



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS EM SAÚDE

JACQUELINE DE AZERÊDO SILVA

**AVALIAÇÃO DO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO NÃO CRÍTICO
COM A UTILIZAÇÃO DE HIDROXIAPATITA DOPADA OU NÃO
COM MAGNÉSIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Salvador

2014



**AVALIAÇÃO DO REPARO DE DEFEITO ÓSSEO NÃO CRÍTICO
COM A UTILIZAÇÃO DE HIDROXIAPATITA DOPADA OU NÃO
COM MAGNÉSIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias em Saúde da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Tecnologias em Saúde

Autor: Jacqueline de Azerêdo Silva

Orientador: Prof. Dr. Fúlvio Borges Miguel

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Andrade Barreto

Salvador

2014

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca Central da EBMSP

S586 Silva, Jacqueline de Azerêdo

Avaliação do reparo de defeito ósseo não crítico com a utilização de hidroxiapatita dopada ou não com magnésio. Jacqueline de Azerêdo Silva. – Salvador. 2014.

71f. il.

Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Fúlvio Borges Miguel

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Andrade Barreto

Inclui bibliografia

1.Regeneração óssea. 2.Biomateriais. 3.Hidroxiapatita. 4.Magnésio I. Título.

CDU: 616.71

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SILVA, Jacqueline de Azerêdo
Título: Avaliação do reparo de defeito ósseo não crítico com a utilização de hidroxiapatita dopada ou não com magnésio.

Dissertação apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Medicina e Saúde Humana.

Data da defesa: 21 de agosto de 2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. Atson Carlos de Souza Fernandes
Doutor em Ciências Morfológicas, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)
Universidade do Estado da Bahia (UNEB)
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

Prof^a. Dr^a. Isabela Cerqueira Barreto
Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Prof^a. Dr^a. Livia Souza Pugliese
Doutora em Ciências, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)
Universidade do Estado da Bahia (UNEB)
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Edgar e Heloísa, pelas lições de persistência, honestidade e amor, importantes para a formação de meu caráter. À minha irmã Soraia e ao meu marido Newton, por me estimular a nunca desistir dos meus sonhos. E aos meus queridos filhos, Caroline e Luís Felipe, meus incentivadores, pela compreensão do tempo dedicado a este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar meu caminho e me acolher nos momentos mais difíceis, fortalecendo minha fé e esperança para superar os obstáculos.

Agradeço aos animais que contribuíram com sua vida em prol da Ciência.

Aos meus pais, Edgar e Heloísa, pela iniciação da fé e esperança, que apesar de todos os absurdos a que assistimos nos dias atuais e achar que não tem jeito, devemos acreditar em um mundo melhor.

A minha irmã Soraia, meu apoio em todos os momentos.

Ao meu marido Newton, pelo incentivo.

Aos meus queridos filhos, Caroline e Luís Felipe, pela paciência e incentivo.

Ao professor Fúlvio Borges Miguel, sempre disposto a auxiliar, grande apoio para realização e conclusão deste trabalho. Um incentivador, amigo e admirável, que Deus colocou no meu caminho. Muito obrigada!

A professora Isabela Cerqueira Barreto, que disponibilizou seu tempo para auxiliar na execução deste trabalho. Muito obrigada!

Ao professor Maurício Barreto que também disponibilizou seu tempo para auxiliar na cirurgia experimental. Obrigada!

A professora Carla Daltro, que disponibilizou seu tempo para auxiliar na bioestatística deste trabalho. Obrigada!

Ao professor Marcos Almeida, Coordenador do Mestrado em Tecnologias em Saúde. Muito obrigada pela oportunidade e apoio!

Ao pesquisador Alexandre M. Rossi e à química Silvia R. Albuquerque Santos do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), pela concessão do biomaterial utilizado neste estudo.

À professora Fabiana Paim Rosa, pela concessão dos equipamentos do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, necessários à captura das imagens histológicas e análise histomorfométrica.

Ao professor Aryon de Almeida Barbosa Júnior, pela concessão do Instituto de Patologia Geral e Cutânea – IPAC, para o processamento histológico dos espécimes.

Ao mestrando George Gonçalves e às doutorandas Iorrana Ribeiro e Renata Almeida, pela grandiosa ajuda, o que foi muito importante para a conclusão deste trabalho.

Ao Biotério da UEFS, especialmente ao médico veterinário Orestes da Paixão e ao técnico em biotério Florisvaldo da Costa Brandão Júnior, pela grande ajuda durante a realização dos experimentos.

A técnica de laboratório Cristina dos Santos Vasconcelos Mota, pela dedicação no processamento histológico dos espécimes.

À Conceito Auditoria, pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

Ao Centro de Medicina Hiperbárica, pelo fornecimento de alguns materiais para execução da cirurgia experimental.

A todos que de alguma forma contribuíram para mais esta conquista.

“É justamente a possibilidade de realizar um sonho que torna a vida interessante”

Paulo Coelho

RESUMO

A hidroxiapatita sintética é um biomaterial que tem sido amplamente pesquisado, devido à sua semelhança com componentes da fase mineral do tecido ósseo, excelente biocompatibilidade e osteocondutividade. Durante o preparo destas cerâmicas, pode-se fazer substituições iônicas que melhorem sua eficiência biológica, mimetizando a apatita biológica, com vistas a contribuir com a osteogênese. Um dos íons utilizados nesse processo é o magnésio, mineral essencial à formação e homeostasia do tecido ósseo. Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo*, o reparo de defeito ósseo não crítico, em calvária de rato, após a implantação de microesferas de hidroxiapatita dopada, ou não, com magnésio. Para tanto, utilizou-se 24 ratos machos, distribuídos aleatoriamente para compor três grupos experimentais, com quatro animais em cada grupo e ponto biológico –15 e 45 dias de pós-operatório: GHAMg – defeito preenchido com microesferas de hidroxiapatita dopadas magnésio; GHA – defeito preenchido com microesferas de hidroxiapatita sem magnésio; GC – grupo controle, defeito sem biomaterial de preenchimento. Na análise histológica observou-se, no GI, neoformação óssea além da borda, que evoluiu gradativamente com o ponto biológico, e reação inflamatória crônica granulomatosa mais evidente neste grupo, em ambos os pontos biológicos, quando comparado ao GHA. No GHA a neoformação também ocorreu de forma centrípeta a partir da borda, e uma inflamação crônica granulomatosa associada às microesferas foi observada. No GC, houve neoformação óssea, porém limitada às bordas do defeito, com formação de tecido conjuntivo fibroso na área remanescente do defeito nos dois pontos biológicos. Diante destes resultados, conclui-se que os biomateriais estudados foram biocompatíveis e osteocondutores, contudo a hidroxiapatita dopada com magnésio não favoreceu maior regeneração óssea.

Palavras-Chave: regeneração óssea, biomateriais, hidroxiapatita, magnésio.

ABSTRACT

The synthetic hydroxyapatite is a biomaterial that has been widely researched due to its similarity to components of the mineral phase of bone, excellent biocompatibility and osteoconductivity. During the preparation of these ceramics can be made ionic substitutions that improve the biological efficiency, mimicking the biological apatite, aiming to contribute to osteogenesis. One of the ions used in this process is magnesium, essential mineral in the formation and homeostasis of bone tissue. Hence, the aim of this study was to evaluate *in vivo* repair bone noncritical defects in rat calvaria, after implantation of hydroxyapatite microspheres doped or not with magnesium. For this, we used 24 male rats were randomly divided to form three groups with four animals in each group and biological point – 15 and 45 days postoperatively: GHAMg – defect filled with hydroxyapatite microspheres doped magnesium; GHA – defect filled with hydroxyapatite microspheres without magnesium; GC – group control, biomaterial filling defect without. In histological analysis was observed in GI, bone formation over the border, which gradually evolved with the biological point and was more pronounced chronic granulomatous inflammatory reaction in this group, both biological points compared to GHA. In GHA neoformation also occurred in a centripetal way from the border, and a chronic granulomatous inflammation associated with the microspheres was observed. In GC, there was bone formation, but limited to the borders of the defect, with the formation of fibrous connective tissue in the remaining area of the defect in two biological points. Considering these results, it is concluded that the biomaterials were studied biocompatible and osteoconductive, however hydroxyapatite doped with magnesium did not favor increased bone regeneration.

Keywords: bone regeneration, biomaterials, hydroxyapatite, magnesium.

LISTA DE FIGURA

- Figura 1 - Tipo de biomateriais. (A) Biomaterial metálico, placas em titânio para reconstrução facial; (B) Biomaterial polimérico, polietileno para implante de queixo e (C) Biomaterial cerâmico, cimento de HA, para preenchimento ósseo23
- Figura 2 - Classificação dos materiais de acordo com sua origem e interação com o meio fisiológico.25
- Figura 3 - Unidade de cristal de HA. Ca: cálcio; Na: sódio; Mg: magnésio; Sr: estrôncio; OH: hidróxido; Cl: cloreto; F: flúor; PO₄ e HPO₄: fosfato; CO₃: carbonato.....29
- Figura 4 - Mecanismos envolvidos na relação entre deficiência de Mg e o aparecimento da osteoporose. PTH: paratormônio; vit D: vitamina D.....31
- Figura 5 - Sequência cirúrgica para a confecção do defeito ósseo. (A) Tricotomia da região da calvária. (B) Exposição do tecido ósseo. (C) Demarcação do defeito ósseo na porção mediana da calvária. (D) Defeito ósseo não crítico confeccionado.....36
- Figura 6 - Desenho esquemático do defeito não crítico em calvária de rato. (a) Linha de referência para o corte transversal dos espécimes; (b) área seccional do defeito após corte transversal.37
- Figura 7– GHAMg 15d. Preenchimento do defeito ósseo com as microesferas (M) de HAMg em única camada. Na região próxima às bordas ósseas (Bo) notam-se áreas de mineralização (*) associadas às microesferas (M). Na região central do defeito observa-se um tecido conjuntivo (Tc) com aspecto denso. Veia central (Vc). HE. Barra 300 µm.39
- Figura 8– GHAMg 15d. Neoformação óssea (*) associada à borda óssea (Bo) e ao biomaterial, de permeio às microesferas (M). Tecido conjuntivo (Tc) circundando as microesferas ao longo do defeito. Veia central (Vc). PIFG. Barra 300 µm.....40
- Figura 9 – GHAMg 15d. Deposição de matriz osteóide (*) associada à borda óssea (Bo) e às microesferas (M) de HAMg. Microesferas preenchendo o defeito e circundadas por tecido conjuntivo (Tc). PIFG. Barra 200 µm. 40
- Figura 10– GHAMg 15d. Mineralização (*) ao redor e de permeio às microesferas (M) deHAMg. Na região superior, onde não houve mineralização, nota-se a presença de tecido conjuntivo (Tc) com aspecto denso. HE. Barra 200 µm.....41
- Figura 11 – GHAMg 15d. Presença de tecido conjuntivo fibroso circundado as microesferas (M) de HAMg. Reação inflamatória crônica (Ri) granulomatosa moderada com células gigantes multinucleadas (→) associadas ao biomaterial. HE. Barra 100 µm.41

Figura 12 – GHAMg 15d. Estroma com tecido conjuntivo fibroso (Tc) e presença de células gigantes multinucleadas (→) circundando a microesfera (M) de HAMg. HE. Barra 50 µm.	42
Figura 13 – GHAMg 45d. Presença de matriz osteóide (*) associada às bordas ósseas (Bo) e ao longo do defeito em associação às microesferas (M) que ocuparam toda a extensão do defeito ósseo. Presença de tecido conjuntivo (Tc) na região central. HE. Barra 300 µm.....	43
Figura 14 – GHAMg 45d. Mineralização (*) próxima às bordas ósseas e circunjacente às microesferas (M) de HAMg. Tecido conjuntivo fibroso (Tc) na região central do defeito circundando o biomaterial. HE. Barra 300 µm.	43
Figura 15 – GHAMg 45d. Tecido mineralizado em organização (*) circunjacente à microesfera (M) de HAMg. Nota-se a presença de osteócitos (→) e tecido conjuntivo (Tc). HE. Barra 50 µm.....	44
Figura 16 – GHAMg 45d. Presença de tecido conjuntivo (Tc), rico em vasos sanguíneos (→) de permeio às microesferas (M) de HAMg. Preenchimento do defeito com múltiplas camadas de biomaterial. HE. Barra 200 µm.....	44
Figura 17 – GHA 15d. Microesferas (M) de HA preenchendo toda a extensão do defeito. Mineralização (*) próxima às bordas ósseas (Bo) e ao longo do defeito em associação com as microesferas (M). Presença de tecido conjuntivo (Tc) na região central. HE. Barra 300 µm.....	45
Figura 18– GHA 15d. Mineralização (*) nas proximidades da borda óssea (Bo) e circunjacente às microesferas (M) de HA. HE. Barra 200 µm.	46
Figura 19 – GHA 15d. Presença de matriz osteóide neoformada (*) nas proximidades da borda óssea (Bo) e circundando as microesferas (M) de HA presentes nesta região. Deposição de tecido conjuntivo (→) dentro da microesfera. PIFG. Barra 200 µm.....	46
Figura 20 – GHA 15d. Tecido conjuntivo (Tc) organizado na região superior do defeito. Nota-se aspecto heterogêneo das microesferas de HA, algumas têm aspecto mais denso (Md) outras mostram-se porosas (Mp). HE. Barra 200 µm.....	47
Figura 21 – GHA 15d. Presença de tecido conjuntivo circundando a microesfera (M) de HA, associado à reação inflamatória crônica granulomatosa (RI), com presença de células gigantes multinucleadas (→). HE. Barra 50 µm.....	47
Figura 22 – GHA 45d. Presença de mineralização em, praticamente, toda extensão do defeito circunjacente às microesferas (M) de HA. O biomaterial preencheu todo o defeito e se organizou em múltiplas camadas. HE. Barra 300 µm.	48

Figura 23 – GHA 45d. Presença de matriz osteóide (*) associada à borda óssea (Bo) e circundando a microesfera (M) de HA próxima a esta região. PIFG. Barra 200 µm.	49
Figura 24 - GHA 45d. Mineralização (*), com áreas já em organização, circundando a microesfera (M) de HA. Presença de osteócitos. HE. Barra 100 µm.....	49
Figura 25 - GHA 45d. Presença de tecido conjuntivo (Tc), rico em vasos sanguíneos (→) de permeio as microesferas (M) de HA. Preenchimento do defeito com múltiplas camadas de biomaterial. HE. Barra 200 µm.....	50
Figura 26 – GHA 45d. Septos de tecido conjuntivo (→) ao redor das microesferas (M) de HA e também no interior de algumas microesferas. PIFG. Barra 200 µm.....	50
Figura 27 - GHA 45d. Presença de tecido conjuntivo (Tc) circundando as microesferas (M) de HA, com presença de vasos sanguíneos (*) e células gigantes multinucleadas (→). HE. Barra 100 µm.....	51
Figura 28 – GC 15d. Mineralização (*) restrita às bordas ósseas (Bo) e área residual preenchida por tecido conjuntivo (Tc) em toda sua extensão. Veia central (Vc). HE. Barra 300 µm.	52
Figura 29 – GC 15d. Mineralização (*) associada a borda óssea (Bo) com tecido conjuntivo (Tc) em toda a área residual do defeito. HE. Barra 200 µm.	52
Figura 30 – GC 15d. Presença de tecido conjuntivo associado a uma reação inflamatória crônica (Ri), infiltrado inflamatório monomorfonuclear. Nota-se a presença de células fusiformes (→) e vasos sanguíneos (*). HE. Barra 50 µm.....	53
Figura 31 – GC 45d. Defeito ósseo preenchido por tecido mineralizado (*), com a presença de uma pequena área de tecido conjuntivo (Tc) na região central. Borda óssea (Bo). HE. Barra 300 µm.	54
Figura 32 – GC 45d. Presença de tecido conjuntivo fibroso (Tc) na região central do defeito. Matriz osteóide (*). PIFG. Barra 100 µm.	54
Figura 33 - Mensuração da extensão linear do defeito ósseo dos grupos experimentais, nos pontos biológicos de 15 e 45 dias.	55
Figura 34 - Análise da razão de matriz osteóide neoformada na área seccional total do defeito dos grupos experimentais, nos pontos biológicos de 15 e 45 dias.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de animais de acordo com o grupo experimental e ponto biológico.	35
Tabela 2 - Média (desvio-padrão) da extensão linear do defeito ósseo dos grupos experimentais, nos pontos biológicos de 15 e 45 dias.	55
Tabela 3 - Média (\pm desvio-padrão) da área de matriz osteóide neoformada dos grupos experimentais, nos pontos biológicos de 15 e 45 dias.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µm	Micrômetro
Al	Alumínio
AMM	Área de matriz mineralizada do defeito
AT	Área total do defeito
Bo	Borda óssea
BSP	Sialoproteína óssea
Ca	Cálcio
CBPF/RJ	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas/Rio de Janeiro
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais
EBMSP	Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública
EL	Extensão linear do defeito
GHAMg	Grupo defeito ósseo preenchido com hidroxiapatita dopada com magnésio
GHA	Grupo defeito ósseo preenchido com hidroxiapatita
GC	Grupo controle
HA	Hidroxiapatita
HAMg	Hidroxiapatita dopada com magnésio
HE	Hematoxilina-eosina
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
LBTB	Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais
M	Microesferas
Md	Microesferas densas
MEC	Matriz Extracelular
Mg	Magnésio
mL	Mililitro
Mm	Milímetros
Mo	Matriz osteóide
Mp	Microesferas porosas
nº.	Número
OC	Osteocalcina
ON	Osteonectina
OP	Osteopontina

PIFG	Picrossíriusred
PMMA	Polimetilmetacrilato de metila
Ri	Reação inflamatória crônica
Sr	Estrôncio
Tc	Tecido conjuntivo
Tcf	Tecido conjuntivo frouxo
TCP	Tricálcio fosfato
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFBA	Universidade Federal da Bahia
Vc	Veia central
VM	Vesículas da matriz
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Tecido Ósseo	19
2.1.1 Reparo Ósseo	21
2.2 Biomateriais	22
2.2.1 Biomateriais substitutos ósseos	24
2.2.2 Hidroxiapatita	28
2.2.3 Magnésio	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4 METODOLOGIA	33
4.1 Biomateriais	33
4.1.1 Processamento das microesferas	33
4.1.1.1 <i>Preparação dos pós de HA</i>	33
4.1.1.2 <i>Preparação das microesferas</i>	34
4.2 Etapa experimental	34
4.2.1 Amostra	34
4.2.2 Técnica Cirúrgica	35
4.3 Etapa laboratorial	37
4.3.1 Processamento histológico	37
4.4 Análise morfométrica	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Análise histomorfológica	39
5.2.1 Extensão linear do defeito ósseo	55
5.2.2 Área de matriz osteóide neoformada	56
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO	71

1 INTRODUÇÃO

A Bioengenharia Tecidual Óssea é uma área emergente, interdisciplinar e multiprofissional, que tem ganhado destaque, nos últimos anos, devido aos avanços técnico-científicos e às demandas biomédicas e socioeconômicas. Nesta área os princípios das ciências biológicas e das engenharias são utilizados para o desenvolvimento ou aperfeiçoamento de biomateriais ou técnicas regenerativas que melhorem ou restaurem a função tecidual comprometida^{1,2,3}. Estes biomateriais podem ser produzidos a partir de substratos metálicos; poliméricos, naturais ou sintéticos; cerâmicos; ou uma mistura de dois ou mais tipos, denominados compósitos⁴.

Os biomateriais devem apresentar propriedades físico-químicas e biológicas, bem como morfologia, compatíveis com os tecidos vivos para atuarem como arcabouços tridimensionais que favoreçam a regeneração tecidual ou para substituírem de forma adequada os tecidos danificados ou perdidos^{5, 4}. Dentre uma grande variedade de materiais, as cerâmicas representam um grupo que tem sido amplamente utilizado nas técnicas regenerativas ósseas e dentárias³, como nos casos de pseudoartrose e perda óssea em alvéolos dentários. Dentre elas, aquelas à base de fosfato de cálcio (Ca), principalmente a hidroxiapatita (HA) tem se destacado devido à similaridade com componentes da fase mineral do tecido ósseo, por favorecer a interação entre o tecido e o biomaterial, por sua boa biocompatibilidade, excelente osteocondutividade^{6,7}, ausência de toxicidade, local ou sistêmica^{6, 7} e por servir de arcabouço tridimensional para os eventos celulares ocorridos durante a regeneração tecidual, como a angiogênese e a neoformação óssea.

Aperfeiçoar as propriedades da HA é uma perspectiva promissora para a área biomédica, uma vez que contribui para modificar e/ou melhorar a resposta tecidual a este biomaterial. Como exemplo, têm-se as substituições isomórficas que mantêm a estrutura hexagonal da HA⁷⁻⁹. Neste caso, o Ca da HA pode ser substituído por metais como zinco (Zn), estrôncio (Sr) e magnésio (Mg)^{7,9}. Estas substituições modificam as propriedades físico-químicas deste biomaterial e podem interferir na resposta tecidual ao mesmo.

O Mg é um íon interessante para ser utilizado nestas substituições, pois este mineral tem grande importância nas fases iniciais da osteogênese, na qual está

intimamente associado ao mecanismo de mineralização e atua sobre as células ósseas, ao estimular a proliferação de osteoblastos¹⁰⁻¹². Sua deficiência pode causar danos à rigidez óssea e, conseqüentemente, aumentar os riscos a osteoporose^{13,12}. Aproximadamente de 53% do Mg distribuído pelo corpo humano está depositado no tecido ósseo^{11,12}.

Uma vez instituídas estas incorporações na HA sintética, faz-se necessária a realização de novos estudos para avaliar seu comportamento *in vivo*, quando em contato com os fluidos corpóreos, visto que estas substituições alteram a cristalinidade, a solubilidade, os parâmetros de rede, estabilidade térmica e reatividade superficial^{14,9}, a bioatividade, a biocompatibilidade¹⁰ e as propriedades de adsorção da estrutura da HA¹⁵.

Diante do exposto, fica evidente a necessidade de realizar estudos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, capazes de elucidar as interferências das novas características físico-químicas da HA dopada com Mg no reparo tecidual. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar, *in vivo*, a biocompatibilidade e o potencial osteogênico de microesferas de HA dopadas ou não com Mg, produzidas com tecnologia nacional, em defeito ósseo não crítico na calvária de rato.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado, metabolicamente ativo, rico em matriz extracelular (MEC) e diferentes tipos celulares: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Estas células estão imersas em uma MEC mineralizada, composta pelas fases orgânica e inorgânica, que associadas proporcionam resistência e resiliência, dureza a este tecido¹⁶.

A arquitetura macroscópica deste tecido divide-se em cortical ou compacto e esponjoso ou trabecular^{17,18}. O primeiro é denso, encontra-se na região mais periférica do tecido ósseo e resiste melhor ao estresse mecânico, quando comparado ao esponjoso. Este último é trabeculado, pois apresenta espaços intercomunicantes que abrigam a medula óssea e não suporta forças mecânicas excessivas¹⁸⁻²⁰.

As superfícies ósseas, internas e externas, são revestidas, respectivamente, pelo endóstio e perióstio, membranas que apresentam grande importância para a integridade do tecido ósseo¹⁸. O perióstio é constituído de duas camadas uma externa, rica em vasos sanguíneos e nervos, fibroblastos e fibras de colágeno, com núcleos intensamente corados, esparsos em meio à MEC^{17,19}. A outra camada, interna, denominada “*cambium*”¹⁹, é composta de dois tipos celulares: I) células fusiformes com núcleos alongados, da linhagem osteogênica e II) células arredondadas e caracterizadas pela grande quantidade de citoplasma basofílico, em contato direto com a superfície do osso; são os osteoblastos. Esta membrana encontra-se ausente nas superfícies articulares. Já o endóstio é composto por uma única camada achatada de osteoblastos quiescentes²⁰.

Os três tipos celulares presentes no tecido ósseo, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos são responsáveis, respectivamente, pela síntese, manutenção e reabsorção da MEC²⁰. Os osteoblastos originam-se de células mesenquimais indiferenciadas e apresentam-se como células cubóides, mononucleadas, polarizadas, com núcleo esférico e citoplasma basófilo. Estas células são responsáveis pela síntese da matriz orgânica do tecido ósseo, bem como pela sua mineralização¹⁸. Quando são encontradas na superfície óssea com o aspecto

ligeiramente alongado formando uma camada contínua, são denominadas de células de revestimento ósseo^{18,21,20}. Os osteoblastos que ficam aprisionados na matriz óssea mineralizada tornam-se osteócitos^{20,21}, células que mantêm e preservam a MEC deste tecido¹⁷. Estas células são fundamentais para a remodelação óssea, uma vez que possuem receptores para hormônios como, por exemplo, da tireóide e da paratireoide, estrogênios, glicocorticóides, insulina, vitamina D (1,25 Dihidroxitamina D3)¹⁸.

Os osteoclastos são formados a partir de células do sistema monocítico-fagocitário, que se fusionam e originam as células multinucleadas^{22,23}. Caracterizam-se bioquimicamente por apresentar diferentes tipos de enzimas: fosfatase ácida resistente ao tartarato, adenosina ácida trifosfatadavanadato sensível, isosimaanidrase carbônica II, entre outras, sendo responsáveis pela reabsorção óssea, dentro das denominadas lacunas de *Howship*¹⁸.

Recentes avanços levaram a descoberta do sistema chave de regulação molecular para a remodelação óssea, mecanismos moleculares e as proteínas envolvidas no processo de reabsorção óssea. Atualmente, compreende-se que este processo é controlado por um sistema composto por três proteínas: o receptor ativador do fator nuclear kappa-beta (RANK), o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-beta (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG)²⁴. A estimulação, diferenciação e ativação de osteoclastos é estimulada quando o RANKL se liga ao seu receptor RANK. Esse efeito estimulante é inibido por seu antagonista (OPG), que impede a ligação do RANKL com o receptor RANK, inibindo a reabsorção óssea, ou seja, inibe a ativação e diferenciação dos osteoclastos. O sistema RANK também contribui para a reabsorção óssea induzindo a expressão de uma proteinase (catepsina K), que é produzida por osteoclastos ativados e está envolvida com a solubilização da matriz óssea²². Osteoporose pós-menopausa, artrite reumatóide, doença periodontal, tumores ósseos benignos e malignos, metástases ósseas, doença de Paget e hipercalcemia maligna, são algumas das patologias relacionadas com as anormalidades nesse sistema²⁵. A deficiência de OPG resulta em osteoporose, pela maior reabsorção óssea²⁶.

A MEC do tecido ósseo é constituída por componentes orgânico e inorgânico. O componente orgânico corresponde a 1/3 do tecido ósseo e é também denominado de matriz orgânica. Esta matriz dá forma ao osso e garante sua resistência tênsil. Os

outros 2/3 formam a matriz inorgânica composta por sais minerais de fosfato de cálcio, carbonatos, sódio, flúor, citrato e magnésio^{14,17}. As porções, orgânica e inorgânica, da matriz interagem para fornecer propriedades mecânicas de elasticidade, resistência e dureza, características do tecido ósseo²⁰.

A matriz orgânica é composta principalmente por colágeno tipo I, cerca de 90%^{18,27}. Entretanto, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas, proteínas não colagênicas, como osteopontina (OP), sialoproteína óssea (BSP), osteonectina (ON) e osteocalcina (OC), também fazem parte desta matriz^{18,20,28}. Estas proteínas auxiliam na formação da matriz tridimensional deste tecido e na interação célula-célula, célula-matriz²⁹, células-fatores de crescimento e deposição de sais minerais.

A parte inorgânica da MEC do tecido ósseo é constituída, principalmente, por fosfato de cálcio, organizado como cristais de HA – apatita biológica^{18,30}. Ademais, podem também ser encontrados, em menor quantidade, bicarbonato, sódio, potássio, citrato, Mg, carbonato, lactato, fluoreto, Zn, bário e Sr^{18,26,31}. O Mg é o quarto cation mais abundante no corpo humano e cerca de 53% é encontrado naturalmente no osso, principalmente, no cortical³². Este micronutriente é depositado, em sua maioria, na superfície dos cristais de HA³³.

2.1.1 Reparo Ósseo

Durante o reparo ósseo, eventos como inflamação, fibroplastia e remodelação, que ocorrem durante a cicatrização normal de feridas em tecidos moles, também ocorrem. Após uma fratura ou lesão óssea, ocorre ruptura vascular, que ativa a cascata de coagulação, seguida da formação de hematoma^{19,34}. As extremidades ósseas no local de fratura, privadas de seu suprimento sanguíneo, tornam-se necróticas e são reabsorvidas pelos osteoclastos¹⁷. O comprometimento do suprimento sanguíneo também priva os osteócitos de nutrientes essenciais, os quais, conseqüentemente, morrem.

Mediadores inflamatórios liberados pelas plaquetas fazem com que os vasos sanguíneos dilatem-se e exsudem plasma, levando à formação de edema¹⁷. Neste momento, as células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares, seguidos por macrófagos e linfócitos, migram para a região. À medida que a resposta

inflamatória regride, o tecido necrótico e o exsudato são reabsorvidos, e os osteoblastos aparecem e começam a produzir nova matriz osteóide^{17,35}.

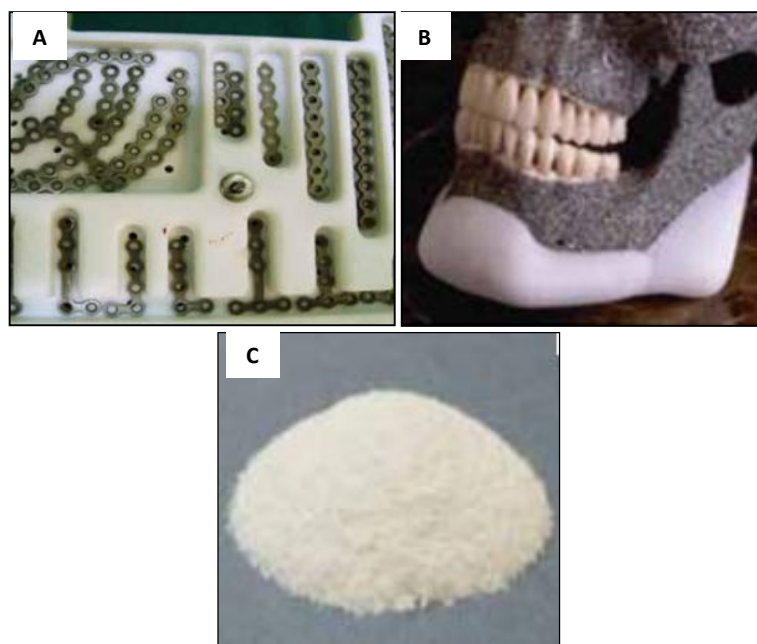
À medida que o reparo progride, o pH gradualmente retorna a neutro e a seguir fica alcalino; assim a atividade da fosfatase alcalina é otimizada e promove a mineralização do calo da fratura¹⁷. Este evento leva à proliferação das células do periosteio e à formação do calo ósseo na área lesionada, com consequente neoformação óssea, constituída, inicialmente, por osso imaturo, gradualmente substituído por osso lamelar²⁰. Ao mesmo tempo, há neoformação vascular, a partir de vasos sanguíneos já existentes. E, finalmente, ocorre a remodelação tecidual e redução do tecido neoformado para o tamanho ósseo inicial^{36, 37}.

Devido a este potencial regenerativo, semelhante ao da osteogênese embriológica³⁴, defeitos ósseos pequenos reparam-se por regeneração e sem a formação de cicatriz fibrosa¹⁹. Em contrapartida, situações em que a morfologia e dimensão do defeito são extensas e críticas ao reparo, o mecanismo regenerativo torna-se limitado, e dessa forma há deposição de tecido conjuntivo, formando cicatriz fibrosa³⁸⁻⁴⁰. Esta condição pode comprometer tanto a estética quanto a função do tecido^{38,41}.

2.2 Biomateriais

Define-se como biomaterial (Figura 1) qualquer substância ou combinação de substâncias, natural ou não, que não sejam drogas ou fármacos, utilizados em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos, que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo^{42,43}.

Figura 1 - Tipo de biomateriais. (A) Biomaterial metálico, placas em titânio para reconstrução facial; (B) Biomaterial polimérico, polietileno para implante de queixo e (C) Biomaterial cerâmico, cimento de HA, para preenchimento ósseo.



Fonte: Adaptado de MAIA, et al (2010)¹¹⁵.

A primeira geração de biomateriais data do início do século XX até a década de 1970⁴⁴. Esta foi baseada na procura de materiais denominados inertes. Teoricamente estes biomateriais não estimulariam nenhuma resposta tecidual, nem inflamatória, nem infecciosa no local da implantação⁴³. Vários tipos de materiais foram testados e utilizados, como, por exemplo, as cerâmicas (alumina totalmente densa e zircônia); os metais nobres (platina, liga cromo-cobalto e titânio); os polímeros (silicone, politetrafluoretileno/teflon e polimetilmetacrilato de metila/PMMA), dentre outros⁴³.

A segunda geração de biomateriais surgiu na década de 70, onde o foco era o conceito de biocompatibilidade – comportamento celular após contato do biomaterial com o tecido ao qual foi implantado – e a biodegradabilidade – fenômeno em que o material é degradado ou solubilizado em fluidos tissulares, desaparecendo do sítio de implantação^{45,43}. Deste modo, surgiu novo questionamento referente à forte relação entre a biocompatibilidade-bioinerticidade, dando origem a uma classe de biomateriais: os denominados bioativos⁴³. A bioatividade pode ser definida como sendo a capacidade de um material estimular a ligação interfacial entre tecidos vivos e o material, sem a formação de cápsula fibrosa que separa o biomaterial do tecido⁴³.

A terceira geração inclui os materiais capazes de estimular respostas celulares específicas no nível molecular⁴⁶. Nesta geração os conceitos de bioatividade e

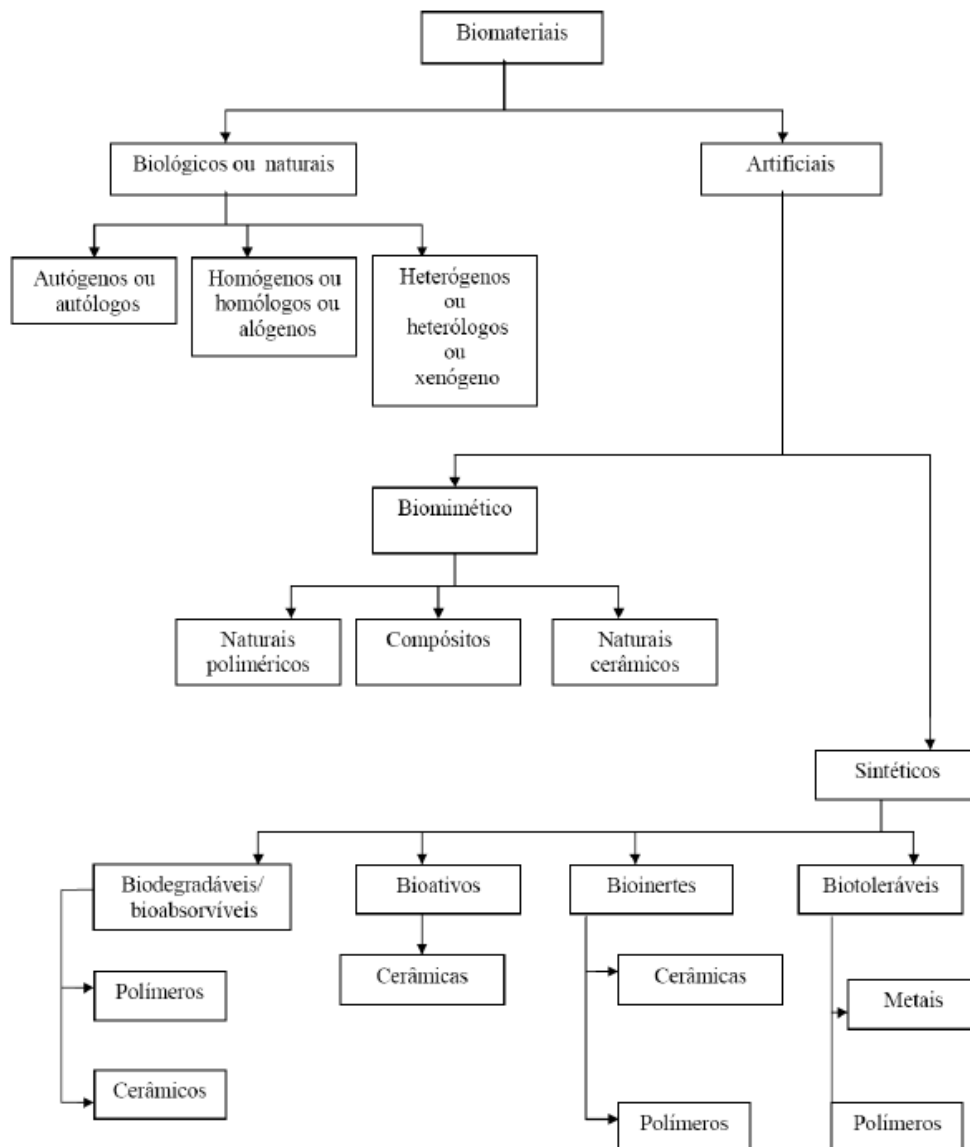
biodegradabilidade se combinam em um determinado material⁴⁴. Recentemente, o conceito de materiais bioinertes foi abandonado, devido às evidências de que todo material provoca algum tipo de resposta no organismo⁴³.

Essas três gerações são interpretadas de forma conceitual e não cronológica, visto que cada uma delas representa uma evolução nas propriedades dos materiais envolvidos, de acordo com as necessidades e exigências que surgiam⁴⁴.

2.2.1 Biomateriais substitutos ósseos

Os pesquisadores da Bioengenharia Tecidual Óssea buscam restabelecer a estrutura e funcionalidade do tecido ósseo perdido⁴⁷. Para isto, enxertos ósseos podem ser utilizados, os quais são classificados de acordo com sua natureza e origem em quatro grandes famílias (Figura 2)^{48,49}: Autógenos – obtidos de áreas doadoras do próprio indivíduo; Homógenos – provenientes de doadores da mesma espécie; Xenógenos – provenientes de doadores de espécie diferente do receptor; e Aloplásticos ou biomateriais – têm origem sintética e podem ser confeccionados em laboratórios a partir de materiais metálicos, cerâmicos e/ou poliméricos, naturais ou sintéticos^{48,49}.

Figura 2 - Classificação dos materiais de acordo com sua origem e interação com o meio fisiológico.



Fonte: OLSSON, et al. (2008)⁵⁰.

Quanto ao comportamento biológico, a classificação dos biomateriais é baseada na resposta do tecido hospedeiro^{43,49,50}.

- Bioinertes - aqueles que não provocam reação de corpo estranho no organismo, encontrando-se em ligação direta ao tecido receptor. Exemplos: cerâmicas e polímeros.
- Biotoleráveis - são moderadamente aceitos pelo tecido receptor, geralmente envolvidos por cápsula fibrosa. Exemplos: metais e polímeros.
- Bioativos - existe a formação de uma ligação direta aos tecidos vivos, pois geralmente tem na sua composição íons de cálcio ou fósforo que

vão estabelecer uma ponte química com o osso envolvente, sem a formação de cápsula fibrosa que separa o biomaterial do tecido. Exemplos: cerâmicas (hidroxiapatita).

- Biodegradáveis/Reabsorvíveis - são lentamente degradáveis desaparecendo do sítio de implantação. Exemplos: cerâmicas (fosfato tricálcico) e alguns polímeros.

Tendo em vista os problemas relacionados com a obtenção de quantidade ideal de enxerto, morbidade do sítio doador, no caso de enxertos autógenos, e com a antigenicidade, em relação aos homogêneos e xenógenos, uma grande variedade de biomateriais vem sendo desenvolvidos nos últimos anos (Figura 2)⁵¹⁻⁵³.

Atualmente, para a utilização como substitutos do tecido ósseo, existem diversos biomateriais que variam não somente em relação à sua origem e composição química (metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos)^{54,49}, mas também quanto à sua ação mecânica e configuração espacial (arcabouços tridimensionais, pós, grânulos, microesferas, hidrogéis, entre outros)⁵⁴.

Os biomateriais cerâmicos têm sido utilizados desde 1892, com o emprego do gesso de Paris (sulfato de Ca), como um cimento para fixação de fraturas e preenchimento de defeitos ósseos⁵⁵. Entre as cerâmicas mais estudadas, aquelas à base de fosfato de Ca (HA, fosfato tricálcio, carbonato de cálcio, vidros bioativos e vitrocerâmicas sintéticas) vêm sendo amplamente utilizadas na recuperação e substituição óssea, uma vez que possuem características de superfície bioativa^{49, 43,51}. Existem várias fases de fosfatos de Ca: bruxita $[\text{CaH}(\text{PO}_4)_2\text{H}_2\text{O}]$, fosfato tricálcico (TCP) $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ e a HA $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, sendo esta muito similar à fase inorgânica do tecido ósseo humano^{49,56}.

Devido à biocompatibilidade, bioatividade e características de osteocondução, os biomateriais cerâmicos como a HA e TCP têm recebido grande atenção como materiais de preenchimento, espaçadores e substitutos para os enxertos ósseos^{43,57-60}. Principal desvantagem do TCP quando comparado a HA é sua rápida reabsorção⁵⁶.

Dentre as cerâmicas utilizadas, a HA sintética demonstra propriedade osteocondutora^{61,62}, similaridade com o componente inorgânico do tecido ósseo e biocompatibilidade. Assim, tem sido indicada em alguns casos de reparo periodontal, levantamento de seio maxilar⁶³ e em preenchimento de alvéolos dentários⁶⁴. Esta

cerâmica pode ser produzida em diferentes formas (pó, partículas, pastilhas, blocos ou microesferas), tamanho, textura, grau de porosidade (macro ou microporoso), grau de cristalinidade (cristalino ou amorfo) e solubilidade (absorvíveis ou não absorvíveis)⁵¹⁻⁵³.

Estas cerâmicas podem ser produzidas por uma série complexa e demorada de reações de síntese utilizando, principalmente, carbonato de cálcio e ácido fosfórico⁶⁵. Ao final dessas reações de síntese, obtêm-se as cerâmicas na forma de um pó, isto é, constituídas por um aglomerado de partículas em simples justaposição, mantidas juntas por ligações muito fracas. Nessas condições, as cerâmicas apresentam quase nenhuma propriedade mecânica, e essa forma é utilizada para a preparação de amostras, chamadas de “verdes”, que posteriormente são submetidas ao processo de sinterização⁶⁵.

As cerâmicas “verdes” podem ser preparadas de diferentes maneiras, em geral, exercendo-se uma carga sobre uma quantidade de pó a fim de se obter uma amostra compactada. As técnicas mais comumente utilizadas para isso são: pressão uniaxial, vazamento em moldes (onde não se utiliza carga), pressão uniaxial em altas temperaturas e pressão isostática em altas temperaturas. Nessas duas últimas, a preparação de amostras e sinterização são efetuadas ao mesmo tempo⁶⁵.

A sinterização é o tratamento térmico que é dado às amostras de cerâmica “verde”. Nesse processo ocorre a progressiva transição daquele estado de aglomeração, partículas em simples justaposição, para uma unidade na qual as partículas fundem-se umas com as outras. Durante esse processo, ocorrem várias modificações nas cerâmicas, tais como: diminuição da área de superfície, diminuição do volume da amostra, aumento da fase cristalina e aumento das propriedades mecânicas. A diminuição do volume da amostra se dá como consequência da densificação da cerâmica durante a sinterização, a qual, por sua vez, determina o nível de porosidade⁶⁵.

As cerâmicas devem possibilitar a adesão, proliferação e diferenciação das células que em sua direção migrarem; ser porosas para possibilitar a formação e crescimento vascular de permeio aos seus poros ou no interstício observado entre suas esferas ou partículas; ter biodegradação controlada para permanecer no local implantado por um período necessário e assim estimular reações químicas e biológicas favoráveis à sua função; e desencadear reação tecidual mínima^{28, 66-68}. O tamanho dos poros da cerâmica é inversamente proporcional ao aumento de

temperatura de sinterização. Assim, quanto mais elevada a temperatura, menor número de poros^{43,60-70}. Entretanto, sua capacidade de resistência à compressão até uma temperatura de 1.525 °C possui relação direta com essa temperatura⁶⁹.

As principais limitações do uso de fosfatos de cálcio em biomateriais são as suas propriedades mecânicas, uma vez que são frágeis e apresentarem baixa resistência à fadiga^{71,72}. As cerâmicas porosas apresentam esta característica mais acentuada. Entretanto, acredita-se que uma porosidade superior a 100 µm de diâmetro favorece vascularização adequada, colonização de células ósseas e difusão de nutrientes⁷¹.

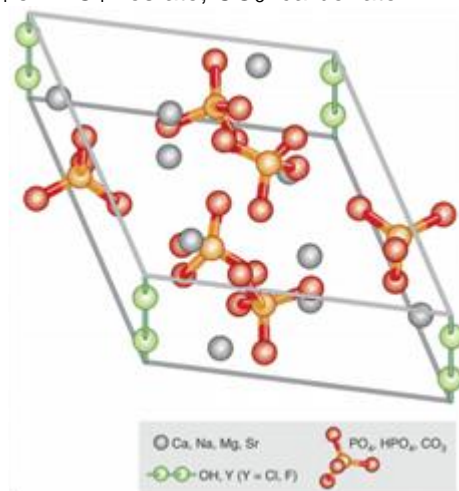
2.2.2 Hidroxiapatita

A HA $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ é um fosfato de cálcio hidratado e o principal constituinte inorgânico do osso, cerca de 95%⁴³. O termo “*hidrox*” corresponde ao grupo hidroxila e “*apatita*” é um nome do mineral. A HA biológica é composta por íons em concentrações diversas, tais como cálcio, magnésio, sódio, flúor e outros⁴³.

Quanto à distribuição do magnésio no corpo humano, cerca de 99% do total encontra-se nos ossos, músculos e tecidos moles. No caso de alterações agudas na concentração plasmática de magnésio, ocorrerá a permutação deste íon a partir do tecido ósseo. Em geral, um terço de magnésio esquelético é permutável, servindo como um reservatório para manter níveis fisiológicos de magnésio extracelular. Os níveis de concentração de magnésio intracelular variam de 5 a 20 mmol/L; sendo 1-5% ionizado, o restante encontra-se ligado às proteínas, moléculas carregadas negativamente e trifosfato de adenosina (ATP). A concentração de magnésio extracelular corresponde a 1% de total de magnésio no corpo, que se encontra principalmente no soro e células vermelhas do sangue³³.

O magnésio é depositado na superfície da HA como parte integrante dos cristais (Figura 3) e sua liberação segue à reabsorção óssea³³. Em menor quantidade também é depositado na camada ao redor do cristal, tornando-se um reservatório de Mg permutável, útil para manter as concentrações extracelulares fisiológicas durante alterações agudas deste micronutriente no sangue³³.

Figura 3 - Unidade do cristal de HA. Ca: cálcio; Na: sódio; Mg: magnésio; Sr: estrôncio; OH: hidróxido; Cl: cloreto; F: flúor; PO₄ e HPO₄: fosfato; CO₃: carbonato.



Fonte: JAHNEN-DECHENT; KETTELER (2012)³³.

Devido às suas características físico-químicas e microestrutural similares àquelas da matriz inorgânica do tecido ósseo, a HA tem destaque tanto nas pesquisas científicas quanto nas aplicações clínicas³⁰. De um modo geral, HA sintéticas são biocompatíveis; osteocondutoras, já que favorecem o crescimento ósseo em direção a suas partículas; e bioativas, por estabelecer união direta com o tecido ósseo do sítio de implantação, possibilitando assim a migração e proliferação de fibroblastos e osteoblastos em associação à sua estrutura^{6,43,60,73,74}.

A partir de reações em sistemas aquosos, por precipitação ou hidrólise, reações hidrotermais ou reações em estado sólido, pode-se obter a HA. Quando preparada pelos métodos de precipitação ou hidrólise, a apatita obtida é geralmente deficiente em Ca (razão molar Ca/P é menor que o valor estequiométrico 1,67 para HA) e baixa cristalinidade⁴³. Caso a reação de precipitação seja realizada em pH muito básico, o precipitado conterá carbonato, que fará razão molar Ca/P maior que valor estequiométrico⁴³.

A HA pode ser sintetizada com relativa facilidade em laboratório, com diferenças nas características físico-químicas, formas de apresentação e formatos^{9,73}. Quando produzidas no formato de microesferas, estas cerâmicas tornam-se promissoras para a regeneração óssea, visto que possibilitam a secreção e difusão de fatores de crescimento e nutrientes; migração e proliferação de células fusiformes e osteoprogenitoras; síntese de MEC; neovascularização e reparo tecidual de permeio às microesferas⁷⁷⁻⁷⁹.

A implantação destas biocerâmicas pode ser feita por meio de técnicas cirúrgicas minimamente invasivas, dando celeridade à recuperação do paciente com menor tempo de internamento e, conseqüentemente, menor risco de infecções secundárias⁸⁰. Todavia, vale ressaltar que, devido a sua baixa resistência mecânica, a utilização destas cerâmicas pode ser limitada em alguns casos, especialmente quando o defeito ósseo a ser reparado está em regiões anatômicas que estão sob constante tensão^{49,78,81,82}.

Pesquisadores têm considerado a habilidade de efetuar substituições isomórficas na HA, sem perder seu arranjo estrutural hexagonal⁷⁻⁹ e têm permutado íons de cálcio por zinco, estrôncio, flúor, Mg^{7,9} entre outros, com objetivo de melhorar suas propriedades físico-químicas e osteogênicas.

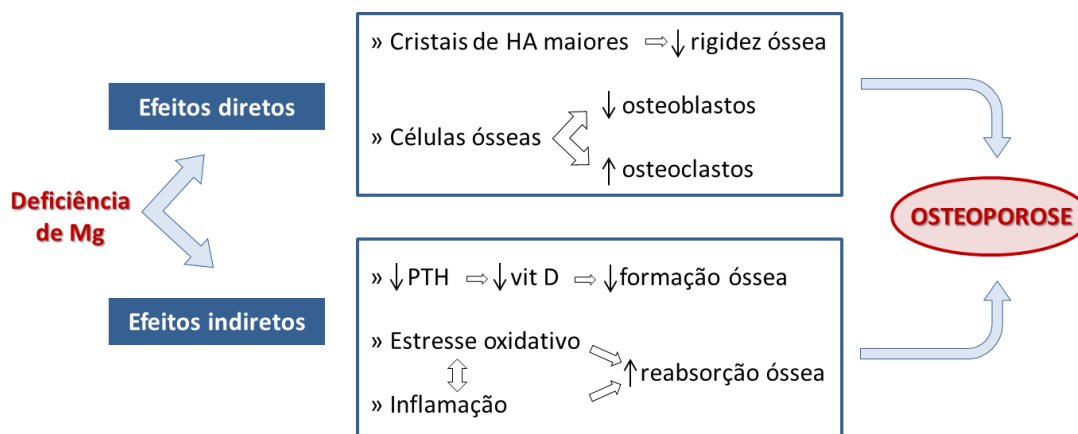
2.2.3 Magnésio

O Mg é um micronutriente essencial ao metabolismo corporal e com grande relevância para as funções celulares¹¹. Em seres humanos, é o quarto cátion mais abundante e o segundo no meio intracelular^{11,83}. Do total de Mg corpóreo, cerca de 53% é encontrado no tecido ósseo, 27% nos compartimentos intracelulares do músculo e 19% nos tecidos moles. O 1% restante é encontrado no soro e nos eritrócitos^{11,83}.

O íon Mg é necessário para a síntese de ATP^{11,12,84}, de ácidos nucléicos e de proteínas; participa de reações mitocondriais^{11,12,85} e atua como cofator em mais de 300 reações enzimáticas, influenciando indiretamente o metabolismo mineral^{11,83,84}. Além disso, este íon está intimamente associado ao mecanismo de mineralização, uma vez que interfere na cinética da nucleação de apatita biológica durante a osteogênese, e pode reduzir sua cristalinidade^{10,12}. Portanto, não é surpreendente que as alterações na homeostase do Mg impacte sobre as funções de células e tecidos¹¹.

O Mg é muito abundante durante as fases iniciais da osteogênese, quando estimula a proliferação dos osteoblastos, devido a sua influencia sobre a mitose destas células¹³. E a sua depleção causa fragilidade e perda óssea, e, conseqüentemente, risco de osteoporose (Figura 4)¹¹⁻¹³.

Figura 4 - Mecanismos envolvidos na relação entre deficiência de Mg e o aparecimento da osteoporose. PTH: paratormônio; vit D: vitamina D.



Fonte: Adaptado de CASTIGLIONI, et al. (2013)¹¹.

Na resposta imunoinflamatória, o estudo de⁸⁶ demonstrou que, na deficiência de Mg, há um aumento no número de leucócitos polimorfonucleares circulantes, havendo um aumento na atividade fagocítica e uma maior produção de espécies reativas de oxigênio responsáveis pela maior destruição tecidual. Nesse mesmo estudo foi observado ainda que a maior concentração extracelular deste íon inibe a formação de radicais livres.

A incorporação de metais em biomateriais para substituição óssea é uma abordagem atrativa para modificar as propriedades mecânicas e biológicas destes materiais⁸⁷. Dada a relevância biológica do magnésio, muitas equipes de pesquisa têm trabalhado na síntese de HA e fosfatos de cálcio contendo baixos níveis de Mg, para melhorar a sua bioatividade¹³. Deste modo, a incorporação de Mg na estrutura da HA é de grande interesse a fim de tentar elucidar o papel do Mg no tecido ósseo. De acordo com a literatura, a substituição de cálcio pelo magnésio em HA é limitado. Isto está relacionado com a grande diferença de tamanho entre íons de magnésio e íons de cálcio, o que leva a fortes deformações da estrutura HA e reduz a sua cristalinidade¹³.

A adição de Mg à estrutura hexagonal da HA, por meio da substituição parcial dos íons de Ca por Mg, favorece a diminuição da cristalinidade da HA e, conseqüentemente, aumenta a dissolução desta cerâmica¹⁰. A substituição do Ca pelo Mg tem despertado grande interesse científico e clínico, uma vez que as cerâmicas dopadas mostraram-se, *in vitro*, biocompatíveis e não apresentaram toxicidade^{26,89}, tornando esses novos biomateriais promissores para a regeneração óssea⁹⁰.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar, *in vivo*, a resposta tecidual após a implantação de microesferas de HA dopadas ou não com Mg, em defeito ósseo não crítico, na calvária de rato.

3.2 Objetivos Específicos

Descrever, por meio da análise histomorfométrica, o comportamento biológico das microesferas de HA dopada, ou não, com Mg, após 15 e 45 dias de pós-operatório.

Caracterizar o reparo ósseo por microscopia óptica após a implantação das microesferas supracitadas, nos mesmos períodos de análises.

Identificar se o Mg incrementou a capacidade osteogênica da HA.

4 METODOLOGIA

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) (Protocolo nº02/2013 CEUA-EBMSP) (Anexo A) e foi desenvolvida de acordo com as Normas de Ética em Pesquisa com Animais, bem como os Princípios de Biossegurança. Os animais foram cedidos e mantidos no Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS-BA), onde os procedimentos cirúrgicos foram desenvolvidos.

4.1 Biomateriais

Os biomateriais utilizados neste estudo foram desenvolvidos, preparados e fornecidos por pesquisadores do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), sob supervisão do pesquisador Alexandre Malta Rossi.

4.1.1 Processamento das microesferas

4.1.1.1 Preparação dos pós de HA

Para a síntese da HA, utilizaram-se soluções de nitrato de Ca e nitrato de Mg (teores molares de 1%), e fosfato dibásico de amônio. Primeiramente, preparou-se uma solução de nitrato de Ca [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] e nitrato de Mg ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) com concentração total de cátions de 0,2M ou 0,20 moles/1000mL. Com auxílio de uma bomba peristáltica com fluxo de 4,5 mL/min, gotejou-se esta mistura sobre uma solução de fosfato dibásico de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ com concentração 0,20M ou 0,12 moles/600mL, mantendo-se o pH 9,0 com hidróxido de amônio concentrado (NH_4OH), temperatura de 90°C e agitação mecânica de 240rpm. Esta mistura permaneceu em digestão por três horas nas mesmas condições, sendo então filtrada em funil de *Buckner* e ressuspensa em água MilliQ a 90°C, por três vezes, até obter pH 7,0 na água de lavagem. O sólido obtido foi seco por liofilização por 24 horas. Finalmente, o material obtido foi macerado e peneirado em peneira menor que 74µm.

4.1.1.2 Preparação das microesferas

Os pós de HA substituída com 1% molar de magnésio (HAMg), menores que 74 μm , foram misturados a uma solução de alginato de sódio 1% v/v até a formação de pasta cerâmica. Por extrusão, com o auxílio de uma seringa com agulha (0,55 x 20mm), a pasta cerâmica foi, então, gotejada em uma solução de cloreto de Ca (CaCl_2) 0,15M, onde imediatamente foram formadas as microesferas. Estas ficaram em solução de cloreto de Ca durante 24h e, após este período, foram lavadas com água MilliQ e secas por liofilização. As microesferas obtidas foram peneiradas utilizando-se peneiras com abertura na faixa de 425 a 600 μm de diâmetro.

Após esta etapa as microesferas foram sinterizadas em forno mufla durante 27h, sob rampa crescente de aquecimento (17h até atingir 550°C; 550°C por 2h; 6h até atingir 1100°C e 1100°C por 2h). A temperatura de 1100°C corresponde ao processo de sinterização.

4.2 Etapa experimental

4.2.1 Amostra

Foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus*) albinos, da linhagem *Wistar*, com peso corporal entre 350g e 400g e idade aproximada de 3 a 4 meses, fornecidos pelo Biotério Central da UEFS.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para a composição de três grupos experimentais, com quatro animais em cada, avaliados nos pontos biológicos de 15 e 45 dias de pós-operatório: **Grupo HAMg (GHAMg)** – defeito ósseo não crítico preenchido com microesferas de HA dopadas com Mg; **Grupo HA (GHA)** – defeito ósseo não crítico preenchido com microesferas de HA preparadas pela mesma rota, porém sem Mg; **Grupo Controle (GC)** – defeito ósseo não crítico sem biomaterial de preenchimento (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de animais de acordo com o grupo experimental e ponto biológico.

Grupo experimental	Ponto Biológico		
	15 dias	45 dias	Total
GHAMg	4	4	8
GHA	4	4	8
GC	4	4	8
TOTAL	12	12	24

Durante todo o experimento os animais receberam ração sólida (Nuvital®) e água *ad libitum*; foram mantidos em caixas plásticas forradas com maravalha de pinus, autoclavada e trocada diariamente, conforme grupo e ponto biológico. Na etiqueta de identificação ainda constava a massa corporal do animal, data da cirurgia e do sacrifício, e nome do pesquisador.

4.2.2 Técnica Cirúrgica

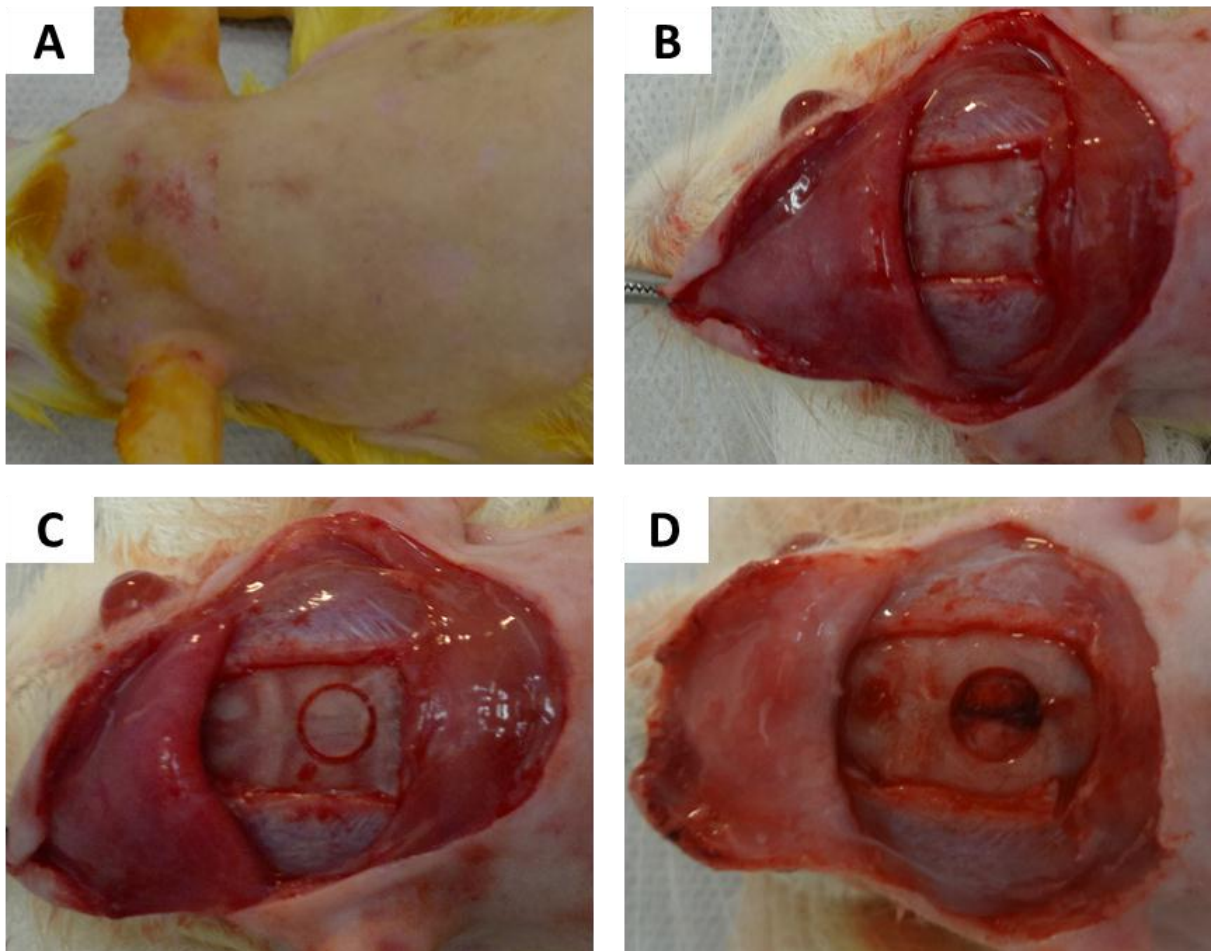
Esta etapa somente foi iniciada após aprovação do projeto de pesquisa pelo CEUA-EBMSP. Estes procedimentos cirúrgicos foram realizados no Biotério Central da UEFS, onde os animais foram mantidos durante todo o período experimental.

Previamente à realização do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à analgesia e sedação com injeção intramuscular de cloridrato de quetamina 2% na proporção de 0,1 mL/100g de massa corporal e cloridrato de xilazina a 2% na proporção de 0,04 mL/100g de massa corporal. Em seguida, os animais foram tricotomizados na região da calvária, posicionados em decúbito ventral e submetidos à antissepsia com álcool iodado do campo operatório (Figura 5A).

A técnica cirúrgica empregada na confecção do defeito foi a mesma descrita na literatura³⁹, contudo, vale ressaltar que o defeito confeccionado no nosso estudo foi de 5 mm. Nesta técnica, o acesso cirúrgico à porção mediana da calvária foi obtido com uma incisão cutânea semilunar com aproximadamente 3cm de extensão, mediante a utilização de lâmina de bisturi nº15, seguida da exposição do periósteo e sua remoção, para exposição do tecido ósseo (Figura 5B).

Posteriormente, o defeito ósseo circular não crítico transfixado com, aproximadamente, 5,0 mm de diâmetro foi confeccionado^{75,76,91} na porção mediana da calvária a partir do vértice da sutura craniana posterior (Figura 5C e 5D). Para isto, foi utilizada uma fresa trefina (Dentoflex[®]) com 5mm de diâmetro, montada em contra ângulo (Driller[®]) com redução de 16:1, acoplado em motor para implante (Driller[®]), a 1500rpm, sob irrigação constante com solução fisiológica. Por fim, os biomateriais utilizados foram implantados no defeito ósseo, exceto para o grupo controle, no qual não houve implantação de biomaterial. Em seguida, o retalho foi reposicionado e suturado com pontos interrompidos com fio de seda 4.0 (Ethicon[®], Johnson & Johnson).

Figura 5 - Sequência cirúrgica para a confecção do defeito ósseo. (A) Tricotomia da região da calvária. (B) Exposição do tecido ósseo. (C) Demarcação do defeito ósseo na porção mediana da calvária. (D) Defeito ósseo não crítico confeccionado.



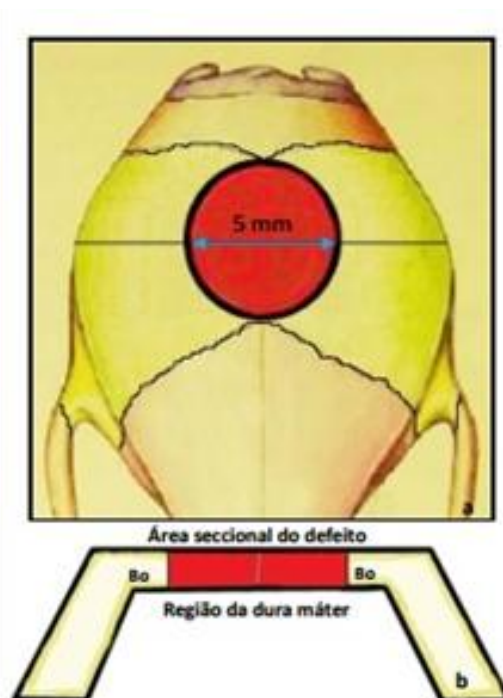
4.3 Etapa laboratorial

4.3.1 Processamento histológico

Após 15 e 45 dias de pós-operatório, os animais foram submetidos a eutanásia, mediante aprofundamento anestésico com dose letal de cloridrato de ketamina. Posteriormente, removeu-se a porção superior da calvária, e os tecidos moles foram descartados e o espécime fixado em formaldeído a 4% durante sete dias.

Após este período as calvárias foram reduzidas com disco de *carborundum* (nº. 409) acoplado a um mandril e a um motor elétrico rotativo (Dremel®). Durante esta etapa o defeito foi cortado ao meio (Figura 6), os espécimes descalcificados em ácido nítrico (5%) por duas horas e incluídos em parafina. Os cortes obtidos, com 5µm de espessura, foram corados em hematoxilina-eosina (HE) e picrossírius red (PIFG) e, posteriormente, examinados por microscopia de luz comum (Leica® DM1000) para análise histomorfométrica. O processamento histológico foi realizado no Instituto de Patologia Geral e Cutânea – IPAC.

Figura 6 - Desenho esquemático do defeito não crítico em calvária de rato. (a) Linha de referência para o corte transversal dos espécimes; (b) área seccional do defeito após corte transversal.



Fonte: Adaptado de Rolim (2010)⁹².

4.4 Análise morfométrica

Na avaliação morfométrica, mensurou-se os seguintes parâmetros: extensão linear do defeito (EL), área de matriz mineralizada do defeito (AMM), nos 03 grupos da pesquisa, com pontos biológicos de 15 e 45 dias, calculando-se a média, o desvio padrão e o valor de p (ANOVA). Para tanto, utilizou-se o Sistema de Análise de Processamento de Imagens QWin 3.1 (Leica®), a partir da análise de imagens obtidas pela câmera digital (Leica® DFC 310 FX) acopladas ao microscópio de luz comum (Leica® DM1000). Esta etapa foi realizada no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

5 RESULTADOS

5.1 Análise histomorfológica

GHAMg

Aos 15 dias, observou-se que o biomaterial preencheu toda a extensão e espessura do defeito (Figura 7). As microesferas caracterizaram-se por um aspecto mais denso. Notou-se que a neoformação óssea foi observada além das bordas ósseas do defeito, em direção centrípeta do defeito (Figuras 8 e 9). Distante das bordas, esta neoformação foi observada de permeio às microesferas, por vezes, circundando-as (Figura 10). Limitando esta neoformação de matriz osteóide, observam-se osteoblastos e osteócitos englobados pela mesma. Nos locais onde não houve formação de matriz osteóide, notou-se a presença de tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos, no qual foi possível evidenciar um infiltrado inflamatório mononuclear e células gigantes multinucleadas, caracterizando inflamação crônica granulomatosa moderada, principalmente próximo às microesferas (Figuras 11 e 12).

Figura 7– GHAMg 15d. Preenchimento do defeito ósseo com as microesferas (M) de HAMg em única camada. Na região próxima às bordas ósseas (Bo) notam-se áreas de mineralização (*) associadas às microesferas (M). Na região central do defeito observa-se um tecido conjuntivo (Tc) com aspecto denso. Veia central (Vc). HE. Barra 300 µm.

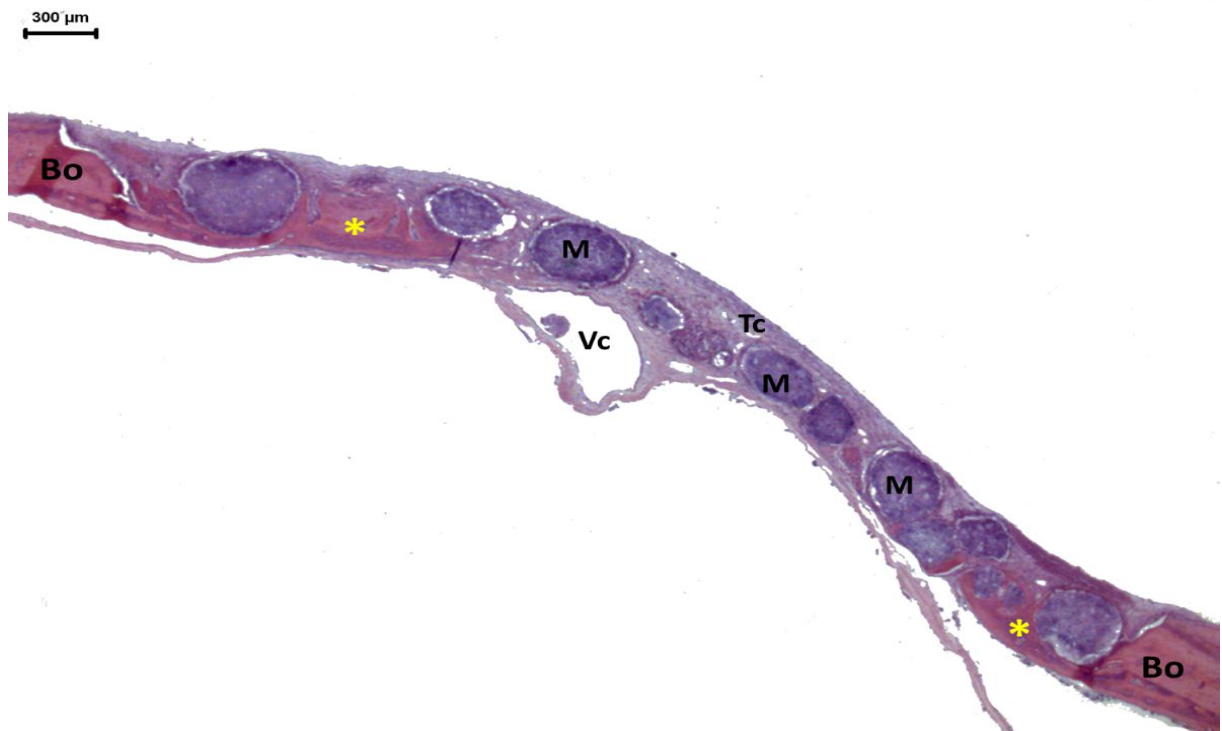


Figura 8– GHAMg 15d. Neoformação óssea (*) associada à borda óssea (Bo) e ao biomaterial, de permeio às microsferas (M). Tecido conjuntivo (Tc) circundando as microsferas ao longo do defeito. Veia central (Vc). PIFG. Barra 300 µm.

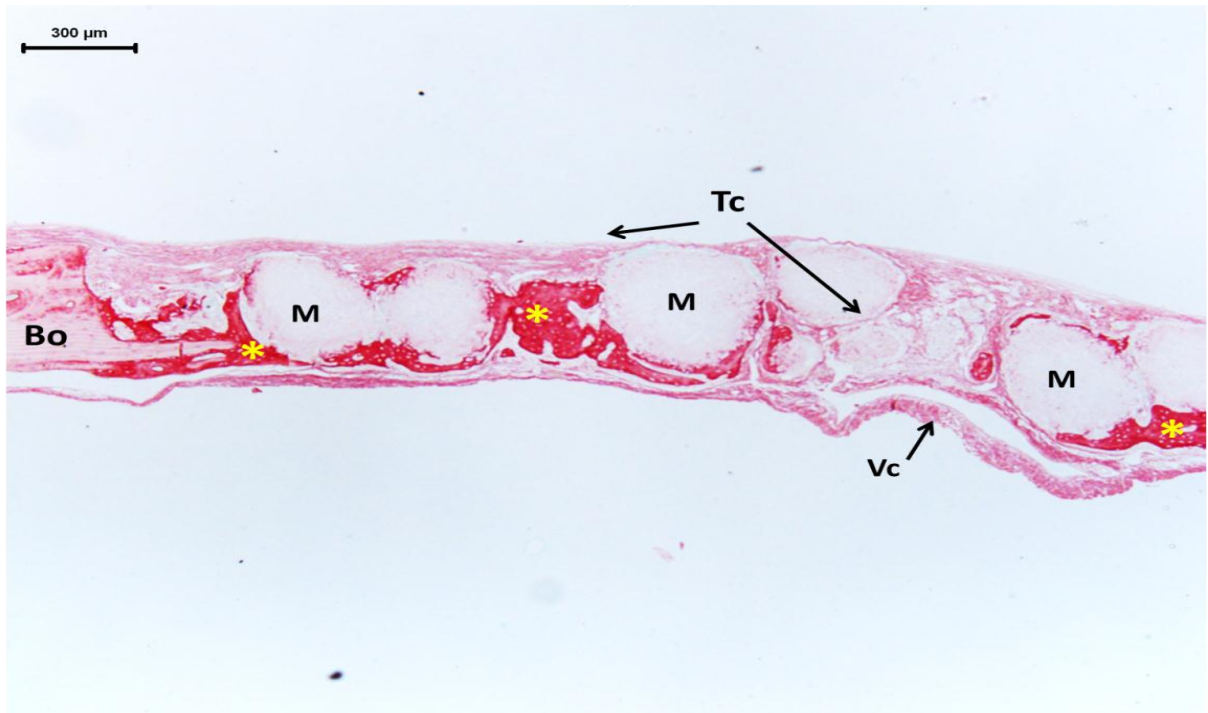


Figura 9 – GHAMg 15d. Deposição de matriz osteóide (*) associada à borda óssea (Bo) e às microsferas (M) de HAMg. Microesferas preenchendo o defeito e circundadas por tecido conjuntivo (Tc). PIFG. Barra 200 µm.

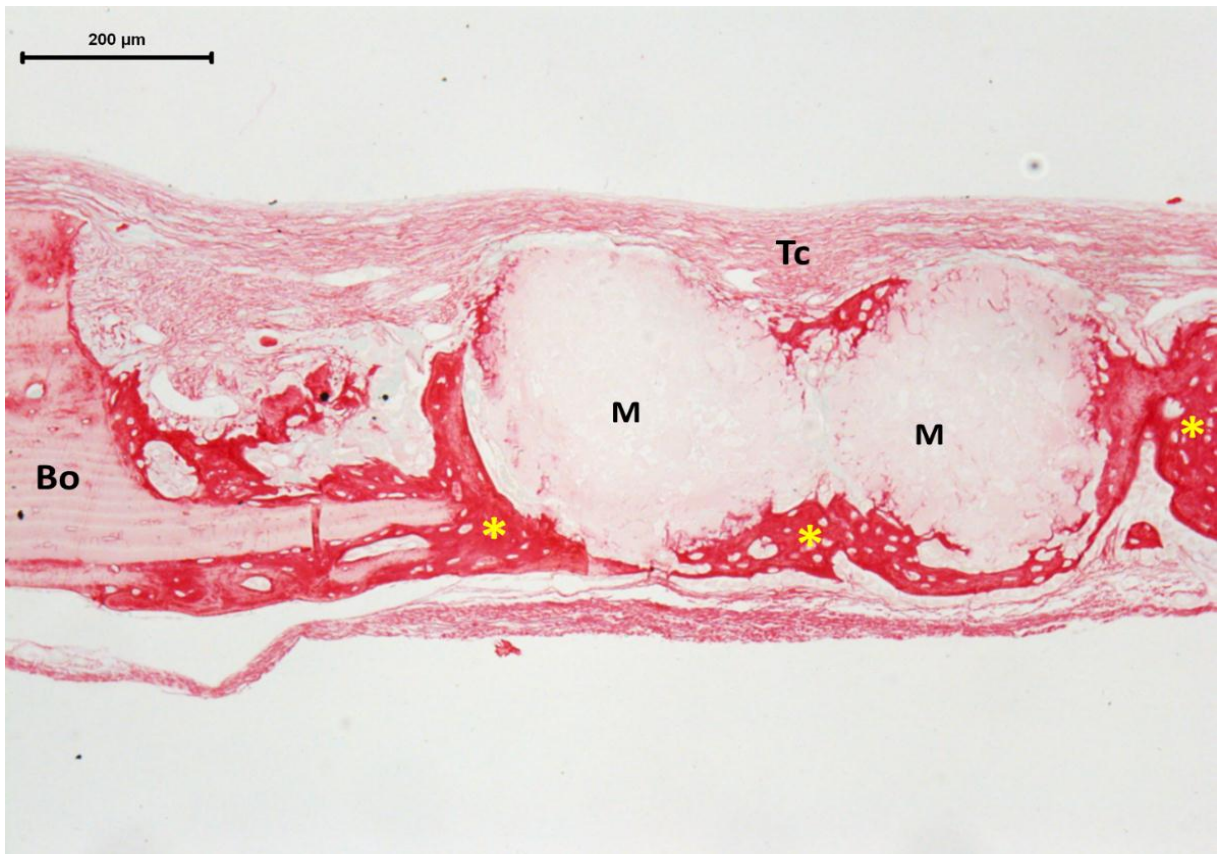


Figura 10– GHAMg 15d. Mineralização (*) ao redor e de permeio às microesferas (M) deHAMg. Na região superior, onde não houve mineralização, nota-se a presença de tecido conjuntivo (Tc) com aspecto denso. HE. Barra 200 µm.

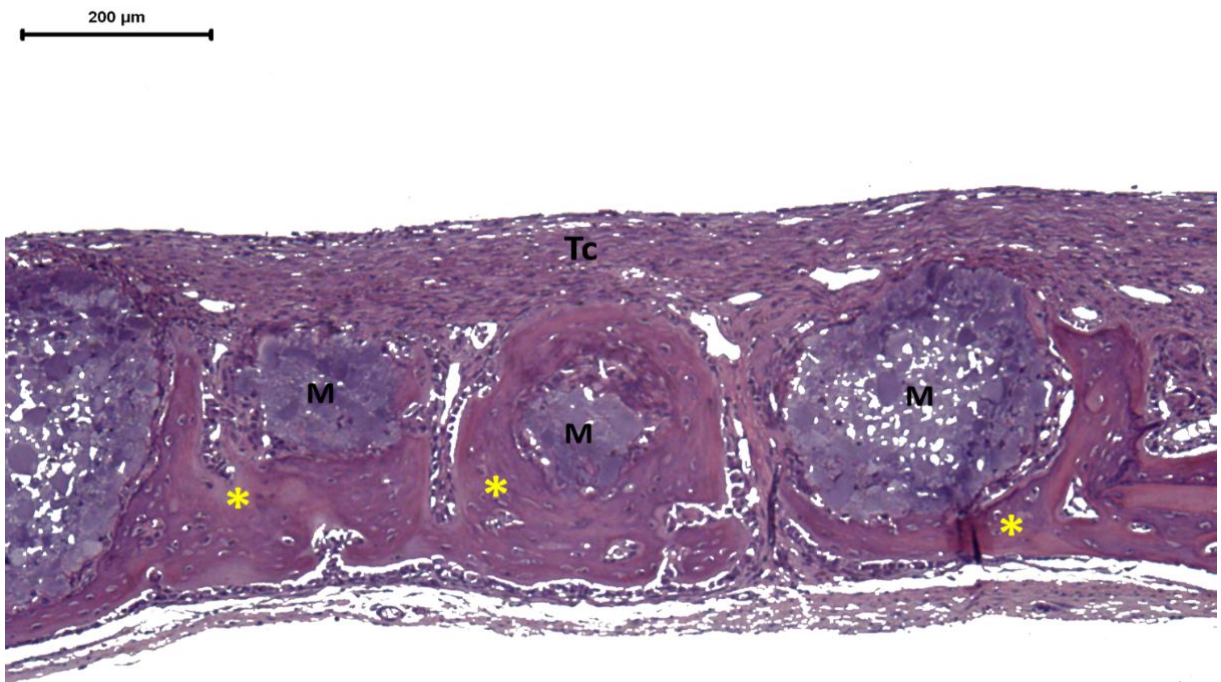


Figura 11 – GHAMg 15d. Presença de tecido conjuntivo fibroso circundado as microesferas (M) de HAMg. Reação inflamatória crônica (Ri) granulomatosa moderada com células gigantes multinucleadas (→) associadas ao biomaterial. HE. Barra 100 µm.

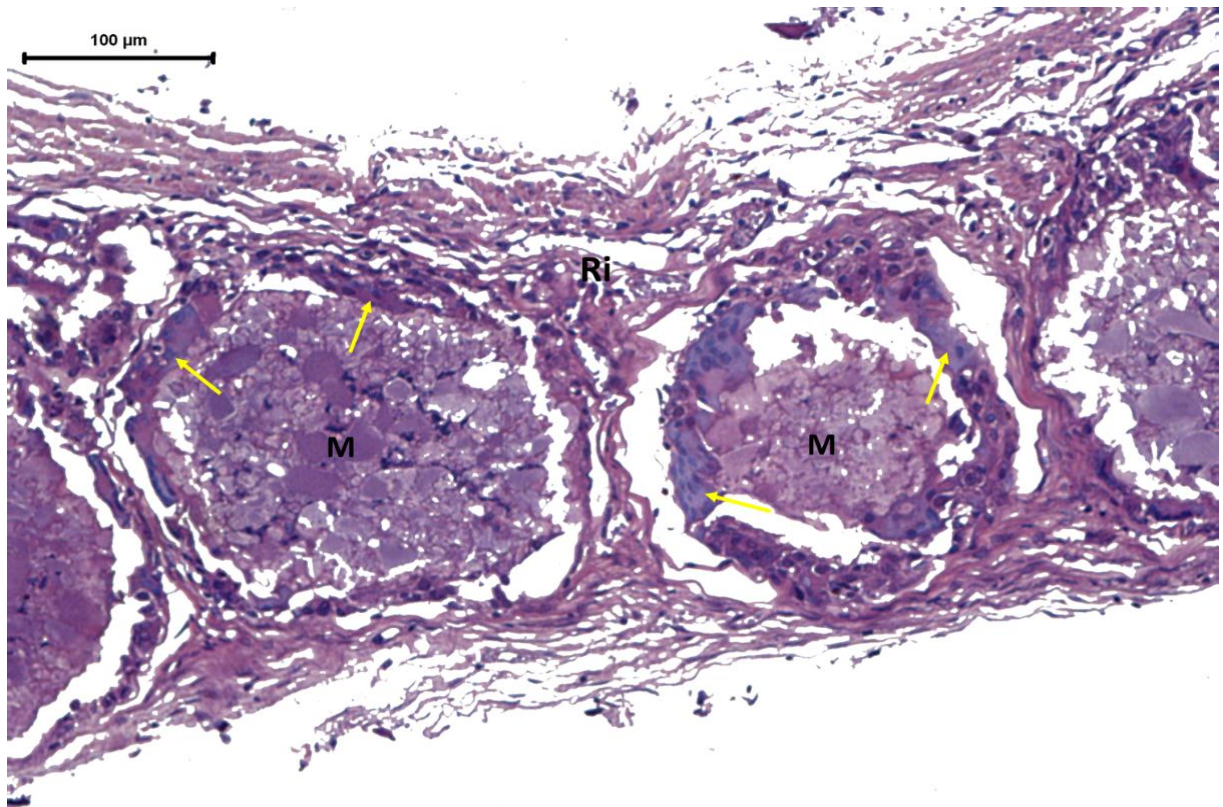
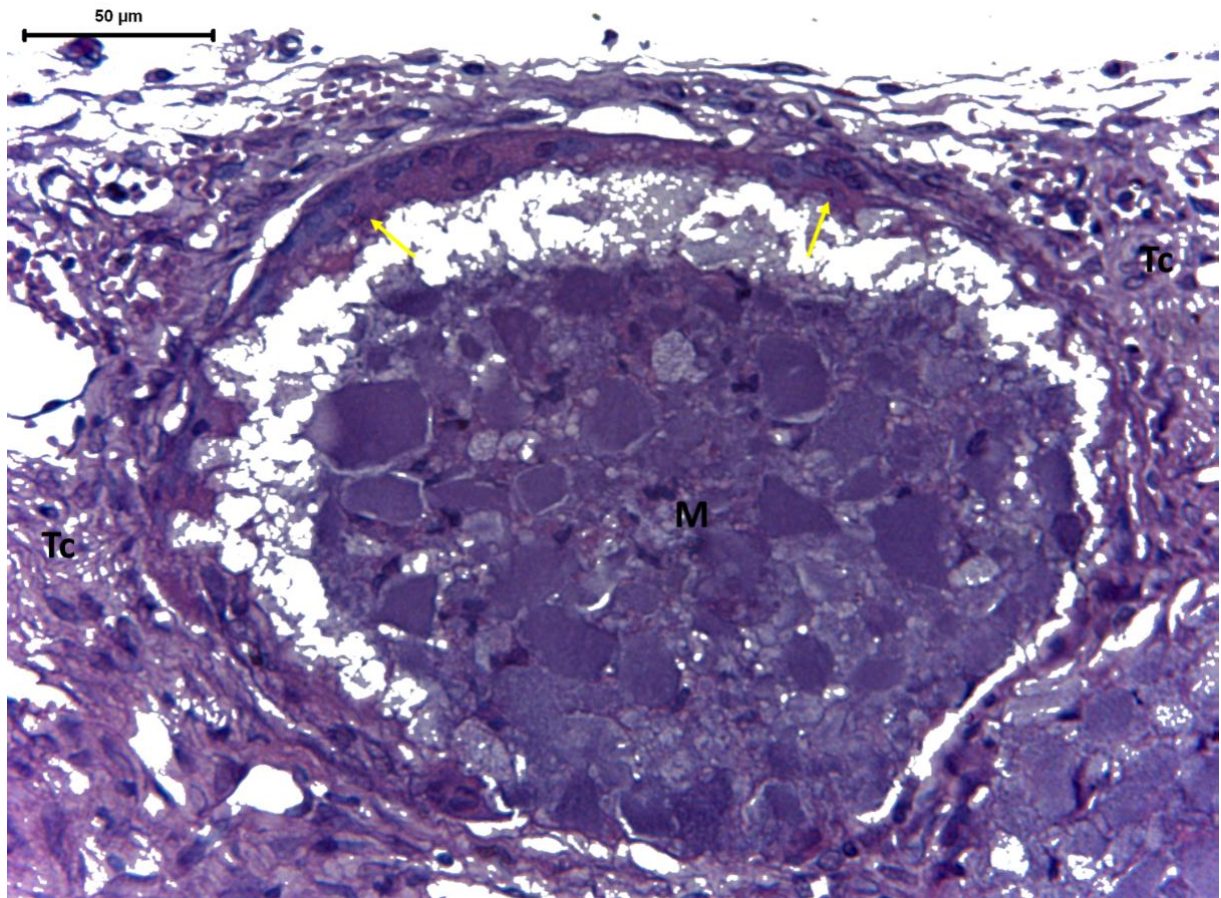


Figura 12 – GHAMg 15d. Estroma com tecido conjuntivo fibroso (Tc) e presença de células gigantes multinucleadas (→) circundando a microesfera (M) de HAMg. HE. Barra 50 µm.



No ponto biológico de 45 dias, a neoformação óssea estendeu-se de maneira centrípeta e confluyente, de ambas as bordas, em direção à área central, com quase união completa no centro do defeito (Figuras 13 e 14). Esta, na maioria das vezes, preencheu 2/3 da extensão do defeito ósseo em permeio às microesferas. Pode-se observar que as microesferas que estavam próximas às bordas foram circundadas por este tecido mineralizado neoformado, com presença de osteócitos (Figura 15). Nas áreas onde não houve formação de tecido mineralizado, identificou-se um tecido conjuntivo mais denso em relação ao período anterior. Neste, foi possível observar células fusiformes e capilares sanguíneos (Figura 16).

Figura 13 – GHAMg 45d. Presença de matriz osteóide (*) associada às bordas ósseas (Bo) e ao longo do defeito em associação às microesferas (M) que ocuparam toda a extensão do defeito ósseo. Presença de tecido conjuntivo (Tc) na região central. HE. Barra 300 µm.



Figura 14 – GHAMg 45d. Mineralização (*) próxima às bordas ósseas e circunjacente às microesferas (M) de HAMg. Tecido conjuntivo fibroso (Tc) na região central do defeito circundando o biomaterial. HE. Barra 300 µm.



Figura 15 – GHAMg 45d. Tecido mineralizado em organização (*) circunjacente à microesfera (M) de HAMg. Nota-se a presença de osteócitos (→) e tecido conjuntivo (Tc). HE. Barra 50 µm.

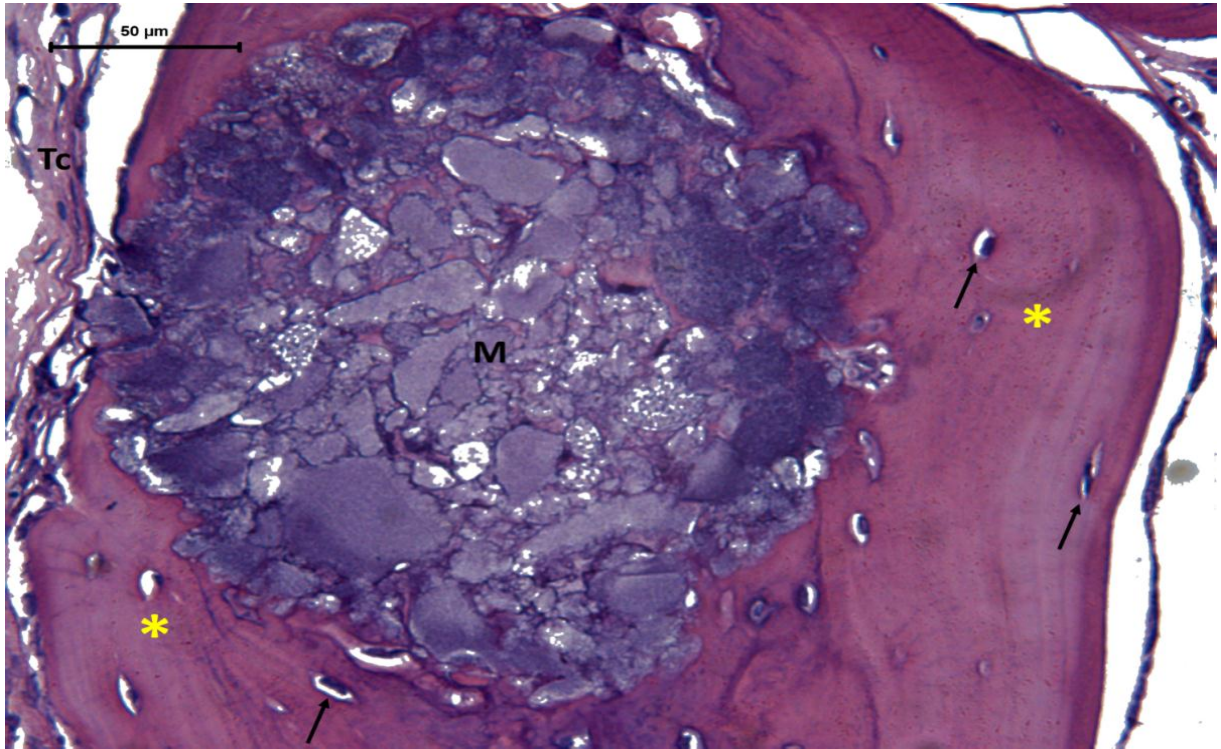
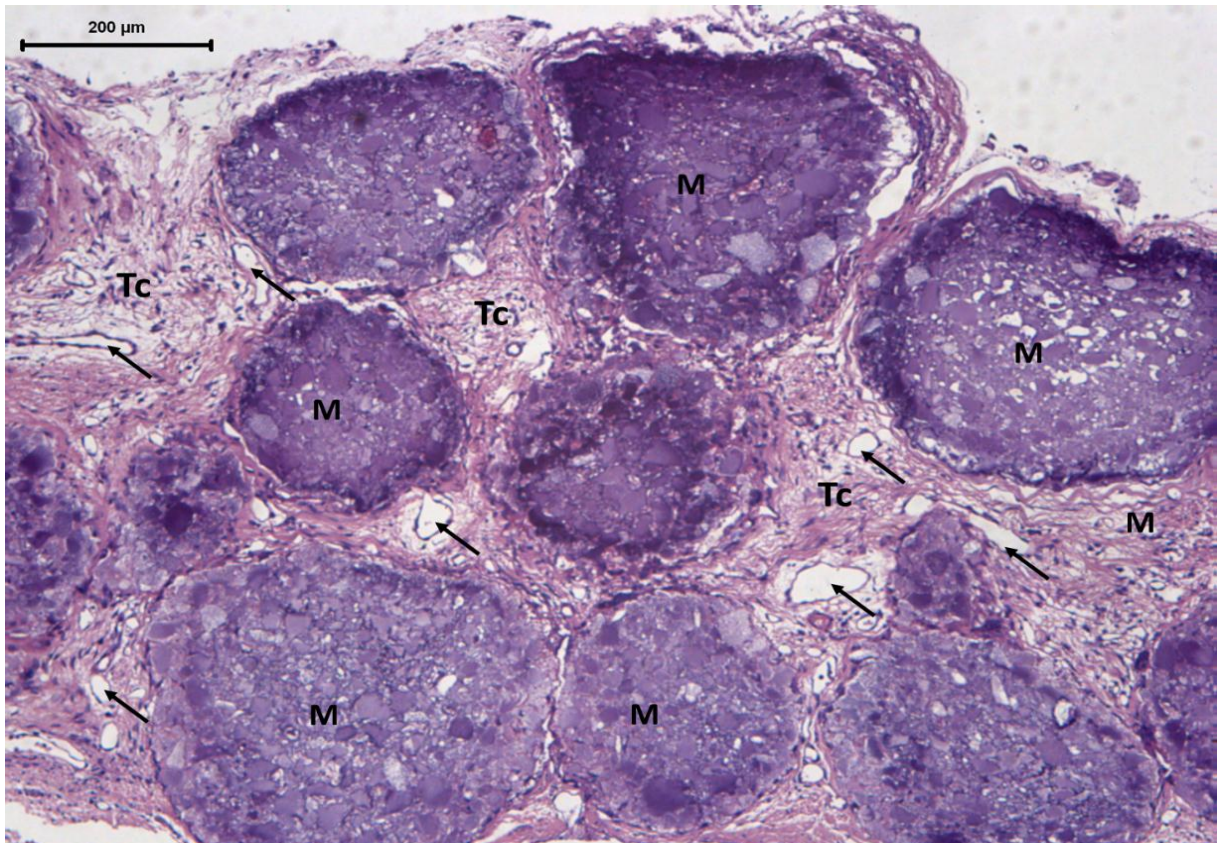


Figura 16 – GHAMg 45d. Presença de tecido conjuntivo (Tc), rico em vasos sanguíneos (→) de permeio às microesferas (M) de HAMg. Preenchimento do defeito com múltiplas camadas de biomaterial. HE. Barra 200 µm.



GHA

Aos 15 dias, observou-se a presença de matriz osteóide associada às bordas ósseas, bem como circundando as microesferas que ocupavam toda a extensão e espessura do defeito, organizadas em uma única camada de material (Figuras 17, 18 e 19). Observou-se a presença de osteócitos e osteoblastos associados a esta neoformação. Pode-se observar que houve deslocamento de algumas microesferas. Notou-se que as microesferas se apresentavam num aspecto não uniforme, pois ora havia a presença de tecido conjuntivo em seu interior, ora não (Figura 20). Na região central do defeito, houve formação de tecido conjuntivo frouxo, contendo infiltrado inflamatório mononuclear e células gigantes multinucleadas, o que caracteriza uma inflamação crônica granulomatosa discreta, mais notória ao redor das microesferas mais densas. Notou-se também neovascularização em toda a extensão do defeito (Figura 21).

Figura 17 – GHA 15d. Microesferas (M) de HA preenchendo toda a extensão do defeito. Mineralização (*) próxima às bordas ósseas (Bo) e ao longo do defeito em associação com as microesferas (M). Presença de tecido conjuntivo (Tc) na região central. HE. Barra 300 µm.



Figura 18– GHA 15d. Mineralização (*) nas proximidades da borda óssea (Bo) e circunjacente às microesferas (M) de HA. HE. Barra 200 µm.

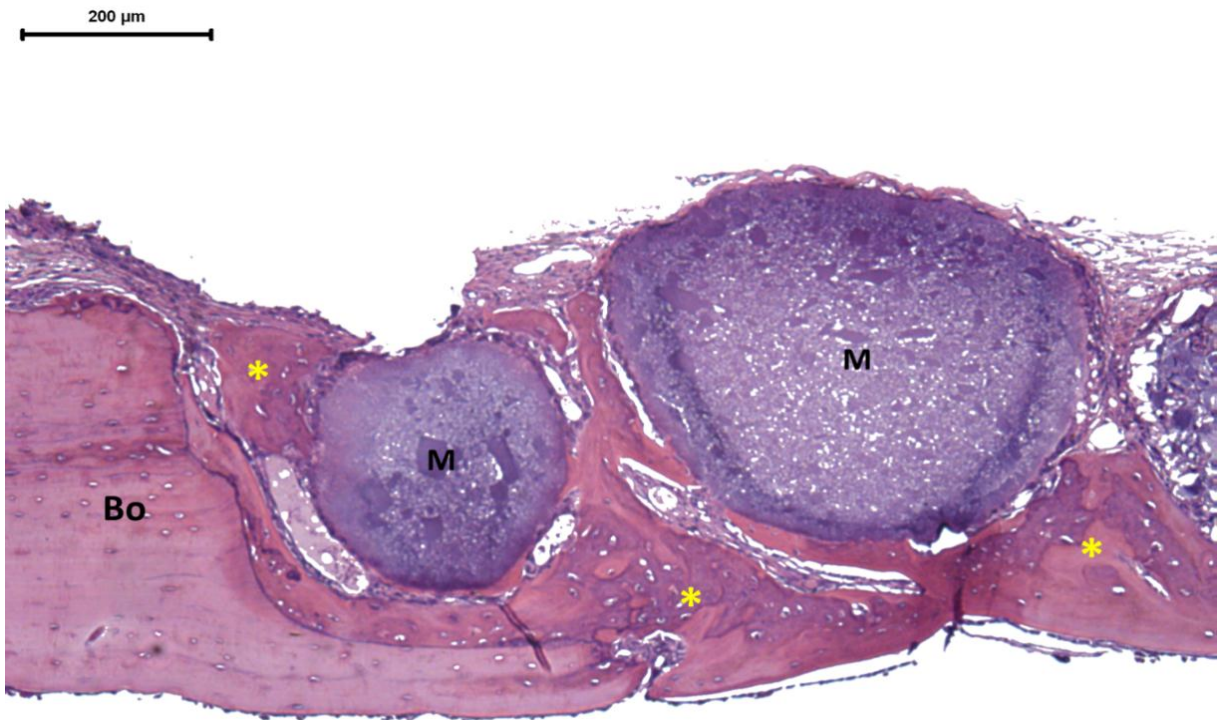


Figura 19 – GHA 15d. Presença de matriz osteóide neoformada (*) nas proximidades da borda óssea (Bo) e circundando as microesferas (M) de HA presentes nesta região. Deposição de tecido conjuntivo (→) dentro da microesfera. PIFG. Barra 200 µm.



Figura 20 – GHA 15d. Tecido conjuntivo (Tc) organizado na região superior do defeito. Nota-se aspecto heterogêneo das microesferas de HA, algumas têm aspecto mais denso (Md) outras mostram-se porosas (Mp). HE. Barra 200 μ m.

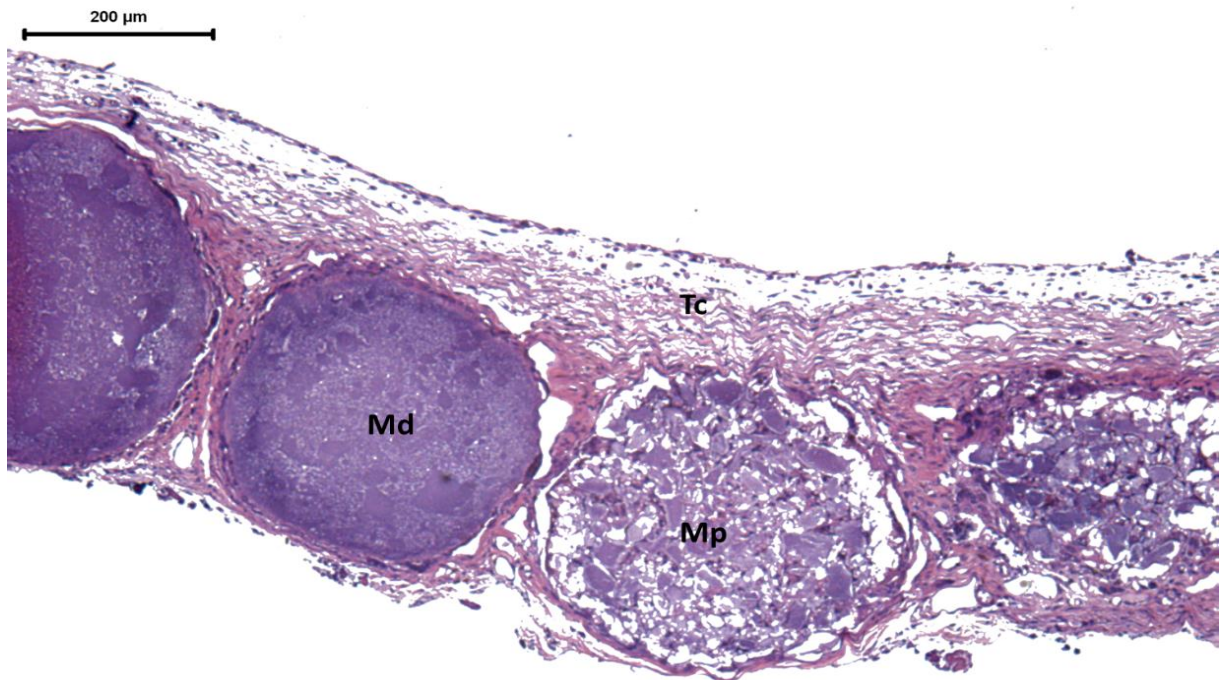
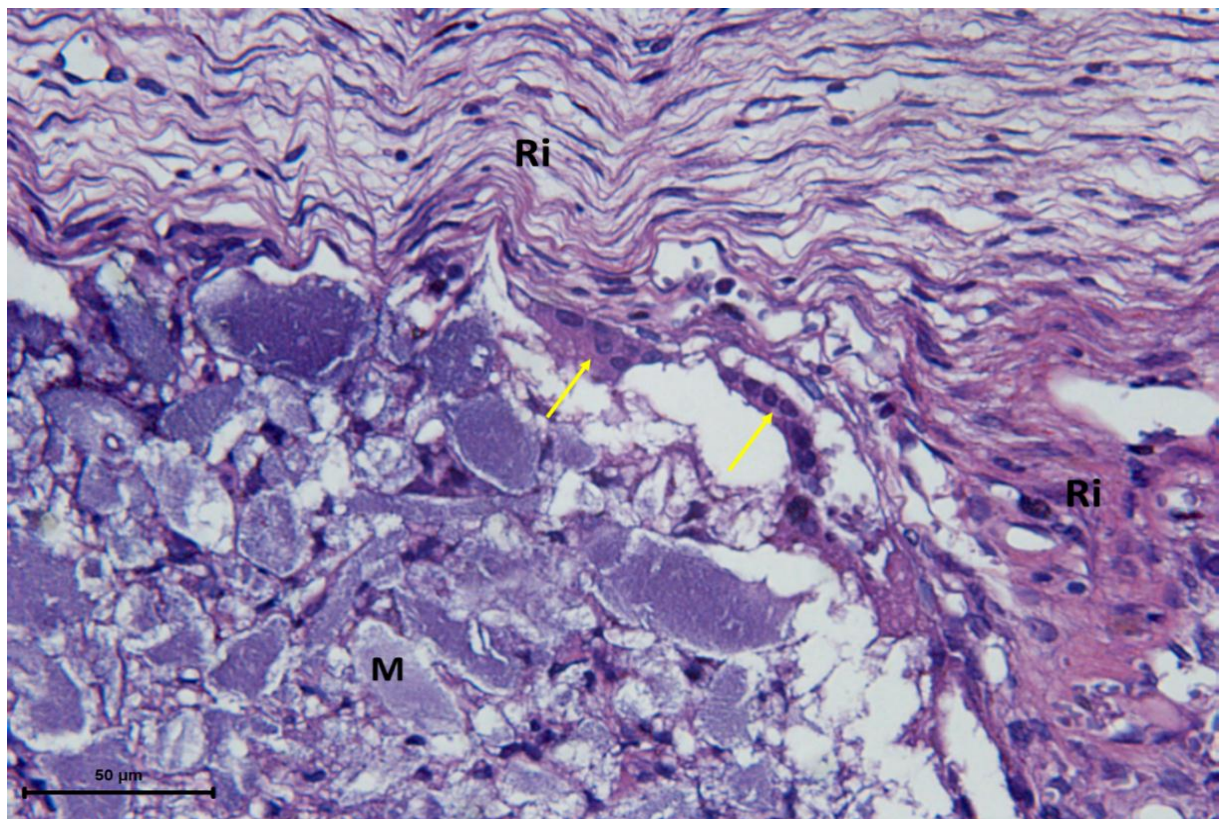


Figura 21 – GHA 15d. Presença de tecido conjuntivo circundando a microesfera (M) de HA, associado à reação inflamatória crônica granulomatosa (RI), com presença de células gigantes multinucleadas (\rightarrow). HE. Barra 50 μ m.



Aos 45 dias, observou-se que a deposição de matriz osteóide nas regiões de borda foi mais evidente que aos 15 dias, preenchendo, em média, 4/5 do defeito em direção centrípeta (Figura 22). O biomaterial se organizou, na maioria das vezes, em multicamadas (Figura 22). As microesferas que se encontravam próximas às bordas ósseas foram englobadas pela matriz osteóide neoformada, com presença de osteócitos e osteoblastos, nesta região (Figuras 23 e 24). Notou-se, circunjacente às microesferas, a presença de vasos sanguíneos e discreto infiltrado inflamatório mononuclear com células gigantes, características da inflamação crônica granulomatosa (Figuras 25, 26 e 27).

Figura 22 – GHA 45d. Presença de mineralização em, praticamente, toda extensão do defeito circunjacente às microesferas (M) de HA. O biomaterial preencheu todo o defeito e se organizou em múltiplas camadas. HE. Barra 300 μ m.



Figura 23 – GHA 45d. Presença de matriz osteóide (*) associada à borda óssea (Bo) e circundando a microesfera (M) de HA próxima a esta região. PIFG. Barra 200 µm.



Figura 24 - GHA 45d. Mineralização (*), com áreas já em organização, circundando a microesfera (M) de HA. Presença de osteócitos. HE. Barra 100 µm.

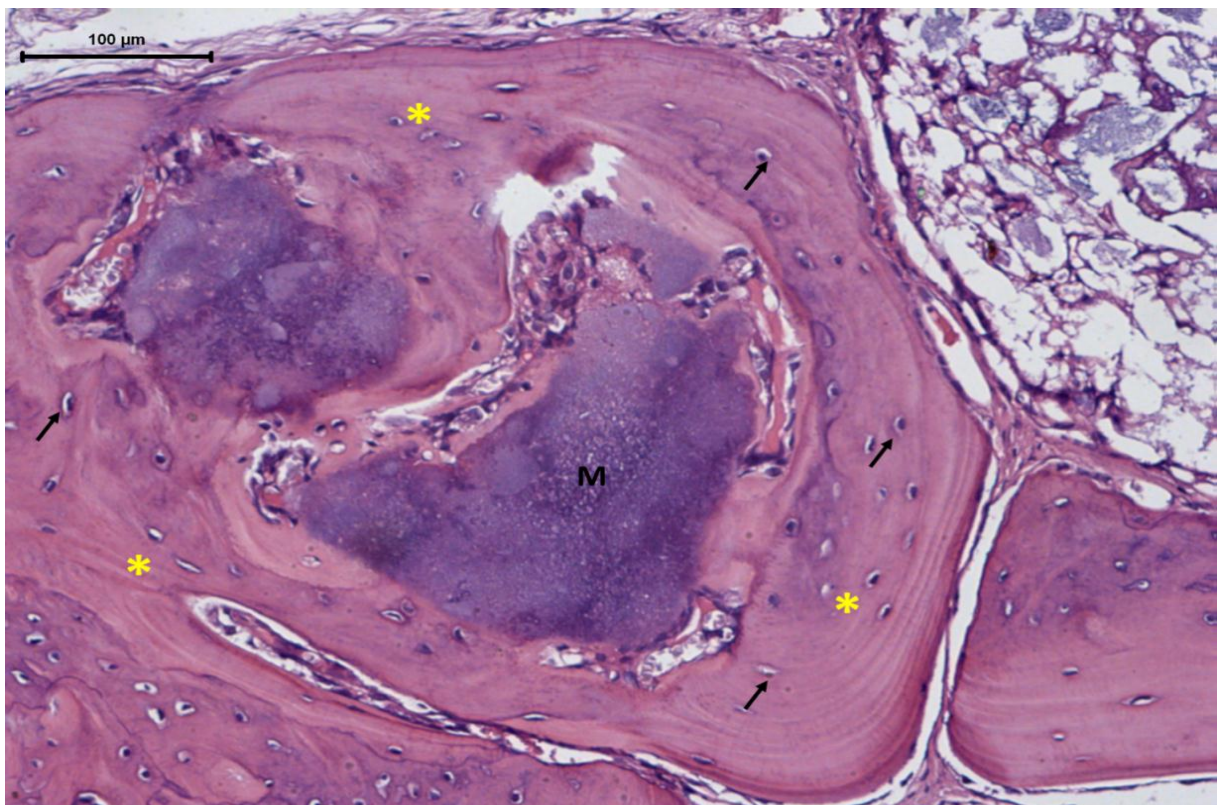


Figura 25 - GHA 45d. Presença de tecido conjuntivo (Tc), rico em vasos sanguíneos (→) de permeio as microesferas (M) de HA. Preenchimento do defeito com múltiplas camadas de biomaterial. HE. Barra 200 µm.

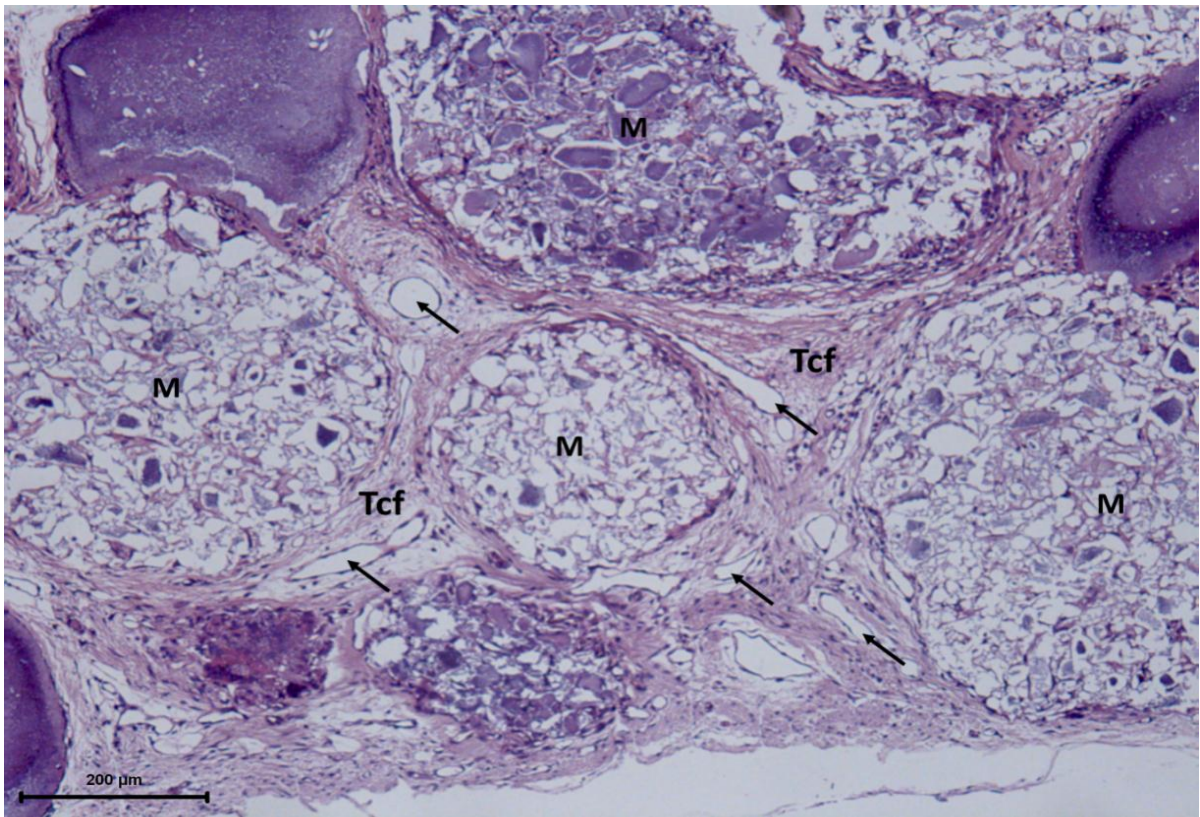


Figura 26 – GHA 45d. Septos de tecido conjuntivo (→) ao redor das microesferas (M) de HA e também no interior de algumas microesferas. PIFG. Barra 200 µm.

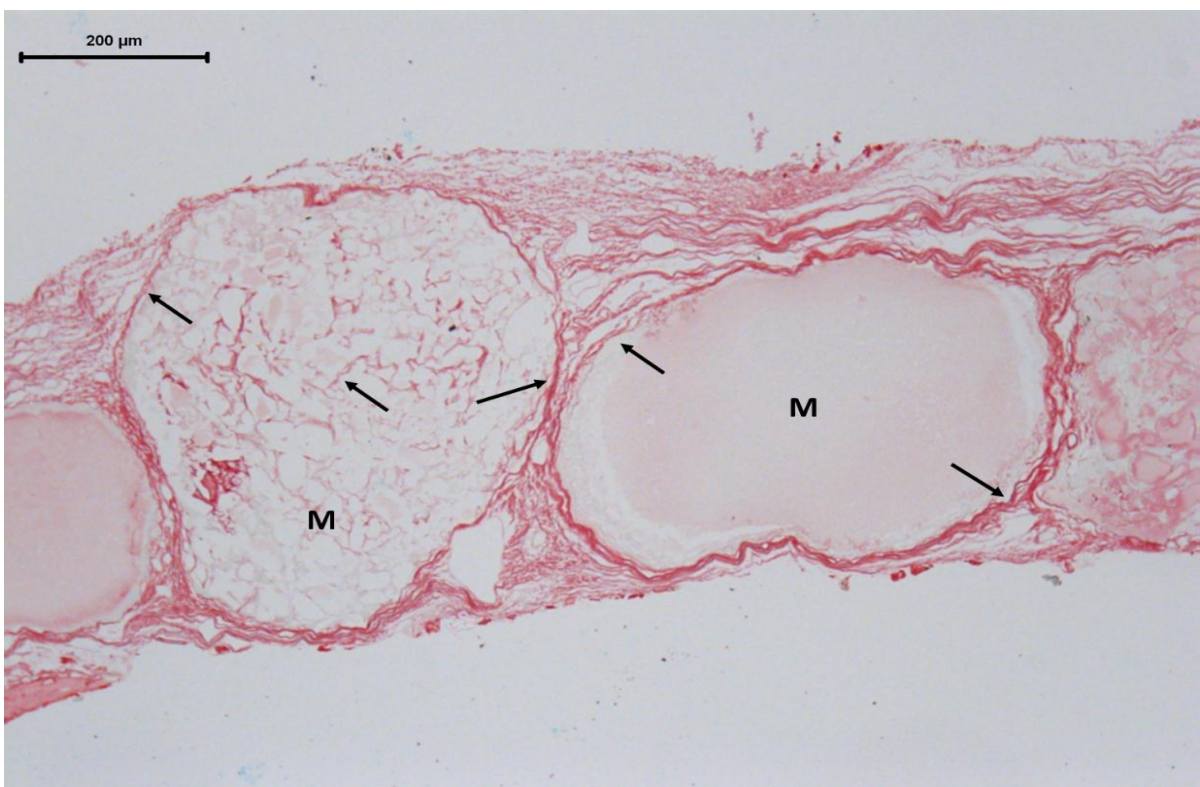
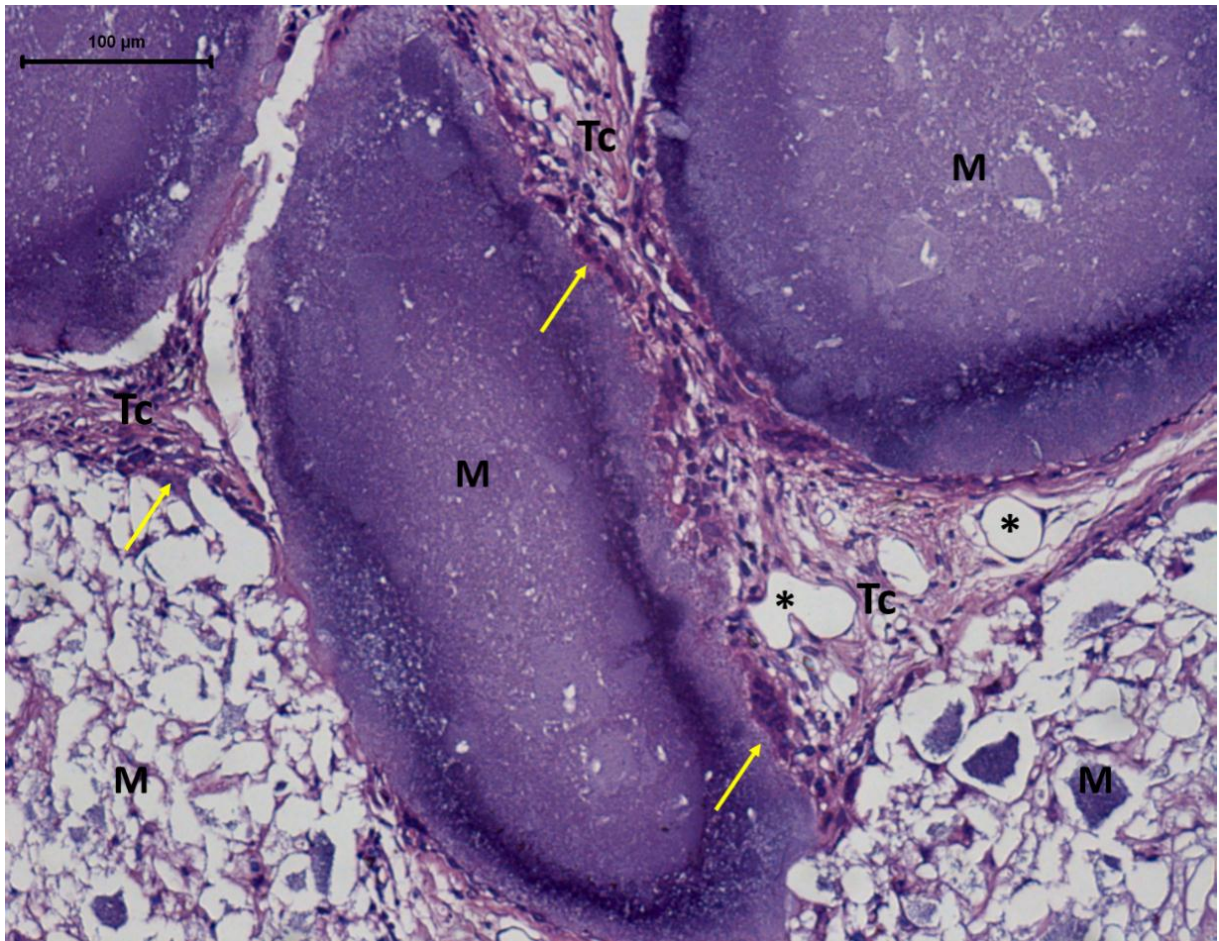


Figura 27 - GHA 45d. Presença de tecido conjuntivo (Tc) circundando as microesferas (M) de HA, com presença de vasos sanguíneos (*) e células gigantes multinucleadas (→). HE. Barra 100 µm.



GC

Aos 15 dias, observou-se limitada neoformação óssea restrita às bordas ósseas, com presença de osteoblastos ativos e osteócitos, e na área residual do defeito notou-se tecido conjuntivo frouxo, com espessura reduzida quando comparado com a borda (Figura 28 e 29), rico em células fusiformes e vasos sanguíneos (Figura 30). Observou-se também inflamação crônica discreta (Figura 30).

Figura 28 - - GC 15d. Mineralização (*) restrita às bordas ósseas (Bo) e área residual preenchida por tecido conjuntivo (Tc) em toda sua extensão. Veia central (Vc). HE. Barra 300 µm.



Figura 29- GC 15d. Mineralização (*) associada a borda óssea (Bo) com tecido conjuntivo (Tc) em toda a área residual do defeito. HE. Barra 200 µm.

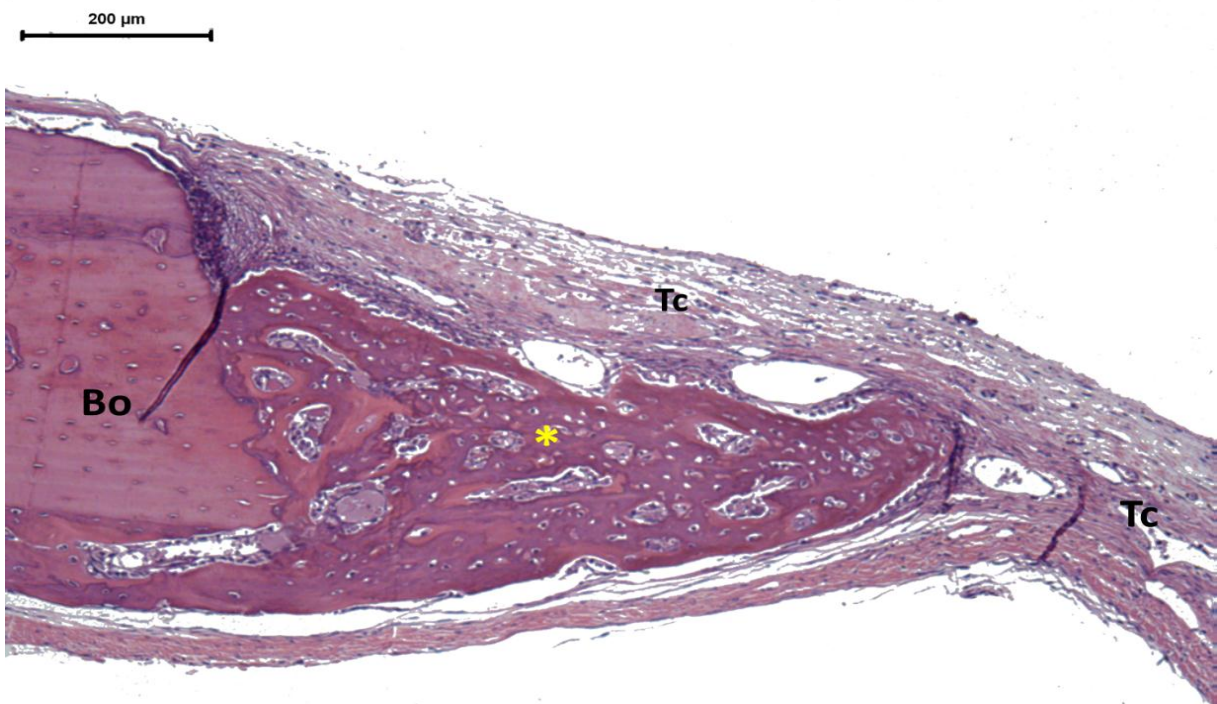
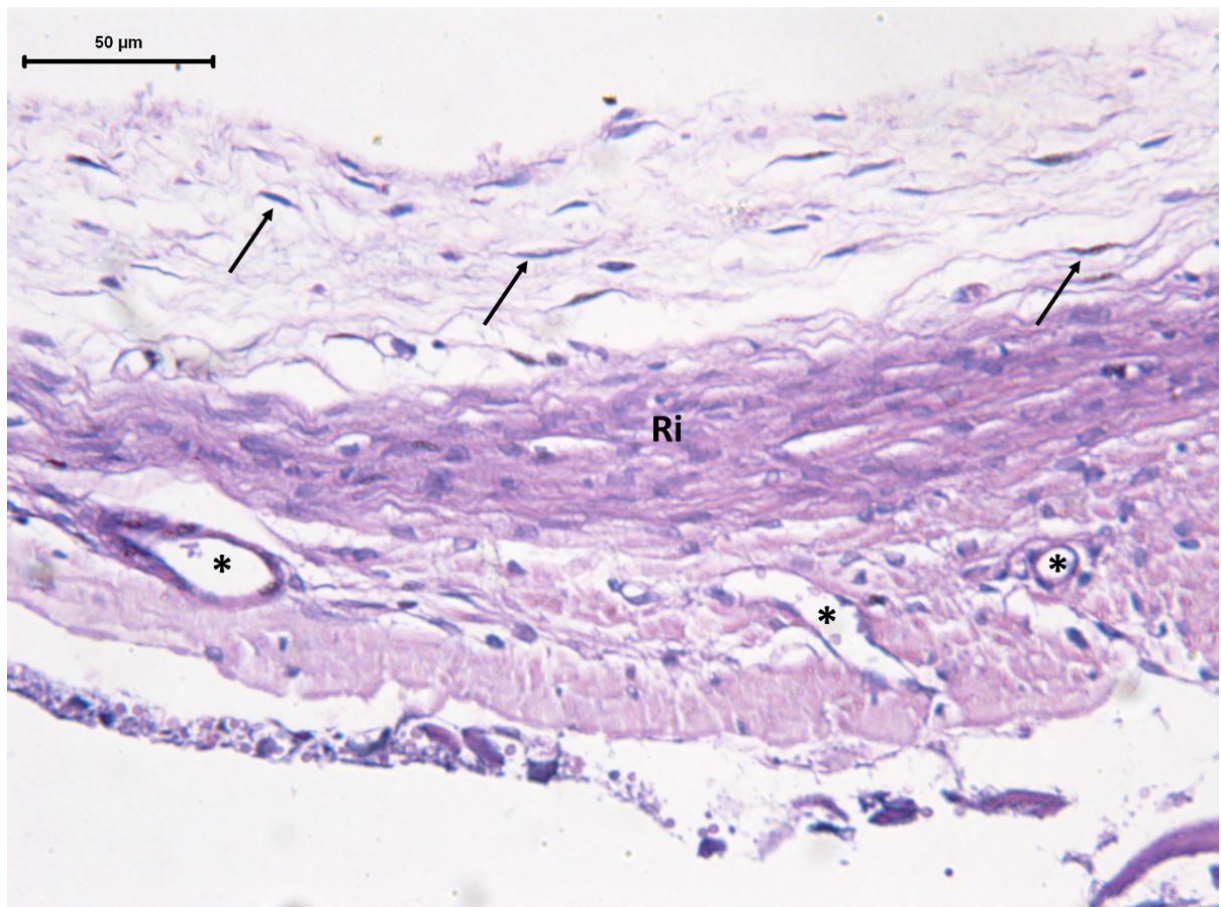


Figura 30 – GC 15d. Presença de tecido conjuntivo associado a uma reação inflamatória crônica (Ri), infiltrado inflamatório monomorfonuclear. Nota-se a presença de células fusiformes (→) e vasos sanguíneos (*). HE. Barra 50 µm.



Aos 45 dias, notou-se que a neoformação óssea estendeu-se além da borda em direção centrípeta ao defeito, e mais evidente do que aos 15 dias (Figura 31). A inflamação crônica discreta com escassas células inflamatórias mononucleares. Notou-se também a presença de vasos sanguíneos e células fusiformes de permeio ao tecido conjuntivo formado nas regiões onde não houve mineralização, na região central, o que equivale provavelmente à região de sutura na tábua óssea da calvária (Figura 32).

Figura 31 – GC 45d. Defeito ósseo preenchido por tecido mineralizado (*), com a presença de uma pequena área de tecido conjuntivo (Tc) na região central. Borda óssea (Bo). HE. Barra 300 μ m.

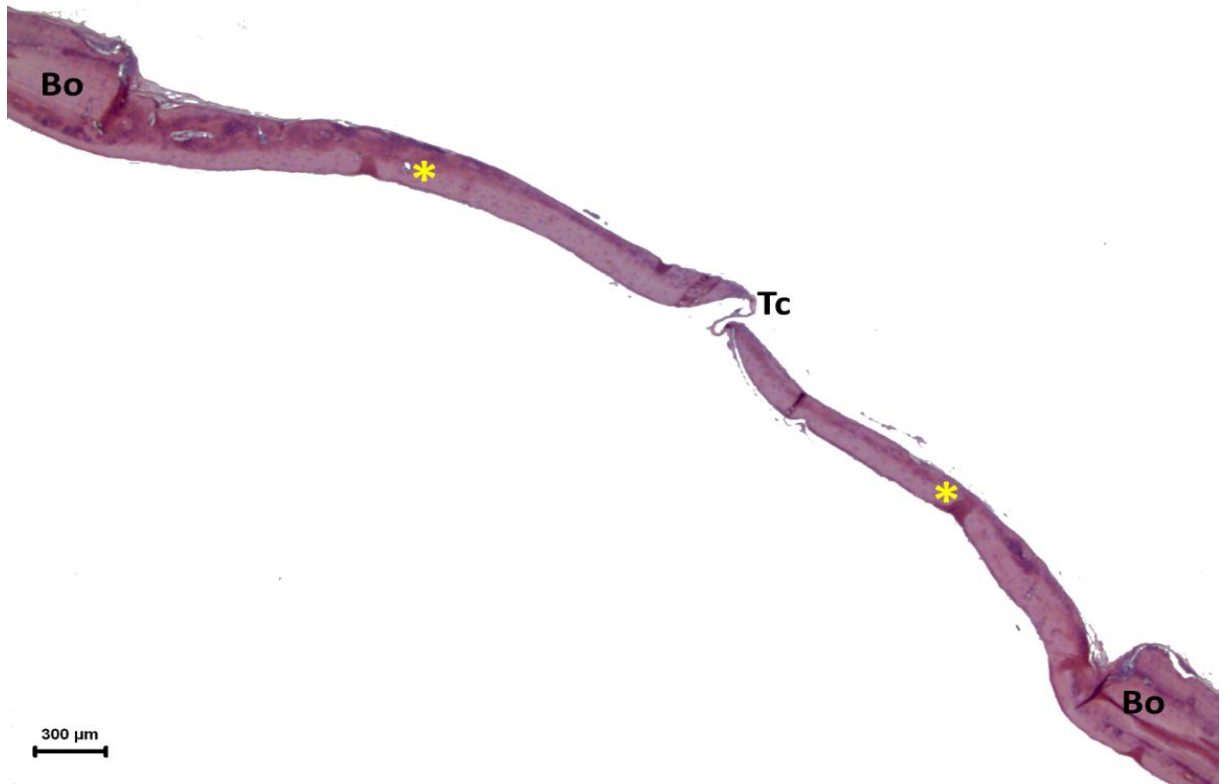
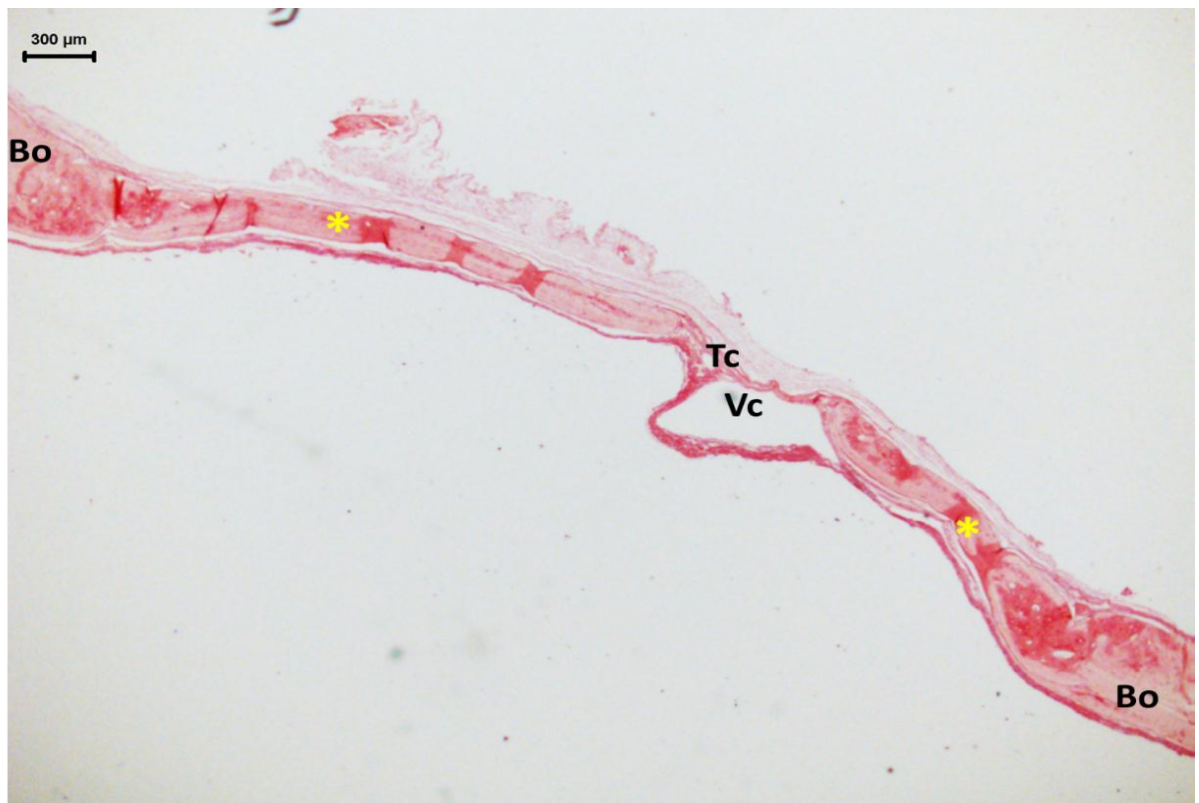


Figura 32 – GC 45d. Presença de tecido conjuntivo fibroso (Tc) na região central do defeito. Matriz osteóide (*). PIFG. Barra 100 μ m.



5.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

5.2.1 Extensão linear do defeito ósseo

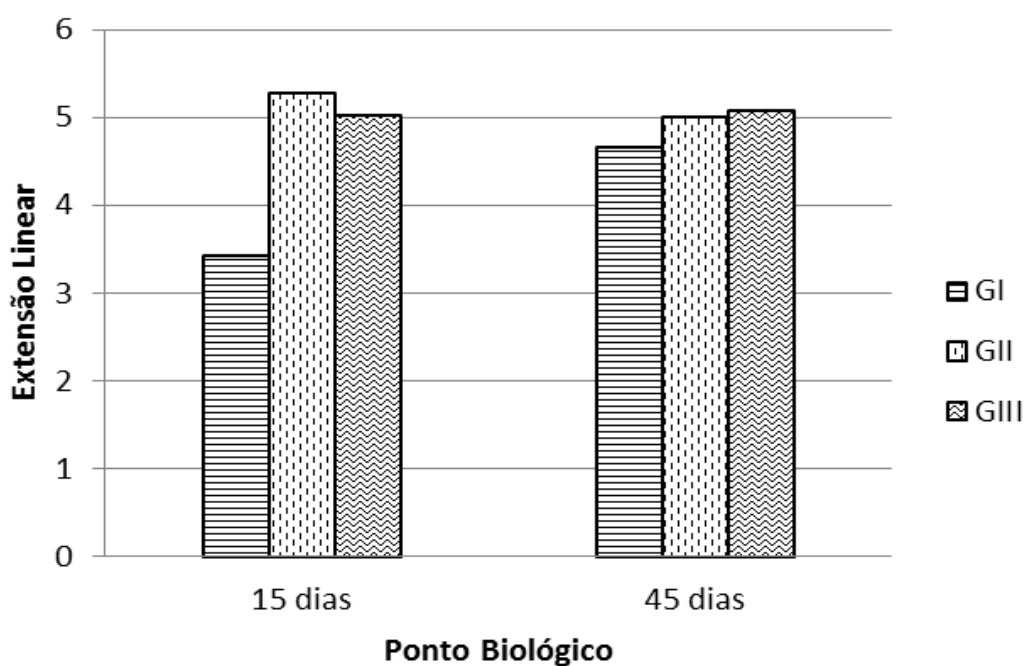
Em relação à extensão linear do defeito não se observou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados, em nenhum dos pontos biológicos (Tabela 2 3), mostrando que o defeito permaneceu com uma dimensão aproximada de 5mm.

Tabela 2 - Média (desvio-padrão) da extensão linear do defeito ósseo dos grupos experimentais, nos pontos biológicos de 15 e 45 dias.

Período \ Grupo	GHAMg	GHA	GC	Valor de p	Comparação GHAMg com GHA	Comparação com GC
15 dias	3,43 ± 2,38	5,27 ± 0,19	5,02 ± 0,17	$p=0,18$ NS	$p=0,20$ NS	GI: $p=0,28$ NS GII: $p=0,97$ NS
45 dias	4,65 ± 0,62	5,00 ± 0,86	5,07 ± 0,19	$p=0,60$ NS	$p=0,71$ NS	GI: $p=0,61$ NS GII: $p=0,98$ NS

NS: não significante; S: significante.

Figura 33 - Mensuração da extensão linear do defeito ósseo dos grupos experimentais, nos pontos biológicos de 15 e 45 dias.



5.2.2 Área de matriz osteóide neoformada

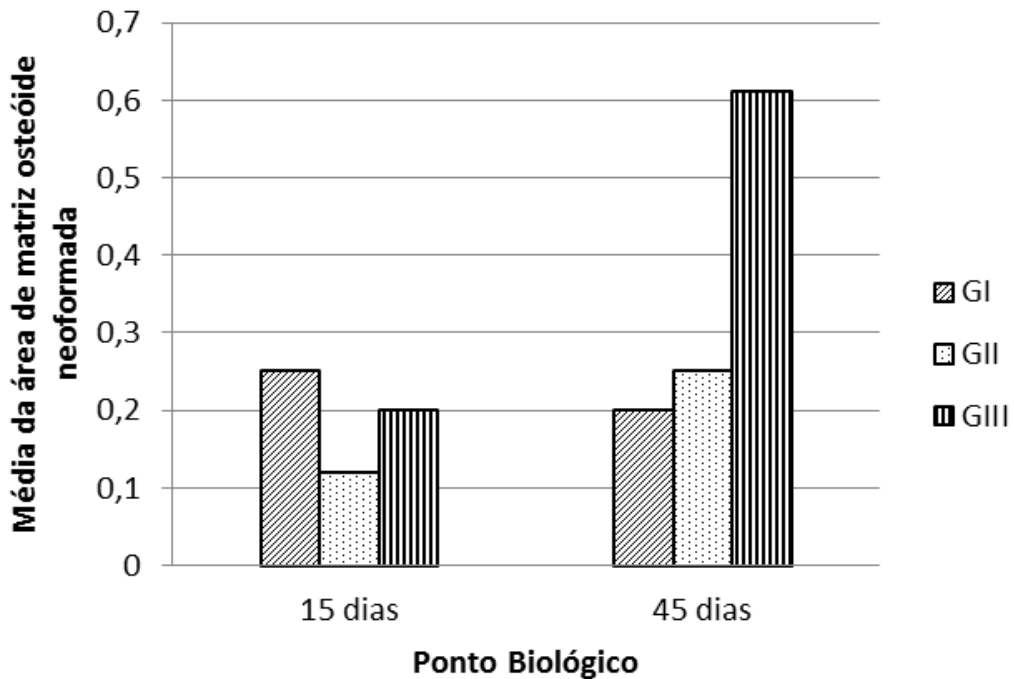
Aos 15 dias não se observou diferenças significativas quanto à área de matriz osteóide neoformada. Contudo, no ponto biológico de 45 dias, pode-se observar significância estatística quanto o total desta, comparando os grupos **GHAMg** e **GHA** com **GC**, tendo **GC** maior média de matriz osteóide neoformada (Tabela 3).

Tabela 3 - Média (\pm desvio-padrão) da área de matriz osteóide neoformada dos grupos experimentais, nos pontos biológicos de 15 e 45 dias.

Período \ Grupo	GHAMg	GHA	GC	Valor de p	Comparação GHAMg com GHA	Comparação com GC
15 dias	0,25 \pm 0,29	0,12 \pm 0,07	0,20 \pm 0,38	$p=0,58$ NS	$p=0,55$ NS	GHAMg: $p=0,89$ NS GHA: $p=0,82$ NS
45 dias	0,20 \pm 0,13	0,25 \pm 0,11	0,61 \pm 0,21	$p=0,01$ S	$p=0,92$ NS	GHAMg: $p=0,01$ S GHA: $p=0,02$ S

NS: não significante; S: significante.

Figura 34 - Análise da razão de matriz osteóide neoformada na área seccional total do defeito dos grupos experimentais, nos pontos biológicos de 15 e 45 dias.



6 DISCUSSÃO

No âmbito da Bioengenharia Tecidual Óssea a HA tem destaque entre as cerâmicas à base de fosfato de cálcio devido à sua similaridade com componentes da fase mineral do tecido ósseo, boa biocompatibilidade, osteocondutividade, e, também, por sua bioatividade, que favorece a interação entre o tecido ósseo e o biomaterial⁹³. Estas características puderam ser observadas no nosso estudo, uma vez que quando implantadas, as microesferas de HA dopadas ou não com Mg, mostraram-se biocompatíveis, osteocondutores e bioativas.

A propriedade de osteocondução dos biomateriais possibilita que estes funcionem como arcabouços e favoreçam a adesão, a migração e a proliferação de células mesenquimais, a angiogênese e a formação de um novo tecido ósseo⁹⁴. Para tanto, é importante que os biomateriais permaneçam no sítio de implantação durante o reparo, pois o deslocamento dos mesmos limita a execução de sua funcionalidade. Nos grupos, onde houve a implantação dos biomateriais, as microesferas se organizaram em camadas, e, conseqüentemente formaram um arcabouço para deposição de um novo tecido mineralizado de permeio às microesferas, nos dois grupos e em ambos pontos biológicos. Esta neoformação iniciou nas bordas, provavelmente, estimulada por fatores inflamatórios, angiogênicos, de crescimento e de diferenciação celulares liberados nesta região devido à ruptura vascular decorrente do procedimento cirúrgico e, também, pela presença do periósteo na região adjacente ao defeito^{75,95}.

Biomateriais à base de fosfato de cálcio são amplamente utilizados na prática clínica, médica e odontológica. Assim, atualmente, existem diferentes pesquisadores utilizando fosfatos de cálcio, em diferentes formulações, especialmente, substituídos por diferentes íons, a fim de melhorar propriedades físico-químicas do material. Entre os diferentes cátions utilizados nestas substituições, o Mg é de especial importância, por ser o quarto cátion mais abundante no corpo, segundo no meio intracelular e o mais abundante em cartilagem e tecido ósseo durante as fases iniciais da osteogênese¹².

A adição de Mg à estrutura hexagonal da HA, por meio da substituição dos íons de Ca por Mg, favorece a diminuição da cristalinidade da HA e conseqüentemente aumento no grau de dissolução desta cerâmica¹⁰. Assim, a HA dopada com Mg (**GHAMg**)

desencadeou uma reação inflamatória mais evidente, com aparente maior grau de degradação das microesferas, aos 15 e 45 dias, quando comparada com as microesferas de HA sem o metal (**GHA**). Diferentemente, os resultados encontrados por⁹⁶, ao avaliarem grânulos de HA dopados com Mg, mostraram que a degradação dos grânulos dopados com o metal foi semelhante aquela observada nos grânulos de HA estequiométrica. Contudo, os grânulos utilizados neste estudo não foram sinterizados. Já as microesferas avaliadas em nosso estudo foram sinterizadas à 1100°C.

A biodegradação da HA – fator que interfere na reação tecidual ao biomaterial – pode ocorrer pela combinação dos seguintes processos: (1) físico-abrasivo – fratura, desintegração; (2) químico – dissolução, aumento de Ca e P localmente na superfície; e (3) biológico – redução do pH causado pela atividade celular e fagocítica, resultando no aumento da taxa de biodegradação devido à dissolução do cálcio e fósforo⁹⁷. Fatores que tendem a aumentar a taxa de biodegradação incluem aumento da porosidade, redução do tamanho do cristal, aumento no número de cristais imperfeitos e tamanho do biomaterial⁹⁷. No estudo de Kalita e Bhatt (2007)⁹⁸ foi avaliado as características físico-químicas de HA dopada ou não com magnésio e zinco, *in vitro*, os autores observaram que a HA dopada com Mg obteve a maior taxa de degradação quando comparada a HA pura e com zinco. Nosso estudo, *in vivo*, corrobora com estes achados, uma vez que as microesferas de HAMg apresentavam maior degradação quando comparada a HA sem o metal.

Somado a isto, este íon está intimamente associado ao mecanismo de mineralização¹⁰, principalmente na fase inicial de osteogênese, uma vez que aumenta a cinética de nucleação da HA, retardando sua cristalização, e pode interferir em mudanças qualitativas da matriz óssea¹⁰. Isto pode ser notado aos 15 dias no **GHAMg** onde pode-se observar uma neoformação óssea superior **GHA**, 25% e 12% da área total, respectivamente. Porém, este padrão não se repetiu aos 45 dias, tendo o **GHA** (25% da AT) uma neoformação óssea próxima ao **GHAMg** (20% da AT). Em ambos os casos estas diferenças não foram significativas ($p=0,55$ – 15 dias e $p=0,92$ – 45 dias).

No **GHA**, aos 15 dias, notou-se que as microesferas apresentavam-se com aspecto não uniforme, pois ora havia a presença de tecido conjuntivo em seu interior, ora não. Isto mostra uma heterogeneidade na estrutura das microesferas que pode estar relacionada ao processo de sinterização, que resultou em microesferas com cristais mais coesos em determinadas regiões e menos coesos em outras. Em regiões

onde houve menor fragmentação do biomaterial, provavelmente devido à sinterização mais efetiva, houve maior formação de tecido ósseo ao redor destas partículas, principalmente próxima às margens ósseas. No **GHAMg** as microesferas caracterizaram-se por um aspecto mais denso sendo observada neoformação óssea além das bordas ósseas do defeito, e distante das bordas, esta neoformação foi observada de permeio às microesferas, por vezes, circundando-as. Este aspecto mais denso das microesferas dopadas com Mg pode estar associado ao fato da adição de Mg favorecer a sinterização mais uniforme⁹⁹ e também aumentar as propriedades mecânicas do biomaterial, sem alterar a segurança biológica e biocompatibilidade do composto inicial⁹⁹.

A confecção de um defeito na região da calvária culmina com rompimento vascular que promove o extravasamento sanguíneo, liberação de citocinas inflamatórias, formação de coágulo, inflamação aguda e inflamação crônica³⁵. Esta reação, quando associada ao biomaterial, e a depender de suas características físico-químicas, tem maior ou menor intensidade e finda com uma regeneração óssea, reação de corpo estranho ou fibrose. Nos três grupos experimentais deste estudo, observou-se uma inflamação crônica. Nos grupos **GHAMg** e **GHA**, esta inflamação foi do tipo crônica granulomatosa, o que, segundo³⁵, é inerente à implantação dos biomateriais nos tecidos vivos. Este tipo de resposta inflamatória crônica também foi encontrado por Barreto (2006)¹⁰⁰, Cardoso e colaboradores (2006)¹⁰¹, Miguel e colaboradores (2006)³⁹, Barreto (2008)¹⁰², Paula (2008)¹⁰³, Rolim (2010)⁹², Barreto (2011)¹⁰⁴, Miguel e colaboradores (2013)⁴⁰ e Ribeiro (2013)¹⁰⁵ que também avaliaram biomateriais para regeneração óssea, em calvária de rato. Vale ressaltar que nestes estudos o defeito ósseo foi de 8mm e no nosso o defeito foi de 5mm, o que não tem correlação com o surgimento de inflamação crônica granulomatosa. Além disso, nosso estudo corrobora com o de Barreto (2011)¹⁰⁴, que avaliou o potencial osteogênico de microesferas de HA e também observou, aos 15 dias, uma reação inflamatória mais acentuada associada às microesferas mais fragmentadas.

Outro fator fundamental à regeneração óssea é a neovascularização³⁷. No nosso estudo observou-se neoformação vascular em toda a extensão do defeito nos três grupos, em todos os períodos estudados, sendo mais acentuada no **GHAMg** e **GHA**. Este aspecto é de fundamental importância para o reparo ósseo, uma vez que fornece nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento necessários à diferenciação e

maturação de células mesenquimais indiferenciadas, bem como células da linhagem osteoblástica, em osteoblastos⁵.

No **GC** (controle) a neoformação limitou-se, aos 15 dias, à região das bordas, com 20% da AT preenchida por matriz osteóide neoformada. Já aos 45 dias, esta neoformação evoluiu em direção centrípeta, e ocupou 61% da área total do defeito. Nossos resultados contrapõem os resultados obtidos por Develioglu, Saraydin e Kartal (2009)¹⁰⁶, Frota e colaboradores (2010)¹⁰⁷ e Zong e colaboradores (2010)¹⁰⁸, já que estes estudos concluíram que defeito ósseos com 5mm em calvária podem ser considerados críticos, por apresentarem reparo finalizado por fibrose e neoformação óssea restrita as bordas, no controle e, também, nos grupos com a implantação de biomateriais. Desta forma, fica evidente que não há consenso entre os autores sobre o exato diâmetro para o defeito ósseo ser considerado como crítico – defeito que não regenera ao longo da vida do animal¹⁰⁹. Alguns autores utilizaram defeitos com dimensão de 4mm¹¹⁰; de 5mm^{76,91,111,112}; de 6mm¹¹³; e de 8mm^{41,114,30,40}. O que se torna evidente é que defeitos ósseos com dimensões de 4, 5 e 6 mm, em que a área residual remanescente é pequena, pode apresentar regeneração óssea completa, apenas com a utilização de biomateriais osteocondutores.

Estimular a regeneração óssea é um desafio constante para os profissionais da área de saúde e pesquisadores da área de Bioengenharia Tecidual Óssea. Atualmente a tendência é desenvolver e utilizar biomateriais biomiméticos que acelerem e/ou favoreçam a regeneração do defeito ósseo, diminuindo o risco pós-operatório⁴.

A biocompatibilidade e o potencial osteocondutor dos biomateriais estudados evidenciados neste estudo demonstram seu potencial para futuras aplicações clínicas, principalmente em perdas ósseas menores. Contudo, estudos em defeitos críticos devem ser realizados para melhor caracterizar o potencial osteogênico da HA dopada com Mg.

7 CONCLUSÕES

- Os biomateriais foram biocompatíveis, osteocondutores;
- O grupo controle apresentou neoformação óssea evidente, compatível com a capacidade regenerativa do tecido ósseo, sem, contudo, regenerar-se de modo completo, no período observado;
- Os grupos HAMg e HA restituíram a altura óssea em comparação ao grupo controle;
- O Mg não favoreceu maior regeneração óssea;
- Os biomateriais avaliados neste estudo são interessantes para aplicações clínicas onde a permanência do biomaterial faz-se necessário, como material de preenchimento ósseo.

REFERÊNCIAS

- 1 Langer RS, Vacanti JP. Tissue engineering: the challenges ahead. *Sci Am.* 1999 Apr;280(4):86-9.
- 2 Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2000 Dec;21(23):2347-59.
- 3 Borojevic, R. Terapias Celulares e Bioengenharia. *Gaz Med Bahia.* 2008;78, s.1:42-46.
- 4 Lavik E, Langer R. Tissue engineering: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004 Jul;65(1):1-8.
- 5 Vogel M, Voigt C, Gross UM, Müller-Mai CM. In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. *Biomaterials.* 2001 Feb;22(4):357-62.
- 6 Kawachi EY, Bertran CA, Reis RR, Alves OL. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Quím. Nova.* 2000;23(1):518-22.
- 7 Vallet-Regí M, González-Calbet JM. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog. Solid State Chem.* 2004 32: 1-31.
- 8 Cazalbou S, Eichert D, Ranz X, Drouet C, Combes C, Harmand MF, Rey C. Ion exchanges in apatites for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2005 May;16(5):405-9.
- 9 Dourado ER. Preparação e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada dopada com estrôncio. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas; 2006.
- 10 Gouveia DS. Obtenção de pós nanométricos de hidroxiapatita sintetizados com magnésio utilizando ultrassom. [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2008.
- 11 Castiglioni S, Cazzaniga A, Albisetti W, Maier JA. Magnesium and osteoporosis: current state of knowledge and future research directions. *Nutrients.* 2013 Jul 31;5(8):3022-33.
- 12 Tavares D dos S, Castro L de O, Soares GD, Alves GG, Granjeiro JM. Synthesis and cytotoxicity evaluation of granular magnesium substituted β -tricalcium phosphate. *J Appl Oral Sci.* 2013 Jan-Feb;21(1):37-42.
- 13 Laurencin D, Almora-Barrios N, de Leeuw NH, Gervais C, Bonhomme C, Mauri F, Chrzanowski W, Knowles JC, Newport RJ, Wong A, Gan Z, Smith ME. Magnesium incorporation into hydroxyapatite. *Biomaterials.* 2011 Mar;32(7):1826-37.
- 14 LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res.* 2002 Feb;(395):81-98.
- 15 Mavropoulos E. A hidroxiapatita como absorvedor de metais. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 1999.

- 16 Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys.* 1998 Mar;20(2):92-102.
- 17 Rockwood CA, Green DP, Bucholz RW. *Fraturas em adultos*. 3. ed. São Paulo: Manole;1993.
- 18 Andi DC, Cerri PS, Spolidorio LC. Bone Tissue: morphological and histophysiological aspects. *Rev. Odontol. UNESP.* 2006;35(2):191-8.
- 19 DeLacure MD. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994 Oct;27(5):859-74.
- 20 Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2004 Dec 15;362(1825):2821-50.
- 21 Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol.* 2000 Oct;24:99-126.
- 22 Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000 Sep 1;289(5484):1504-8.
- 23 Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, Pereira RM. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Feb;38(2):161-70.
- 24 Rude RK, Gruber HE, Wei LY, Frausto A. Immunolocalization of RANKL is increased and OPG decreased during dietary magnesium deficiency in the rat. *Nutr Metab (Lond).* 2005 Sep 14;2(1):24.
- 25 Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med (Berl).* 2001 Jun;79(5-6):243-53.
- 26 Yamamoto Y, Udagawa N, Matsuura S, Nakamichi Y, Horiuchi H, Hosoya A, Nakamura M, Ozawa H, Takaoka K, Penninger JM, Noguchi T, Takahashi N. Osteoblasts provide a suitable microenvironment for the action of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Endocrinology.* 2006 Jul;147(7):3366-74
- 27 Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA. Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. *Calcif Tissue Int.* 1998 Jan;62(1):74-82.
- 28 Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* 2000;21(7):667-81.
- 29 Boskey AL, Paschalis E. Matrix protein and biomineralization. In: Davies JE. *Bone Engineering*. Toronto, Canada: Squared Incorporated, 2000, p.44-62,
- 30 Lacerda KA, Lameiras FS, Silva VV. Avaliação da biodegradação de matrizes porosas à base de hidroxiapatita para aplicação como fontes radioativas em braquiterapia. *Quim Nova.* 2009;32(5):1216-21,

- 31 Bandyopadhyay A, Bernard S, Xue W, Bose S. Calcium phosphate-based resorbable ceramics: influence of MgO, ZnO, and SiO₂ dopants. *J. Am. Ceram. Soc.* 2006;9:2675-88.
- 31 Vianna, U. Histofisiologia do tecido ósseo. *Rev. Bras. Clín. Ter. Out.* 1988 7(10):331-9
- 32 Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials.* 2006 Mar;27(9):1728-34.
- 33 Jahnhen-Dechent W, Ketteler M. Magnesium basics. *Clin. Kidney J.*, 5, Suppl.1, i3–i14, 2012.
- 34 Seal BL, Otero TC, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Mater. Sci. Eng.* Oct 2001 34(4-5):147-230
- 35 Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol.* 2008 Apr;20(2):86-100.
- 36 Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. Vascular endothelial growth factor stimulated bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 23;99(15):9656-61.
- 37 Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today.* 2003 Nov 1;8(21):980-9.
- 38 Kim SS, Sun Park M, Jeon O, Yong Choi C, Kim BS. Poly (lactide-coglycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006 Mar;27(8):1399-409.
- 39 Miguel FB, Cardoso AK, Barbosa AA Jr, Marcantonio E Jr, Goissis G, Rosa FP. Morphological assessment of the behavior of threedimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006 Aug;78(2):334-9.
- 40 Miguel FB, Barbosa Júnior Ade A, de Paula FL, Barreto IC, Goissis G, Rosa FP. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. *J Mater Sci Mater Med.* 2013 Nov;24(11):2567-75.
- 41 Lim SC, Lee MJ, Yeo HH. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. *Pathol Int.* 2000 Aug;50(8):594-602.
- 42 Gil MH, Ferreira P. Polissacarídeos como biomateriais. *Química.* 2006 100:72-74.
- 43 Orefice RL, Pereira MM, Mansur HS. Biomateriais fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica: Guanabara Koogan, 2012.
- 44 Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell JA. Biomaterials in Orthopeaedics. *J R Soc Interface.* 2008 Oct 6;5(27):1137-58.

- 45 Pereira APV, Vasconcelos WL, Oréfice RL. Novos biomateriais: híbridos orgânico-inorgânicos bioativos. *Polímeros*, out./dez. 1999 9(4): 104-109.
- 46 Hench L, Polak J. Third-generation biomedical materials. *Science*. 2002 Feb 8;295(5557):1014-7
- 47 Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 2012;40(5):363-408
- 48 Mellonig JT, Nevins M, Sanchez R. Evaluation of a bioabsorbable physical barrier for guided bone regeneration. Part II. Material and a bone replacement graft. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1998 Apr;18(2):129-37.
- 49 Gutierrez M, Lopes MA, Hussain NS, Cabral AT, Almeida L, Santos JD. Substitutos ósseos: conceitos gerais e estado actual. *Arq Med*, 2005 19(4): 153-162
- 50 Olsson DC; Pippi NL; Tognoli GK; Raiser AG. Comportamento biológico de matriz scaffold acrescida de células progenitoras na reparação óssea. *Ciênc. Rural*. Nov 2008 38(8):2403-2412.
- 51 Blanch E, Garreta E, Gasset D, Genové E, Colominas C, Semino C, Borrós S. Development of hydroxyapatite-based biomaterials scaffolds for hard tissue regeneration. *Eur Cell Mater*. 2004;7(1):46.
- 52 Granjeiro JM, Gonçalves F, Taga R, Takamori ER, Sicca CM. Aplicação da engenharia de tecidos na odontologia. In: Pontual MAB, Magini RS, organizadores. *Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento – das pesquisas científicas à clínica odontológica*. São Paulo: Editora Santos, 2004, p. 73-95.
- 53 Calasans-Maia MD, Fernandes GVO, Rossi AM, Dias EP, Almeida GDS, Mitri FF, Granjeiro JM. Effect of hydroxyapatite and zinc-containing hydroxyapatite on osseous repair of critical size defect in rat calvaria. *Key Eng Mater*, 2008;361-3, 1273-6.
- 54 Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7.
- 55 Temenoff JS, Mikos AG. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(23):2405-12.
- 56 Dorozhkin SV. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. *Acta Biomater*. 2010 Mar;6(3):715-34.
- 57 Sicca CM, Oliveira RC, Silva TL, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR; Taga R, Taga EM, Granjeiro JM, Kina JR. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em ratos. Efeito do subcutâneo de tamanho da partícula. *Rev. Fac. Odontol.* jan.-jun. 2000 8(1/2):1-10.
- 58 Moreira ASB, Pastoreli MT, Damasceno LHF, Defino HLA. Estudo experimental da influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita na integração óssea. *Acta Ortop. Bras*. 2003 Dec 11(4):240-250.

- 59 Sanada JT, Rodrigues JGR, Canova GC, Cestari TM, Taga EM, Taga R, Buzalaf MAR, Granjeiro JM. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. *J. appl. oral sci*; 2003 July-Sept 11(3):209-215.
- 60 Saiz E, Gremillard L, Menendez G, Miranda P, Gryn K, Tomsia AP. Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C*. 2007 27(3):546-550.
- 61 Conz MB, Granjeiro JM, Soares G de A. Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications as bone graft. *J Appl Oral Sci*. 2005 Jun;13(2):136-40.
- 62 Limeira Júnior FA. Estudo do reparo de defeitos ósseos irradiados com laser λ 830nm submetidos ou não a implante de hidroxiapatita sintética e/ou membrana de osso bovino [Tese]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2004.
- 63 Tadjoeidin ES, de Lange GL, Bronckers AL, Lyaruu DM, Burger EH. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *J Clin Periodontol*. 2003 Mar;30(3):261-70.
- 64 Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous Bovine Bone Mineral in Healing of Human Extraction Sockets: 2. Histochemical Observations at 9 Months. *J Periodontol*. 2001 Feb;72(2):152-9.
- 65 Rosa AL, Shareef MY, Van Noort R. Effect of preparing and sintering conditions on hydroxyapatite porosity. *Pesqui. Odontol. Bras.*, 2000 14(3):273-7.
- 66 Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol*. 2003 Mar;22(1):81-91.
- 67 Leonel ECF, Mangilli PD, Ramalho LTO, Andrade Sobrinho J. A importância da porosidade interna do polímero de mamona durante a neoformação óssea - estudo em ratos. *Cienc Odontol Bras*. 2003;6(3):19-25.
- 68 Lucchesi C, Ferreira BM, Duek EA, Santos AR Jr, Joazeiro PP. Increased response of Vero cells to PHBV matrices treated by plasma. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Feb;19(2):635-43.
- 69 Munar ML, Udoh K, Ishikawa K, Matsuya S, Nakagawa M. Effects of sintering temperature over 1,300 degrees C on the physical and compositional properties of porous hydroxyapatite foam. *Dent Mater J*. 2006 Mar 25(1):51-8.
- 70 Brown O, McAfee M, Clarke S, Buchanan F. Sintering of biphasic calcium phosphates. *J Mater Sci Mater Med*. 2010 Aug;21(8):2271-9.
- 71 Gauthier O, Bouler JM, Weiss P, Bosco J, Daculsi G, Aguado E. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. *J Biomed Mater Res*. 1999 Oct;47(1):28-35.

- 72 Aza PN, Aza AH, Aza S. Crystalline bioceramic materials. *Bol. Soc. Esp. Ceram.* 2005;44(3) 135–45.
- 73 Yuasa T, Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Momota Y, Tatehara S, Nagayama M. Effects of apatite cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Biomaterials.* 2004 Mar-Apr;25(7-8):1159-66.
- 74 Wang L, Nancollas GH. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. *Chem Rev.* 2008 Nov;108(11):4628-69.
- 75 Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg.* 1998 Jul;9(4):310-6.
- 76 Verna C, Dalstra M, Wikesjö UM, Trombelli L; Carles Bosch. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis. *J Clin Periodontol.* 2002 Sep;29(9):865-70.
- 77 Santos ML, Florentino AO, Saeki MJ, Aparecida AH, Lia Fook MV, Guastaldi AC. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. *Eclét. Quim.* 2005 30(3):29-35.
- 78 Carlo EC, Borges APB, Moreira JCL, Fonseca CC, Pontes KCS, Duarte TS. Avaliação do efeito osteoindutor da hidroxiapatita e do biovidro implantados em tecido subcutâneo de cão. *Revista Ceres,* 2007; 54(316):492-500.
- 79 Volkmer TM, Santos LA. Influência do tempo de indução nas propriedades de hidroxiapatita porosa obtida por gelcasting de espumas. *Ceram.* 2007 53(328):429-35.
- 80 Barrias CC, Ribeiro CC, Daniel R, Sá Miranda MC, Barbosa MA. Effect of calcium phosphate addition to alginate microspheres: modulation of enzyme release kinetics and improvement of cell adhesion. *Key Eng. Mat.,* 2005;284-286:689-92.
- 81 Fisher JP, Reddi AH. Functional Tissue Engineering of Bone: Signals and Scaffolds. In: Ashammakhi N, Ferretti P, editors. *Topics in Tissue Engineering* 2003. p. 1-29. [09/12/13] Disponível em: http://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e/abstracts/fisher_1.pdf
- 82 Zhang W, Yao D, Zhang Q, Zhou JG, Lelkes PI. Fabrication of interconnected microporous biomaterials with high hydroxyapatite nanoparticle loading. *Biofabrication.* 2010 Sep;2(3):035006.
- 83 Fawcett WJ, Haxby EJ, Male DA. Magnesium: physiology and pharmacology. *Br J Anaesth.* 1999 Aug;83(2):302-20.
- 84 Palacios, C. The role of nutrients in bone health, from A to Z. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2006;46(8):621-8.
- 85 Baker SB, Worthley LI. The essentials of calcium, magnesium and phosphate metabolism: part II. Disorders. *Crit Care Resusc.* 2002 Dec;4(4):307-15.

- 86 Bussière FI, Gueux E, Rock E, Girardeau JP, Tridon A, Mazur A, Rayssiguier Y. Increased phagocytosis and production of reactive oxygen species by neutrophils during magnesium deficiency in rats and inhibition by high magnesium concentration. *Br J Nutr.* 2002 Feb;87(2):107-13.
- 87 Yang L, Perez-Amodio S, Barrère-de Groot FY, Everts V, van Blitterswijk CA, Habibovic P. The effects of inorganic additives to calcium phosphate on in vitro behavior of osteoblasts and osteoclasts. *Biomaterials.* 2010 Apr;31(11):2976-89.
- 88 Roy M, Bose S. Osteoclastogenesis and osteoclastic resorption of tricalcium phosphate: effect of strontium and magnesium doping. *J Biomed Mater Res A.* 2012 Sep;100(9):2450-61.
- 89 Bertinetti L, Tampieri A, Landi E, Martra G, Coluccia S. Punctual investigation of surface sites of HA and magnesium-HA. *J. Eur. Ceram. Soc.,* 2006;26:987-91.
- 90 Jia J, Zhou H, Wei J, Jiang X, Hua H, Chen F, Wei S, Shin JW, Liu C. Development of magnesium calcium phosphate biocement for bone regeneration. *J R Soc Interface.* 2010 Aug 6;7(49):1171-80.
- 91 Braz F, Rahal SC, Rocha NS, Taga E, Biasi F. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. *Acta Cir Bras,* 2003;18(1):19-24.
- 92 Rolim AEH. Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito ósseo crítico, em calvária de rato. [Dissertação], Salvador: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia; 2010.
- 93 Woodard JR, Hilldore AJ, Lan SK, Park CJ, Morgan AW, Eurell JA, Clark SG, Wheeler MB, Jamison RD, Wagoner Johnson AJ. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials.* 2007 Jan;28(1):45-54.
- 94 Carvalho PSP, Bassia APF, Violin LA. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. *Implant News,* 2004; 1(3):255-9.
- 95 Hsiong SX, Mooney DJ. Regeneration of vascularized bone. *Periodontol* 2000. 2006;41:109-22.
- 96 Landi E, Logroscino G, Proietti L, Tampieri A, Sandri M, Sprio S. Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour. *J Mater Sci Mater Med.* 2008 Jan;19(1):239-47.
- 97 Lu J, Descamps M, Dejou J, Koubi G, Hardouin P, Lemaitre J, Proust JP. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *J Biomed Mater Res.* 2002;63(4):408-12.
- 98 Kalita SJ, Bhatt HA. Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2007 May;27(4):837-848.

- 99 Ryu HS, Hong KS, Lee JK, Kim DJ, Lee JH, Chang BS, Lee DH, Lee CK, Chung SS. Magnesia-doped HA/BETA-TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility. *Biomaterials*. 2004 Feb;25(3):393-401.
- 100 Barreto EC. Avaliação *in vivo* do reparo de defeito ósseo com biomaterial do tipo microesferas cerâmicas. [Dissertação]. Salvador: Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia; 2006.
- 101 Cardoso AK, Barbosa Ade A Jr, Miguel FB, Marcantonio E Jr, Farina M, Soares GD, Rosa FP. Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. *Cells Tissues Organs*. 2006;184(3-4):128-37.
- 102 Barreto IC. Utilização de microesferas de hidroxiapatita no reparo de defeitos críticos em calvária de rato. [Dissertação]. Rio de Janeiro/Salvador: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro/Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia; 2008.
- 103 Paula FL. Avaliação *in vivo* de um compósito de hidroxiapatita e alginato no reparo ósseo. [Dissertação] Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2008.
- 104 Barreto IC. Utilização de ranelato de estrôncio associado a biometrias para regeneração óssea. [Tese]. Salvador: Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. 2011.
- 105 Ribeiro IIA. Estudo da implantação *in vivo* de biomateriais compósitos de fosfato de cálcio e polímero. [Dissertação]. Salvador, 2013. Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia; 2013.
- 106 Develioglu H, Saraydin SU, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J*. 2009 Jul;28(4):396-400.
- 107 Frota R, Da Silva-Júnior VA, Teixeira M, Sobral AP, Emanuel-Dias-de Oliveira e Silva, Da Silveira MM, Aragão-Neto AC. Histological evaluation of bone repair using β -tricalcium phosphate. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Mar 1;16(2):e190-4.
- 108 Zong C, Xue D, Yuan W, Wang W, Shen D, Tong X, Shi D, Liu L, Zheng Q, Gao C, Wang J. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. *Eur Cell Mater*. 2010 Sep 1;20:109-20.
- 109 Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986 Apr;(205):299-308.
- 110 Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol*. 2004 May;22(5):560-7.

- 111 Florczyk SJ, Leung M, Li Z, Huang JI, Hopper RA, Zhang M. Evaluation of three-dimensional porous chitosan-alginate scaffolds in rat calvarial defects for bone regeneration applications. *J Biomed Mater Res A*. 2013 Oct;101(10):2974-83.
- 112 Fernández T, Olave G, Valencia CH, Arce S, Quinn JM, Thouas GA, Chen QZ. Effects of calcium phosphate/chitosan composite on bone healing in rats: calcium phosphate induces osteon formation. *Tissue Eng Part A*. 2014 Jul;20(13-14):1948-60.
- 113 Pryor ME, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, April M, Safadi FF, Wikesjö UM. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol*. 2005 Sep;32(9):966-72.
- 114 Marins LV, Cestari TM, Sottovia AD, Granjeiro JM, Taga R. 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*. 2004 Mar;12(1):62-9.
- 115 Maia M, Klein ES, Monje TV, Pagliosa C. Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: revisão de literatura. *Rev. Bras. Cir. Plást*. 2010 Sep;25(3):566-572.

ANEXO

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

COMISSÃO DE ÉTICA NO DE USO DE ANIMAIS

Ofício 03/2013.
Salvador, 05 de novembro de 2013.

O projeto de pesquisa protocolado nesta comissão sob nº 02/2013, intitulado "Avaliação do reparo de defeito ósseo não-crítico com a utilização de hidroxiapatita magnesiana", de responsabilidade do pesquisador Prof. Flávio Borges Miguel foi avaliado segundo os critérios preconizados na lei 11.794/2008 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA - MCT), sendo julgado **APROVADO** em 05 de novembro de 2013 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP). Contendo os seguintes objetivos:

OBJETIVOS:**Geral**

Avaliar, *in vivo*, o reparo tecidual em resposta à implantação de microesferas de hidroxiapatita dopadas com 1% molar de magnésio, em defeito ósseo não-crítico em calvária de rato.

Específicos

- Caracterizar, a biocompatibilidade de microesferas de hidroxiapatita dopadas com 1% molar de magnésio implantadas em defeito ósseo não-crítico, após 15, 45 e 120 dias pós operatório.
- Quantificar, morfometricamente, por microscopia de luz, a neoformação óssea após a implantação das microesferas supracitadas, nos mesmos períodos de observação.

A aprovação contempla a utilização de:

Espécie	Quantidade
<i>Rattus norvegicus</i> da linhagem Wistar	45

Lembramos a necessidade do envio de relatório parcial e final da pesquisa, dentro do cronograma citado no mesmo protocolo.

Prof. Diego Menezes

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (CEUA-EBMSP)