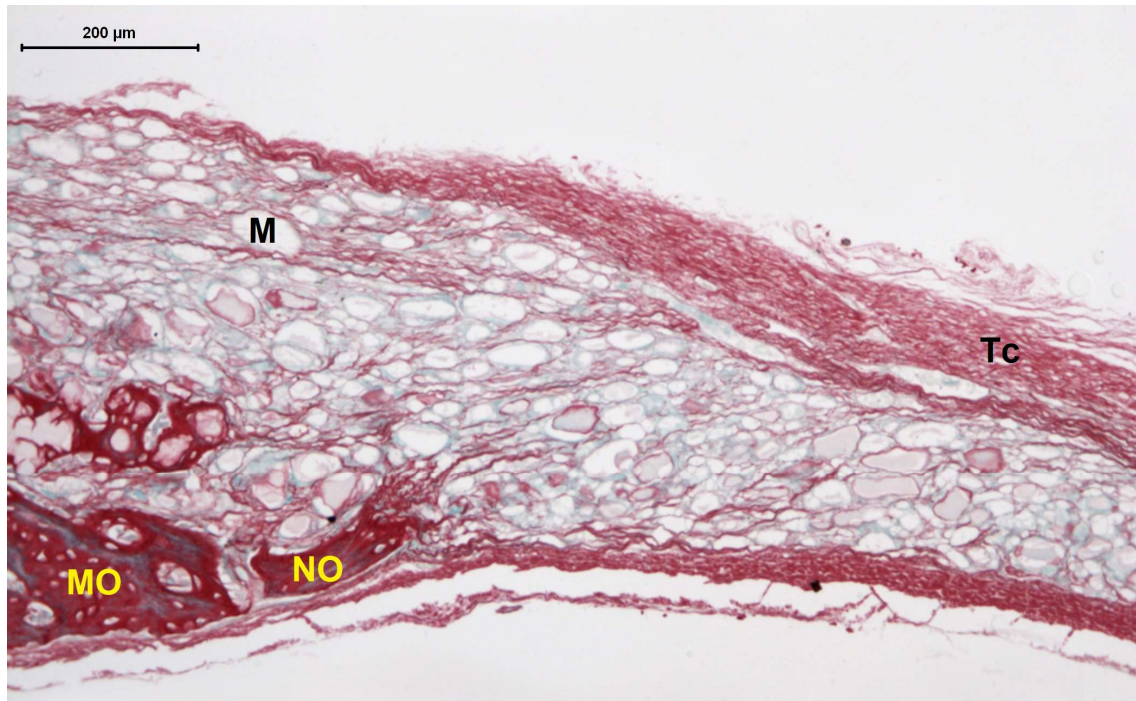
**Figura 16 - nHASr2-Alg 15D.** Borda óssea (BO). Microesferas (M). Neovascularização (vs). Neoformação óssea (NO), osteoblastos (  Região da dura-máter. Golder. Barra 200µm.



**Fonte:** Foto da autora.

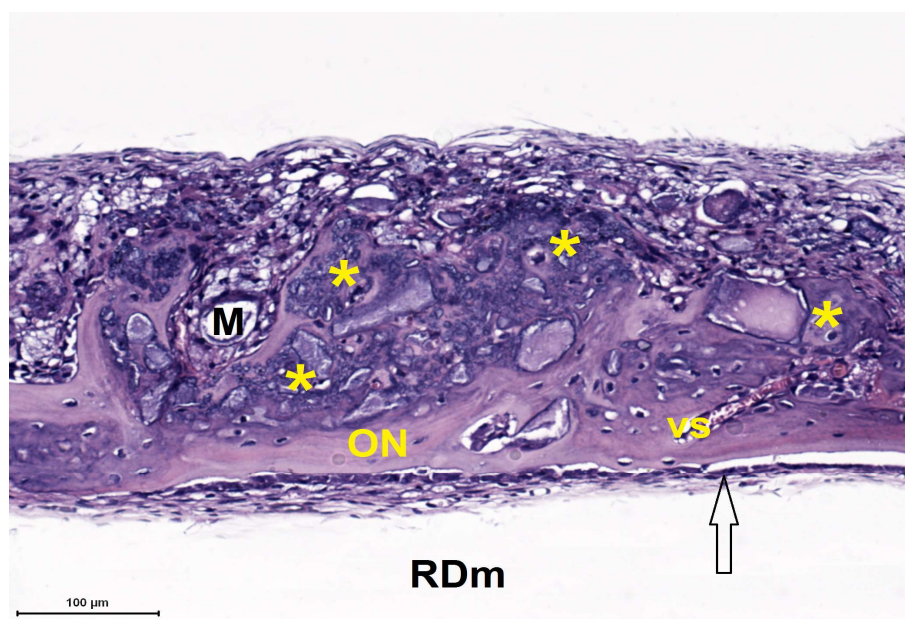


**Figura 17 - nHASr2-Alg 15D.** Borda óssea (BO). Microesferas (M). Matriz osteoide restrita a periferia do defeito (MO). Neoformação óssea (NO), Tecido conjuntivo (Tc). Pifg. Barra 200µm.



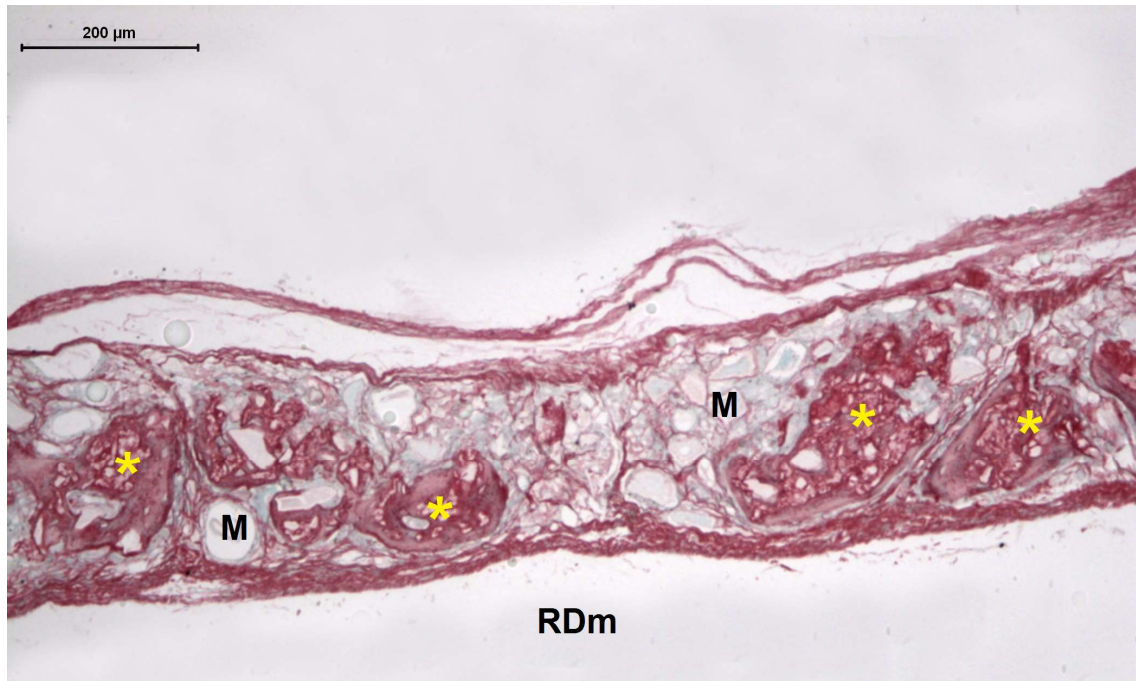
Fonte: Foto da autora.

**Figura 18 - nHASR5-Alg 15D.** Microesferas (M) circundadas por Matriz osteoide (MO) na periferia do defeito. Proliferação neovascular (vs). Tecido ósseo neoformado (ON). Osteoblastos (  $\Rightarrow$  ). Região da dura-máter (RDm). HE. Barra 100µm.



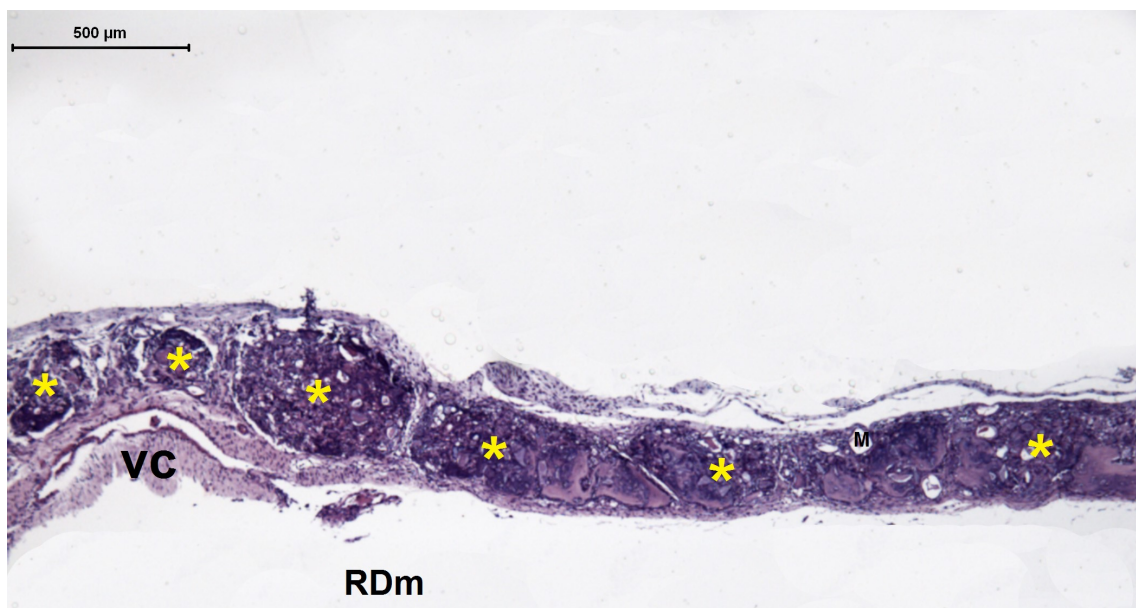
Fonte: Foto da autora.

**Figura 19 - nHASR5-Alg 15D.** Microesferas (M) circundadas por Matriz osteóide (MO) na região intermediária do defeito. Região da dura-máter (RDm). Pifg. Barra 200µm.



**Fonte:** Foto da autora.

**Figura 20 - nHASr5-Alg 15 D.** Presença de algumas partículas de microesferas (M). Extensa ilhota de matriz osteóide por toda a extensão do defeito, desde as bordas até o centro do defeito (\*). Veia central (VC). Região da dura-máter (RDm). HE. Barra 500µm.



**Fonte:** Foto da autora.

**Figura 21 - GC 15 D- Borda óssea (BO). Neoformação óssea reacional, limitada a periferia do defeito. Veia central (VC). HE. Barra 200µm**



**Fonte:** Foto da autora.

## 6 DISCUSSÃO

A busca por biomateriais com formatos e composições químicas que estimulem a proliferação celular para regenerar os defeitos ósseos críticos ainda representa um desafio para a área biomédica (ALMEIDA, 2013). Diversos trabalhos envolvendo biomateriais estão em fase de desenvolvimento com o intuito de encontrar materiais com potencial e capacidade de regenerar perdas ósseas extensas.

Para o desenvolvimento desse trabalho, o compósito nanoestruturado de HASr foi adicionado ao alg para formar as microesferas. Essas microesferas apresentavam diâmetros de 250 $\mu$ m a 425 $\mu$ m (ANDERSEN et al., 2012). O tamanho é compatível com o tamanho adequado das partículas que devem ser utilizadas para a regeneração óssea que, segundo Rolim (2010), variam entre 200 a 500 $\mu$ m.

Outra consideração importante deste estudo é que o valor das concentrações de Sr utilizadas na síntese dos biomateriais é um valor teórico, 2% (**nHASr2-alg**) e 5% (**nHASr5-alg**), pois o valor prático final foi de 0,7% e 2%, respectivamente. Esta redução é inerente ao processo de síntese dos materiais e foi observada em outros estudos que também utilizaram HA, associada a metais (CALASANS-MAIA et al., 2014, VALIENSE et al., 2015).

Os resultados histológicos evidenciaram no grupo em que foi utilizado menor percentual de Sr, **nHASr2-alg**, extensa quantidade de microesferas por toda a extensão do defeito, em múltiplas camadas. Isso pode ser uma vantagem quando o biomaterial serve como arcabouço. Este achado também foi observado no estudo de Rolim (2010) que, da mesma forma, utilizou microesferas de HA dopadas com Sr, porém com concentração e diâmetros diferentes, 1% e 400 a 600 $\mu$ m, respectivamente. No período de 15 dias, as microesferas também foram vistas preenchendo toda a extensão do defeito, dispostas em duas ou mais camadas.

No grupo **nHASr5-alg**, as microesferas se concentraram próximo da periferia e da região intermediária do defeito e, por vezes, no centro não era possível observá-las. A presença do Sr, na estrutura da HA, torna sua composição mais solúvel e quanto maior a concentração de Sr maior será a solubilidade, uma vez que a quantidade de Ca está reduzida na estrutura da HA, deixando-a menos rígida (BIGI et al, 2007). Partindo desse pressuposto, sugere-se que o fato de as microesferas, neste grupo experimental, não estarem presentes em alguns casos, por toda a

extensão do defeito, pode-se caracterizar pela solubilidade do material. O aumento da concentração do Sr, na estrutura da HA, provoca variações na morfologia e cristalinidade da HA tornando-a mais solúvel (BIGI et al., 2007). Outra possibilidade, no grupo experimental, se dá no fato de a quantidade de material implantado não ser suficiente em alguns casos, pois no momento da sua implantação, ao entrar em contato com os fluídos tissulares, notou-se uma solubilidade maior nesse grupo. Diante disto, sugere-se que o material tenha se direcionado para a periferia do defeito, o que caracterizou sua predominância apenas nas bordas ósseas.

No entanto, as microesferas implantadas em ambos os grupos possibilitaram a migração e proliferação celular de permeio às esferas devido à sua disposição e ao espaço intersticial formado (MARINS et al., 2004).

Outra característica observada após a implantação das microesferas *in vivo* foi a neoformação vascular (VS) em regiões adjacentes às microesferas, o que também foi descrito por Paula (2008), Barreto (2008), Machado (2010) Rolim (2010) e Barreto (2011). Isto sugere que os poros existentes entre as microesferas propiciaram migração e proliferação de células endoteliais (BARRIAS et al., 2006; MARCACCI et al., 2007). No grupo **GC**, onde não houve implantação de biomaterial, o defeito foi preenchido com tecido conjuntivo frouxo. Essas características foram observadas em Miguel (2006), Rolim (2010), Barreto (2011), Ribeiro (2013) e Almeida (2013). Este fato pode ser explicado pela ausência de suporte para migração das células com potencial osteogênico ao centro do defeito, impossibilitando a formação de novo osso nessa região. Essas características também podem estar relacionadas com a confecção do defeito, onde o periósteo – membrana conjuntiva que reveste o tecido ósseo, rica em células da linhagem osteoblásticas – foi removido, o que pode ter limitado ainda mais a capacidade regenerativa do defeito ósseo (ROLIM, 2010).

Outra propriedade evidenciada nos grupos experimentais (**nHASr2-Alg** e **nHASr5-Alg**) foi reação inflamatória crônica granulomatosa (caracterizada pela presença de células gigantes), associada aos biomateriais. Essa reação é a resposta padrão do organismo após a presença de corpo estranho e, possivelmente, também ocorreu devido à biodegradação das microesferas (BARRETO, 2008; PAULA, 2008; MACHADO et al., 2010; ROLIM, 2010; BARRETO, 2011). O **GC** apresentou processo inflamatório crônico inespecífico em proporções muito menores do que os grupos com implantação do material.

Os biomateriais implantados neste trabalho apresentaram características osteocondutoras, pois foi possível visualizar atividade dos osteoblastos por meio da síntese de matriz osteoide. No grupo **nHASr2-alg**, essa matriz se limitou à periferia do defeito. Algo similar foi observado no estudo de Machado e colaboradores (2010) o qual evidenciou que as microesferas de HA, dopadas com estrôncio a 1%, demonstraram biocompatibilidade, porém, a neoformação óssea se restringiu às bordas do defeito. Contudo, o biomaterial foi implantado em tíbias de ovelhas, enquanto que no presente trabalho o defeito foi confeccionado em calvária de rato. Outro estudo similar a este, com o mesmo modelo experimental, porém com concentração do Sr a 1%, mostrou neoformação óssea em permeio aos biomateriais e concentrados próximos à periferia e região intermediária do defeito (ROLIM, 2010). Contudo, no estudo de Paula (2008), em que as microesferas de HA foram adicionadas ao alginato, foi possível observar a neoformação óssea em permeio aos biomateriais por diversas regiões do defeito e sugeriu que o alg foi osteocondutor.

No grupo **nHASr5-alg**, em alguns casos, observou-se a matriz osteoide da periferia em direção ao centro do defeito. Vale ressaltar que uma diferença mínima na composição química do material pode interferir no resultado *in vivo* desse biomaterial. Isto pôde ser observado no grupo **nHASr5-alg**, onde foi possível visualizar várias ilhotas de matriz osteoide da periferia em direção ao centro do defeito, sendo uma característica muito importante, uma vez que essas ilhotas irão se unir e formar novo osso. Quando o Sr é adicionado a HA, esse compósito proporciona para o tecido ósseo o aumento da densidade mineral. Essa característica depende da concentração de Sr incorporado aos biomateriais e a interação dos mesmos ao osso neoformado (LANDI et al., 2008, ROLIM, 2010).

No grupo **GC**, a neoformação óssea reacional discreta também se limitou às bordas do defeito. Resultados semelhantes foram observados por Cardoso e colaboradores (2006), Miguel e colaboradores (2006), Barreto (2008), Machado (2010), Rolim (2010), Barreto (2011), Ribeiro (2013), Almeida (2013), onde os defeitos críticos que não foram preenchidos com biomateriais, apenas com coágulo sanguíneo, resultaram na maior parte do preenchimento com tecido conjuntivo frouxo e a neoformação óssea reacional ficou restrita às bordas do defeito. Este fato pode ser explicado pela ausência de arcabouço, o que limitou a neoformação óssea às bordas do defeito (Ribeiro, 2013).

A busca por biomateriais que sirvam como arcabouço para defeitos ósseos

críticos ainda representa um desafio para a bioengenharia tecidual óssea. As características apresentadas pelos biomateriais avaliados neste estudo, como angiogênese e osteocondução, tornam esses compósitos promissores para regeneração óssea.

## 7 CONCLUSÃO

- No grupo **GC**, a neorformação óssea foi reparativa e restrita às bordas ósseas.
- As diferentes concentrações do Sr proporcionaram diferentes efeitos biológicos, onde o grupo com menor concentração de Sr (**nHASr2-alg**) proporcionou arcabouço mais estruturado e o grupo com maior concentração (**nHASr5-alg**) evidenciou expressiva neorformação óssea.
- As microesferas foram osteocondutoras e as diferentes concentrações do Sr atuaram de formas diferentes e foram biocompatíveis.



## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ALMEIDA, Renata dos Santos. Avaliação da implantação de grânulos de TCP associado ou não à biovidro fosfato para regeneração de defeito ósseo. 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

ALSBERG, E. *et al.* Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. **Journal of Dental Research**, v. 80, n.11, p. 2025-2029, Nov. 2001. DOI: 10.1177/00220345010800111501

ANDERSEN, T. *et al.* Alginates as biomaterials in tissue engineering. **Carbohydr Chem**, v. 37, p. 227-258, 2012. DOI: 10.103919781849732765-00227

ANDRADE, L.R. Biomateriais utilizados em bioengenharia ortopédica. **Est Biol**. v. 28, n. 63, p. 17-23, 2006. Disponível em: <www2.pucpr.br/reol/index.php/BS?dd1=498&dd99=pdf>.

BAIER, M. *et al.* Strontium enhances osseous integration of calcium phosphate cement: a histomorphometric pilot study in ovariectomized rats. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, p. 8-16, 2013. DOI: 10.1186/1749-799X-8-16

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, Universidade Federal do Rio de Janeiro; Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

BARRETO, I. C. **Utilização de ranelato de estrôncio associado a biometrias para regeneração óssea**. 2011. 176f. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

BARRIAS, C. C. *et al.* **Calcium phosphate microsphere for localised delivery of a therapeutic enzyme**. Editado por Takashi Nakamura, Kimihiro Yamashita and Masashi Neo. 2006. (Key Engineering Materials, v. 309-311, p. 903-906). DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.309-311.903

BARRIAS, C. C. *et al.* **Effect of calcium phosphate addition to alginate microspheres: modulation of enzyme release kinetics and improvement of cell adhesion**. Editado por Panjian Li, Kai Zhang and Clifford W. Colwell, Jr. 2005. (Key Engineering Materials, v. 284-286, p. 689-692). DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.284-286.689

<sup>1</sup> Esta dissertação foi redigida de acordo com as Normas ABNT (LUBISCO, 2013 )

BENAQQA, C. *et al.* Slow crack growth behaviour of hydroxyapatite ceramics. **Biomaterials**, v. 26, n. 31, p. 6106-6112, 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.03.031

BHARATHAM, B. H. *et al.* Development and characterization of novel porous 3D alginate-cockle shell powder nanobiocomposite bone scaffold. **Biomed. Research International**, v. 2014, p. 11, 2014. DOI: 10.1155/2014/146723

BIGI, A. *et al.* Strontium- substituted hydroxyapatite nanocrystals. **Inorganica Chimica Acta**, v. 360, p 1009-1016, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2006.07.074>

BIKRAMJIT, B.; SABAREESWARAN, A.; SHENOY, S.J. Biocompatibility property of 100% strontium-substituted SiO<sub>2</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO-CaF<sub>2</sub> glass ceramics over 26 weeks implantation in rabbit model: Histology and micro-Computed Tomography analysis. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 103, n. 6, Aug. p. 1-12, 2014. DOI: 10.1002/jbm.b.33270

BONNELYE, E. *et al.* Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. **Bone**, v. 42, p.129-138, 2008. DOI: 10.1016/j.bone.2007.08.043

BOONTHEEKUL, T.; KONG, H. J.; MOONEY, D. J. Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution. **Biomaterials**, v.26, p.2455-2465, 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.06.044

CALASANS- MAIA, M *et al.* Short-term in vivo evaluation of zinc-containing calcium phosphate using a normalized procedure. **Materials Science and Engineering C**, v. 4, p-309-319, 2014. DOI: 10.1016/j.msec.2014.04.054

CARDOSO, A.K.M.V. *et al.* Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. **Cells Tissues Organs**, v.184, p. 128-137, 2006. <http://dx.doi.org/10.1159/000099619>

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

CHAE, T.; YANG, H.; LEUNG, V.; KO, F.; TROCZYNSKI, T. Novel biomimetic hydroxyapatite/alginate nanocomposite fibrous scaffolds for bone tissue regeneration. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 8, p. 1885-1894, 2013. DOI: 10.1007/s10856-013-4957-7

CAPUCCINI, C. *et al.* Strontium substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: In vitro osteoblast and osteoclast

response. **Acta Biomaterialia**, v. 4, p. 1885-1893, 2008.  
DOI: 10.1016/j.actbio.2008.05.005

CHEN, Y.W. *et al.* In vitro study on the influence of strontium- doped calcium polyphosphate on the angiogenesis- related behaviors of HUVECs. **J Mater Sci. Mater Med**, v. 19, n.7, p. 2655-62, 2008. DOI: 10.1007/s10856-007-3350-9.

CHUNG, T.W. *et al.* Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment. **Biomaterials**, v. 23, n. 14, p. 2827-2834, 2002.  
[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00399-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00399-4).

FARIA, M. A. *et al.* Análise histológica da lesão óssea de mandíbula de coelho após aplicação local de cloreto de estrôncio. **Rev. Gaúcha Odontotol**, v. 58, n. 4, p. 487- 490, 2010. Disponível em: Identificador único LILACS: 588562.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000700035>

KAY, M. I.; YOUNG, R. A.; POSNER, A. S. Crystal structure of hydroxyapatite. **Nature**, v. 12, n. 204, p. 1050-1052, 1964. DOI:10.1038/2041050a0

KLOAREG, B.; QUATRANO, R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix of polysaccharides. **Oceanogr Mar Biol Annu Rev.**, n. 26, p. 259-315, 1988. Disponível em:  
<<http://www.vliz.be/en/imis?module=ref&refid=79393&printversion=1&dropIMStitle=1>>.

LAFISCO, et al. Biomimetic magnesium- carbonate-apatite nanocrystals endowed with strontium ions as anti-osteoporotic trigger. **Materials Science and Engineering C.**, n. 35, p. 212-219, 2014. DOI: 10.1016/j.msec.2013.11.009

LANDI, E. et al. Development of Sr and CO<sub>3</sub> co-substituted hydroxyapatites for biomedical application. **Acta Biomater**, v. 4, n. 3, p. 656-663, 2008.  
DOI:10.1016/j.actbio.2007.10.010

LAVIK, E.; LANGER, R. Tissue engineering: current state and perspectives. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 65, p. 1-8, 2004. DOI: 10.1007/s00253-004-1580-z

LI, Y. *et al.* The effect of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant fixation in ovariectomized rats. **Biomaterials**, v. 31, p. 9006–9014, 2010.  
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.112

MACHADO, C.P.G. *et al.* Avaliação da hidroxiapatita contendo estrôncio como substituto ósseo em tíbias de ovelhas. **Innov Implant J: Biomater Esther**, v.5, n. 1, p. 9-14, 2010. Disponível em: Identificador único BBO:33609.

MARCACCI, M. *et al.* Stem cells associated with macroporous bioceramics for

long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. **Tissue Eng.** 2007 May; 13(5):947-55. DOI: 10.1089/ten.2006.0271

MARINS, L. V. *et al.* Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. *J. Appl. Oral Sci.*, v.12, p.62-9, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-77572004000100012>

MAZUMDER, M. A. *et al.* Core cross linked alginate microcapsules for cell encapsulation. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 6, p. 1365-1373, 2009. DOI: 10.1021/bm801330j.

MIGUEL, F.B. *et al.* Morphological assessment of the behavior of threedimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. **J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater**, v.78, p. 334-339, 2006. DOI: 10.1002/jbm.b.30492.

NI, G. X. *et al.* Interfacial behaviour of strontium-containing Hydroxyapatite cement with cancellous and cortical bone. **Biomaterials**, v. 27, p. 5127–5133, 2006. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.05.030

NOUNAH, A; SZILAGYI, J; LACOUT, J.L . Calcium-cadmium substitution in hydroxyapatites. **Annales de Chimie-Science Des Materiaux**, v. 15, n. 7-8, p. 409-419, 1990. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?isbn=142003278X>>.

OLIVEIRA, L. S. A. F. **Estudo comparativo entre radiografia digitalizada e digital na avaliação de reparo de defeito ósseo crítico com biomateriais.** Salvador, 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) - Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

PALONE, M. R. T; SILVA, T. R; DALBEN, G. S. A bioengenharia tecidual em favor da reabilitação de indivíduos com fissura labiopalatina. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 48, n. 2, p. 113-118, 2015. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/99744/98165>>. doi:<http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v48i2p113-118>.

PAULA, F. L. **Avaliação in vivo de um compósito de hidroxiapatita e alginato no reparo ósseo.** 2008. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PORTER, J. R; RUCKH, T. T; POPAT, K. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 6, p. 1539-1560, 2009. DOI:10.1002/btpr.246

RAUCCI, M. G. *et al.* Effects on growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by the strontium-added sol–gel hydroxyapatite gel

materials. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 26, n. 2, p. 90, 2015. DOI: 10.1007/s10856-015-5436-0

RIBEIRO, I. I. A. **Estudo da implantação *in vivo* de biomateriais compósitos de fosfato de cálcio e polímero**. Salvador, 2013. 78 f. il. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

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

RÖMER, P. *et al.* Strontium promotes cell proliferation and suppresses IL-6 expression in human PDL cells. **Annals of anatomy**, v. 194, n. 2, p. 208-211, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.09.008>

ROSSI, A. L. *et al.* Effect of strontium ranelate on bone mineral: Analysis of nanoscale compositional changes. **Micron**, v. 56, p. 29-36, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.09.008>

SHALAK, R.; FOX, C. Tissue engineering proceedings. **Workshop held at Granlibakken**, p. 26-29, 1988. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books/about/Tissue\\_engineering.html?id=Y9tqAA AAMAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.br/books/about/Tissue_engineering.html?id=Y9tqAA AAMAAJ&redir_esc=y)>.

SCHMITZ, J. P; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 205, p. 299-308, 1986. PMID 3084153

SUN, J; TAN, H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. **Materials**, v. 6, p. 1285- 1309, 2013. DOI:10.3390/ma6041285

TERRA, J. *et al.* The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.11, p.574, 2009. DOI: 10.1039/B802841a.

TUFIK, S. *et al.* Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: Unifesp, 2004.

VALIENSE, H. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of strontium-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite/sodium alginate for sinus lift in rabbits. **Journal of Biomedical Materials**, v. 104, n. 2, p. 274-282, 2015. DOI: 10.1002/jbm.b.33392

VENKATESAN, J. *et al.* Alginate composites for bone tissue engineering: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 269-281, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008>

VENKATESAN, J. *et al.* Nano-hidroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering: A review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 10, p. 3124-3140, 2014. PMID: 25992432

VERBERCKMOES, S. C. *et al.* Effects of strontium on the physicochemical characteristics of Hydroxyapatite. **Calcif Tissue Int**, v. 75, p. 405-415, 2004. DOI: 10.1007/s00223-004-0260-4

VESTERMARK, M. T. *et al.* Strontium doping of bone graft extender effect on fixation of allografted experimental implants. **Acta Orthopaedic**, v. 82, n. 5, p. 614-621, 2011. DOI: 10.3109/17453674.2011.618909

VOGEL, M. *et al.* *In vivo* comparison of bioactive glass particle in rabbits. **Biomaterials**, [Guildford], v. 22, n. 4, p. 357-362, fev. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00191-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00191-5)

WEI, L. *et al.* A comparative study of Sr incorporated mesoporous bioactive glass scaffolds for regeneration of osteopenic bone defects. **Osteoporos Int**, v. 25, p. 2089-2096, 2014. DOI: 10.1007/s00198-014-2735-0

WONG, K. L. *et al.* Mechanical properties and *in vitro* response of strontium-containing hydroxyapatite/polyetheretherketone composites. **Biomaterials**, v. 30, n. 23, p. 3810- 3817, 2009. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.016

WONG, C. T. *et al.* Ultrastructural study of mineralization of a strontium-containing hydroxyapatite (Sr-HA) cement *in vivo*. **J. Biomed. Mater Res A**, v. 70A, n. 3, p. 428- 435, 2004. DOI: 10.1002/jbm.a.30097

WU, C. *et al.* The effect of strontium incorporation into CaSiO<sub>3</sub> ceramics on their physical and biological properties. **Biomaterials**, v. 28, p. 3171- 3181, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.002>

ZAKARIA, S. M. *et al.* Nanophase hydroxyapatite as a biomaterial in advanced hard tissue engineering: A review. **Tissue Engineering**, v. 19, n. 5, p. 431-441, 2013. DOI: 10.1089/ten.TEB.2012.0624

ZHANG, J; WANG, Q; WANG, A. *In situ* generation of sodium alginate/hydroxyapatite nanocomposite beads as drug-controlled release matrices. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 445- 454, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.07.001>

ZHAO, S. *et al.* Three-dimensional printed strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for repairing rat critical-sized calvarial defects. **Acta Biomaterialia**, v. 12, p. 270-280, 2015. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.10.015

## **ANEXOS**

## **ANEXO A**





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



## CERTIFICADO

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

Salvador, 12 de setembro de 2014.

Profª Dra. Tania Tavares Rodriguez

Coordenadora da CEUA-ICS

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

## **ANEXO B**



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



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa de protocolo número **064/2014**, intitulado “**Nanobiomateriais para bioengenharia tecidual óssea**”, sob a responsabilidade do Professora Doutora Fabiana Paim Rosa, lotada no setor de Biointeração do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), está de acordo com as exigências legais atuais para experimentação animal e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **12 de setembro de 2014**.

Salvador, 12 de setembro de 2014.

Profª Dra. Tania Tavares Rodriguez

Coordenadora da CEUA-ICS

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

CEUA-ICS

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

Telefone: (71) 3283-8958



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

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