

PEDRO CARVALHO CASSINO

**ANÁLISE DOS POTENCIAIS DE DIFERENTES
HIDROXIAPATITAS EM DEFEITOS ÓSSEOS DE RATOS**

CAMPO GRANDE - MS
2018

Pedro Carvalho Cassino

**ANÁLISE DOS POTENCIAIS DE DIFERENTES HIDROXIAPATITAS
EM DEFEITOS ÓSSEOS DE RATOS**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de doutor.

Orientadora: Profa Dra Iandara Schettert Silva

Linha de pesquisa: Modelo Animal de Doença

CAMPO GRANDE – MS
2018

AGRADECIMENTOS

Em especial agradeço a minha amiga e orientadora professora doutora **Iandara Schettert Silva** pela confiança e ensinamentos de grande importância em minha formação.

A minha família, em especial a minha esposa **Camila Tainá Samúdio Alvarez** pelo incentivo e carinho.

A professora doutora **Luciane Candeloro**, do departamento de Histologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo apoio e colaboração no desenvolvimento do projeto.

Ao professor doutor **Osmar Ignácio Ayala** e ao professor doutor **Antônio Utrera Martines**, do departamento de química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo imenso papel e importância neste projeto com o qual sem os auxílios e ensinamentos não seriam possíveis realiza-los.

Ao professor doutor **Rondon Tosta Ramalho**, pela ajuda, apoio e amizade.

Ao professor doutor **Valter Aragão do Nascimento**, pelo apoio e parcerias.

Aos colegas de **pós-graduação** e ao **programa de pós-graduação** em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste.

RESUMO

CASSINO, P.C. Análise dos potenciais de diferentes hidroxiapatitas em defeitos ósseos de ratos. 37f. 2018 Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2018.

Defeitos ósseos incompletos são modelos para o estudo da regeneração do osso e possuem semelhança com o reparo da fratura, sendo que a diminuição ou ausência destes constitui sério problema ao cirurgião. Ainda que o reparo ósseo seja definido como um fato não isolado. O processo de regeneração tecidual é generalizado, incluindo tanto tecidos moles como os duros. As etapas do reparo normal das feridas de tecidos moles como a sequência de inflamação, fibroplasia e remodelação. Estudos apontam que o gálio tem eficácia no tratamento de diversas doenças, tendo com principal efeito a capacidade de suprimir a reabsorção óssea e conseqüentemente elevar os níveis de cálcio no sangue, além de possuir atividade inibitória nas reabsorções ósseas pela ação nos osteoclastos e sua característica de estimular os osteoblastos, favorecendo a neoformação óssea. A Hidroxiapatita sintética é o biomaterial mais estudado, especialmente por suas propriedades de biocompatibilidade, osteocondução e osteointegração, que aumenta sua similaridade com o tecido, tornando um substituto ao osso, como o enxerto em implantes. Além disso, possui a capacidade de absorver moléculas, excelente condição de suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos, sua elaboração é complexa e necessita de pessoal treinado e especializado para sua obtenção, o desenvolvimento de métodos que descompliquem e facilitem os métodos de elaboração, fornecendo um material de fácil acesso e preço são fundamentais para utilização da técnica. Em conclusão observamos que os diferentes tipos de hidroxiapatita elaborados neste trabalho, propiciaram a cicatrização óssea pela confirmação histopatológica em graus variáveis de acordo com o mineral escolhido para dopagem, mostrando uma correlação positiva.

Palavras-Chave: Hidroxiapatita, Gálio, Estrôncio, Biomateriais.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Acesso cirúrgico de tíbia. A) Defeito ósseo de 3,5 mm em membro pélvico esquerdo de rato. B) Preenchimento do defeito ósseo com Hidroxiapatita dopada com Estrôncio.....22
- Figura 2: Grupo controle. A) Aumento em objetiva de 10x, imagem de osso secundário (OS) do grupo controle, com áreas de osso primário (OP), osso secundário (OS) e medula óssea (MO). B) Aumento em objetivo de 40x, imagem em grande aumento de osso primário do grupo controle. Fileiras de osteoblastos inativos (setas finas) e osteoblastos ativos (cabeças de setas).23
- Figura 3: Grupo HAP. A) Aumento em objetiva de 10x, imagem de corte transversal de osso secundário do grupo hidroxiapatita. Note a peça de cartilagem hialina (CH); osso primário em formação (OP) dentro do canal medular, próximo à medula óssea (MO) e osso secundário (OS). Região com defeito ósseo (DO). B) Aumento em objetiva de 10x, imagem em grande aumento de tecido conjuntivo do grupo de hidroxiapatita com células gigantes de corpo estranho (seta branca).....24
- Figura 4: Grupo SR. A) Aumento em objetiva de 10x, imagem de corte transversal de osso secundário do grupo estrôncio. Note a peça de cartilagem hialina (CH); osso primário em formação (OP) dentro do canal medular, próximo à medula óssea (MO) e osso secundário (OS). B) Aumento em objetiva de 40x, Imagem em grande aumento de osso primário do grupo estrôncio. Osteoclasto (setas) e fileiras de osteoblastos ativos (cabeça de seta).25
- Figura 5: Grupo GA. A) Aumento em objetiva de 10x, imagem de corte transversal de osso secundário do grupo gálio. Note a peça de cartilagem hialina (CH); osso primário em formação (OP) dentro do canal medular, próximo à medula óssea (MO) e osso secundário (OS). Região com defeito ósseo (DO). B) Aumento em objetiva de 40x, imagem em grande aumento de osso primário do grupo gálio. Osteoclastos (setas).25
- Figura 6: Letras distintas comparadas entre colunas apresentam diferença estatística significativa (a, b significa $p < 0,01$) (c, d significa $p < 0,05$). Após confirmação da normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, foi aplicado o teste de variância ANOVA de um critério para verificar se havia diferença estatística e o teste de Tukey para mostrar onde estavam as diferenças. G1: grupo controle, sem

biomaterial; G2: grupo que recebeu hidroxiapatita; G3: grupo que recebeu hidroxiapatita e gálio; G4: grupo que recebeu estrôncio.26

LISTA DE ABREVIATURAS

mm	milímetros
mg	miligramas
Mg	magnésio
Kg	quilogramas
g	gramas
w	watt
Sr	estrôncio
K	potássio
Zn	zinco
Na	sódio
Ga	Gálio
Å	Angstron

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 O tecido ósseo	10
2.2 Os substitutos ósseos	12
2.2.1 A hidroxiapatita	13
2.2.2 O gálio	14
2.2.3. O estrôncio	15
2 OBJETIVO.....	17
2.1 Geral	17
2.2 Específico	17
3.1 Confecção dos Materiais.....	18
3.1.1 Hidroxiapatita	18
3.1.2 Hidroxiapatita com estrôncio.....	18
3.1.3 Hidroxiapatita com Gálio.....	19
3.2 Animais	20
3.3 Procedimentos Cirúrgicos	21
4 RESULTADOS	23
5 DISCUSSÃO.....	27
CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1 INTRODUÇÃO

O reparo de um defeito ósseo é definido como um fato não isolado. O processo de regeneração tecidual é generalizado, incluindo tanto tecidos moles como os duros. Estes tecidos moles por sua vez em determinados tipos de fraturas agem como o meio provedor de nutrição, aporte sanguíneo e conseqüentemente oxigenação, sendo de fundamental importância sua preservação no tratamento de fraturas.

As etapas do reparo normal das feridas de tecidos moles como as fases de inflamação, fibroplasia e remodelação, esta sequência também acontece durante o reparo do tecido ósseo, porém associada à atividade de osteoblastos e osteoclastos. Estes atuam ativamente na reparação e remodelação do tecido ósseo danificado (MARTINS, 2001).

Analisando que o propósito deste reparo ósseo é restaurar a continuidade entre as margens da lesão, reestabelecendo as características morfofuncionais do órgão ou tecido afetado. No processo de reparo, as células progenitoras indiferenciadas têm papel fundamental, elas determinam uma série de eventos que tendem a conter o dano. Também preparam as células de reserva, que mantiveram a sua vitalidade diante a injúria (SIQUEIRA JÚNIOR e DANTAS, 2000).

Reparo dessas fraturas é um desafio para a ortopedia e defeitos ósseos incompletos são modelos para estudos de regeneração óssea e possuem semelhança com o reparo que ocorre fisiologicamente, sendo que a ausência ou diminuição destes processos constituem um sério problema ao cirurgião e ao paciente (SASSIOTO, 2009).

Partindo deste conceito, todo e qualquer processo que possibilite, um aumento da resposta tecidual, preservação do tecido adjacente, menor invasividade e reação tecidual, propiciando uma rápida resposta do organismo frente a esta injúria de grande interesse de estudos, e que propiciem menor tempo de recuperação e retorno mais rápido as atividades, são desejáveis.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O tecido ósseo

Nos vertebrados, o sistema musculoesquelético é composto de tecidos conjuntivos especializados que, juntos, ditam a forma geral do corpo e fornecem a infra-estrutura básica de movimento e locomoção. Além disso, o esqueleto axial e a caixa torácica fornecem invólucros protetores para o sistema nervoso central e para as vísceras torácicas, respectivamente (BLISS; RAWLINSON; TODHUNTER, 2012).

O esqueleto também é um repositório de minerais e desempenha um papel importante na homeostase do cálcio, a hematopoiese pós-natal ocorre em sua maioria dentro das cavidades medulares de ossos longos, e trabalhos recentes revelaram interações regulatórias complexas e importantes entre células de revestimento ósseo e elementos do sistema hematopoiético, indicando que este ambiente hematopoiético ósseo é mais do que simplesmente um compartimento anatômico (PORTER & CALVI, 2008).

Os ossos variam muito em forma entre espécies, mas sua arquitetura molecular é sempre conservada. Nos indivíduos adultos, o osso ocorre predominantemente em duas formas. O osso cortical ou compacto que é composto por unidades Haversianas cilíndricas, longitudinalmente orientadas e sobrepostas, compostas por um canal Haversiano central circundado por lamelas ósseas dispostas concentricamente, e o osso trabecular ou esponjoso que está localizado principalmente nas regiões metafisárias ou projetado no canal medular, sendo constituído de hastes finas e interconectadas, placas e suportes sendo estas chamadas de trabéculas (BLISS; RAWLINSON; TODHUNTER, 2012).

Os principais tipos celulares do osso incluem osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. As atividades dessas células são temporais e espacialmente coordenadas durante o crescimento, remodelação e reparo do osso. Esse grupo de células é denominado unidade básica multicelular (SIMS & GOOI, 2008).

Osteoblastos residem dentro das membranas periosteal e endosteal, eles são responsáveis pela biossíntese dos componentes da matriz óssea e também expressam uma ampla variedade de fatores de crescimento e mediadores osteogênicos. Sua atividade é regulada por uma ampla quantidade de fatores

extracelulares, como os hormônios circulantes, fatores autócrinos e parácrinos, citocinas e quimiocinas. Os osteócitos são osteoblastos terminalmente diferenciados que se tornaram envoltos em matriz óssea durante a osteossíntese (BLISS; RAWLINSON; TODHUNTER, 2012).

Os osteoclastos são grandes células multinucleadas que derivam de precursores hematopoiéticos da linhagem monocítica e são responsáveis pela desmineralização e degradação proteolítica da matriz óssea. A formação e a atividade dos osteoclastos são rigidamente reguladas (BALLARINI et al., 2005).

O osso é um tecido notório e muito complexo, todos os animais necessitam de locomoção seja ela para busca de alimentos, fuga, caça, etc. Isso predispõem que forças atuem no osso, como impactos, altas forças de carga, rotações, entre outras, as características fisiológicas ósseas permitem que ele resista a maioria destas forças, porém quando elas ocorrem de forma abrupta ou devido a impactos de alta energia o osso pode fraturar (CROSS, 2012).

Albuquerque e colaboradores (2012) aponta que o trauma constitui, atualmente, um grave problema de saúde pública, uma vez que é responsável por importante parcela dos atendimentos hospitalares em todo o mundo. Dos pacientes vítimas de trauma fechado, 85% sofrem lesão do sistema músculo-esquelético, sendo que a grande maioria destes pacientes procura assistência médica nas emergências.

De acordo com Bortolon, Andrade e Andrade (2011) no Brasil o custo direto do episódio agudo com hospitalização foi estimado em US\$ 5.500 por paciente, entre 1980 e 2003. As despesas das mulheres acima de 50 anos internadas no Sistema Único de Saúde (SUS), em 2001, por fratura de fêmur, chegaram a R\$ 1.700,00.

Fraturas são bons modelos de estudo, porém, devido a variáveis metodológicas o uso de defeitos ósseos experimentais são usados na rotina de pesquisas. Alguns aspectos devem ser respeitados, como o tamanho determinado, para que não ocorra reparo espontâneo, pois somente em dadas condições o potencial osteogênico do implante, o enxerto ou medicamento pode ser considerado real (ALMEIDA, 2006).

A reparação óssea após uma fratura ocorre através da formação de um osso novo. Este processo é composto por seis estágios distintos e que se complementam:

hemostasia e formação do hematoma; organização do tecido de granulação; formação do calo fibroso; formação do calo ósseo primário; formação do calo ósseo secundário; reconstrução funcional da estrutura (MARTINS, 2001).

Analisando que o propósito deste reparo tecidual é restaurar a continuidade entre as margens da lesão, reestabelecendo as características morfofuncionais do órgão ou tecido afetado. No processo de reparo, as células progenitoras indiferenciadas têm papel fundamental, elas determinam uma série de eventos que tendem a conter o dano. Também preparam as células de reserva, que mantiveram a sua vitalidade diante a injúria (SIQUEIRA JR e DANTAS, 2000).

Reparo dessas fraturas é um desafio para a ortopedia. E defeitos ósseos incompletos são modelos para estudos de regeneração óssea e possuem semelhança com o reparo que ocorre fisiologicamente, sendo que a ausência ou diminuição destes processos constituem um sério problema ao cirurgião e ao paciente (SASSIOTO, 2009).

2.2 Os substitutos ósseos

Os substitutos ósseos são biomateriais que, com o próprio nome refere, possuem a finalidade de melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou totalmente, tecido ou órgãos. No entanto, esses biomateriais devem apresentar algumas características para que seu uso clínico possa ser considerado seguro e eficaz, como: biocompatibilidade, integração com o tecido a ser substituído ou reparado, ser quimicamente inerte, ser capaz de manter a forma e ter um comportamento preditivo ao longo do tempo (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). Além disso, estes biomateriais devem ser, quando absorvíveis, obrigatoriamente metabolizados e excretados por vias fisiológicas do organismo, sem a permanência de resíduos no hospedeiro (CALCAGNOTTO, 2009).

Segundo Pires, Bierhalz, Moraes (2015) são vários os materiais usados para o preenchimento dos defeitos ósseos, os biomateriais, que podem ser substâncias puras ou compostas, e de natureza sintética ou natural, sendo de origem artificiais os mais usados na área ortopédica para substituir os tecidos orgânicos que deixam de apresentar função. São considerados como biomateriais os metais inertes (titânio

e platina), as cerâmicas (hidroxiapatita) e os polímeros (politetrafluoretileno, polietileno, poliéster e silicone).

O comportamento de biomateriais, de acordo com a interface com o tecido hospedeiro, pode ser classificado como inerte, quando não interage quimicamente ou biologicamente com o hospedeiro; poroso, quando ocorre o crescimento do tecido fisiológico para o interior do material implantado; bioativo, ocorrendo forte ligação químico-física entre o tecido ósseo e implante e bioabsorvível, que é o caso dos cimentos à base de fosfato de cálcio, nos quais o material é degradado e substituído por tecido ósseo (HENCH, 1998).

Os enxertos autógenos são os melhores materiais para preenchimento dos defeitos ósseos, devido às suas propriedades de osteogênese, osteoindução e osteocondução. No entanto, apesar de suas limitações como a morbidade cirúrgica, causada pelo trauma na área doadora, limitação de quantidade de enxerto e a reabsorção irregular no leito receptor. Dessa forma, pesquisas buscam evidenciar materiais capazes de substituir o tecido ósseo e promover adequada reconstrução anatômica após traumas e cirurgias (BLISS; RAWLINSON; TODHUNTER, 2012).

Diversos materiais sintéticos foram desenvolvidos nos últimos anos e muitos estudos envolveram o uso dos compostos de fosfato de cálcio, principalmente pela similaridade com a fase mineral dos tecidos duros do organismo e excelente biocompatibilidade. Atualmente os mais estudados são tricálcio fosfato e a hidroxiapatita. Tais materiais exibem importantes propriedades de osteocondução e são capazes de promover uma interação direta com o tecido ósseo, sendo classificados como bioativos. Estando disponíveis no mercado na forma de blocos ou partículas, densos ou porosos (CORSETTI et al., 2008).

O osso é uma estrutura formada por apatita, oxofosfato de cálcio e proteína fibrinosas do colágeno, o que permitiu que o organismo obtivesse certas vantagens de locomoção e ao mesmo tempo uma reserva de cálcio e fósforo que permanecem em troca contínua (BLISS; RAWLINSON; TODHUNTER, 2012).

2.2.1 A hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) sintética é o biomaterial mais estudado, especialmente por suas propriedades de biocompatibilidade, osteocondução e osteointegração (FU et al., 2018), que aumenta sua similaridade com o tecido, tornando um substituto ao osso, como o enxerto em implantes (CONSTANTINO et al, 1991).

A HA é o principal constituinte mineral dos ossos e dos dentes; representa em média de 30 a 70% da massa óssea. No seu estado natural é precariamente cristalina. Os cristais têm formas de agulhas, bastonetes ou placas que medem aproximadamente 30 a 50 Å de largura e até 600 Å de comprimento. Está presente em quantidades maiores no tecido jovem, recém-formado (40 a 50%) do que no osso de maior idade biológica, ou seja, modificado com amadurecimento do organismo (25 a 30%) (MALZAC, 2008).

O principal sólido do osso e do dente contendo Ca e P é uma hidroxiapatita com a fórmula estequiométrica $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, que às vezes, com base nas considerações cristalográficas, é escrito também como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Frequentemente, o osso também é apresentado através do modelo do fosfato octocálcio com a fórmula $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6\text{H}_2\text{O}$. Na hidroxiapatita de origem biológica, a proporção teórica Ca: P é 1,67, mas na realidade este valor é raramente mantido constante. Assim, as composições ainda estáveis podem ter esta razão reduzida até aproximadamente 1,5 e estendida até 1,72 (MALZAC, 2008).

A estrutura porosa deste biomaterial permite as trocas isomorfas com maior facilidade. O Ca^{2+} pode ser substituído por metais com raios iônicos compatíveis como o Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , etc. Deste modo podem ser obtidos tanto os compostos individuais como, soluções sólidas de substituição. Tendo em vista isso pesquisas têm buscado alternativas viáveis com uso de aditivos que estimulem a osteossíntese (MELNIKOV & GONCALVES, 2015).

2.2.2 O gálio

O gálio possui conhecida propriedade anabólica no tecido ósseo, especialmente onde ocorrem os processos de formação e remodelação. Observações clínicas sugerem que interfere na reabsorção óssea, reduzindo sua

taxa de dissolução, pela inibição na atividade dos osteoclastos (MELNIKOV; MALZAC; COELHO, 2008).

O Gálio parece ser um agente que atua unicamente no tratamento de doenças reabsortivas do osso, reduzindo perda óssea acelerada em pacientes com câncer e doença óssea metabólica. O conceito de usar certas medidas terapêuticas como adjuvantes ao tratamento tradicional anticâncer para fortalecimento do tecido ósseo frente à erosão devido às metástases (WARREL et al., 1993).

Além de atuar diretamente sobre os osteoclastos, o gálio pode, com base em evidências experimentais, inibir a formação e reabsorção óssea estimulada através da ação sobre os osteoblastos (WARREL et al., 1993). Evidências de estudos in vivo para melhora da formação óssea sugerem que é devido à formação óssea acentuada e aumento do teor de cálcio do osso em ratos tratados com nitrato de gálio (MELNIKOV; MALZAC; COELHO, 2008).

2.2.3. O estrôncio

O estrôncio (Sr) é um oligoelemento de rastreamento ósseo com efeitos duplos no metabolismo, sendo descrito que age promovendo a proliferação e diferenciação das células osteoprogenitoras, porém com efeito inibitório na diferenciação terminal dos osteoclastos (HUANG et al., 2018). Além de apresentar estas propriedades, pesquisas tem demonstrado que o estrôncio que a sua incorporação melhora a osteoindutividade de implantes ósseos diferentes, como ligas de titânio, vidros bioativos e cerâmicas YUNFENG et al., 2010).

Por ser um componente natural dos ossos e pelo poder de promover a formação de tecido osteóide e auxiliar o crescimento ósseo. O uso de estrôncio em baixas doses pode, de acordo com pesquisas, promover a síntese e o metabolismo ósseo e atualmente são usados clinicamente com objetivo de promover a formação de osteóide e tratar a osteoporose (AARON et al., 2017).

Além disso, é bem conhecido que o estrôncio foi aprimorado para aumentar a proliferação de osteoblastos, promover a formação de osso novo e a osseointegração, e prevenir dissolução óssea. Portanto, o Sr é uma adição admirável para melhorar a bioatividade e a indução óssea da hidroxiapatita (HA),

sendo que estudos apontam que ao substituir o Ca^{2+} por Sr^{2+} na HA pode não apenas alterar a descrição desta, mas também melhorar a mecânica de crescimento do cristal (GE et al., 2018).

Ambas as formas de apatita dos fosfatos de cálcio e estrôncio se assemelham bastante com a estrutura mineral do tecido ósseo e dentário que, em seu estado fisiológico, compreende prismas hexagonais de $\text{Ca}(\text{Sr})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, e é essa similaridade com estas estruturas que propicia uma maior facilidade na integração com o componentes minerais de osso e dentes. Em particular, a hidroxiapatita de estrôncio (HAPSr) serve como uma alternativa viável quando há osso osteoporótico e oferece integridade estrutural nas fraturas associadas à desmineralização óssea (RAUCCI et al., 2015).

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Análise dos potenciais terapêuticos de hidroxiapatita de baixa pureza, hidroxiapatita dopada com gálio e hidroxiapatita dopada com estrôncio, utilizadas para a correção de defeitos ósseos de ratos.

2.2 Específico

Estudar os efeitos do uso de hidroxiapatita de baixa pureza da hidroxiapatita dopada com gálio e estrôncio em defeitos ósseos de ratos;

Comparar os resultados obtidos com uso dessas materiais quanto ao reparo ósseo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais – CEUA, da Universidade do Federal de Mato Grosso do Sul, pelo protocolo número 723/2015. Foram utilizados quatro grupos tratados com três diferentes hidroxiapatitas, sendo uma em seu padrão original, outra dopada com gálio e uma com estrôncio, oriundas do Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, e um que será apenas o controle.

3.1 Confeção dos Materiais

3.1.1 Hidroxiapatita

Foi preparada pelo Instituto de Química de UFMS uma solução de hidróxido de cálcio foi preparada utilizando 18,52 g de Ca(OH)_2 em 500 mL de água destilada. Foram diluídos 10 mL de ácido fosfórico em 300 mL de água destilada. a uma taxa de duas gotas por segundo a 40°C em pH=7,5, mantido constante por meio da adição de hidróxido de amônio. Em seguida, o material obtido foi lavado com água destilada e a ele foi adicionado 1mmol/l de ácido fosfórico, esta solução foi envelhecida por uma noite. O pó sintetizado foi calcinado a 700°C, Estes volumes correspondem a uma relação de 5:3 entre o Ca(OH)_2 e o H_2PO_3 .

O material obtido então foi macerado em cadinho de amalgama, e seco em estufa a 45 °C, sendo o mesmo submetido a teste para confirmação da obtenção da amostra.

3.1.2 Hidroxiapatita com estrôncio

Para este estudo, utilizou-se Hidroxiapatita dopada com estrôncio, esse produto foi obtido pelo Instituto de Química da UFMS, sendo o método de confecção preconizado por Melnikov e Gonçalves (2015), descrito e realizado como segue.

Os materiais de partida utilizados foram hidrogenofosfato de di-amônio (NH_4) 2HPO_4 e hidróxido de estrôncio octahidratado $\text{Sr(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, ambos de pureza de grau analítico adquiridos da Merck e Sigma-Aldrich, respectivamente. Síntese de hidroxiapatita de estrôncio: A hidroxiapatita hidratada contendo estrôncio foi

preparada por meio de uma reação química entre $\text{Sr}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. A síntese foi realizada em uma escala de 10 g. As quantidades exatas de materiais de partida foram 5,35 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e 17,94 g de $\text{Sr}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, misturados de modo a obter a razão Sr: P $\frac{1}{4}$ 1,66, que é característico da hidroxiapatita. Após uma moagem completa, foram adicionadas 2-3 gotas de água a essa mistura estequiométrica. Essa água atua como um catalisador, e uma vez que a reação química começa, continua espontaneamente à temperatura ambiente.

Assim, o processo pode ser considerado como uma precipitação de dissolução semelhante às configurações dos cimentos. Para absorver fumos amoníacos e umidade, a mistura foi mantida em um dessecador de vácuo sobre H_2SO_4 concentrado até atingir um peso constante.

A perda média de massa experimental, após 10 dias, foi de 50,8%. Assim, o rendimento absoluto do produto final foi de 4,903 g. No que diz respeito ao mecanismo de reação, podemos assumir que, no início do processo, a água inicial dissolve o hidróxido de estrôncio, tornando-se dissociado em Sr^{2+} e 2OH^- .

Imediatamente, esses íons começam a reagir com cristais iônicos de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ que produzem SrHA, hidróxido de amônio e água. Essa água secundária é usada para dissolver mais $\text{Sr}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, o processo segue tendo como final a remoção tanto da amônia quanto da água, sendo esse processo o fim da reação. Em contraste com uma série de reações para sintetizar SrHA, a técnica por si só fornece umidade suficiente para obter o desejado produto hidratado. A perda teórica de massa de 51,8% corresponde à formação de decaidrato $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 10\text{H}_2\text{O}$.

3.1.3 Hidroxiapatita com Gálio

De acordo com protocolo proposto por trabalho de Malzac em 2008, foi realizada a confecção de uma amostra de hidroxiapatita dopada com gálio pelo Instituto de Química (INQUI – UFMS), sendo o seu método de elaboração usamos o sal de gálio para se obter este composto, seguindo o esquema em 100 ml de água destilada foram dissolvidos 41,37 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (solução 1). Em 50 ml de água destilada foram dissolvidos 0,26 g de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (solução 2). Em 75 ml de água destilada foram dissolvidos 9,90 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (solução 3). Sendo que

anteriormente foi estabelecido que o coeficiente x do hidrato $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, corresponde a ~ 6 .

Após esta etapa foi misturada a solução 1 e 2 obtendo um volume de 100 ml (solução 4), misturando em seguida as soluções 3 e 4 rapidamente formando imediatamente uma massa volumosa coloidal (solução 5).

A massa branca coloidal (solução 5) foi adicionado hidróxido de amônio até o pH entre 10 – 11. A solução de NH_4OH gotejava-se de uma bureta, sendo consumidos um total aproximado de 4 ml. Esta solução (5) foi aquecida sob agitação durante 2 horas a 40°C , logo se deixou em repouso durante 20 horas para permitir uma melhor cristalização. O precipitado cristalino acumulou-se no fundo deixando um sobrenadante límpido.

Após este processo a solução foi novamente aquecida sob agitação a 95°C durante 3 horas. O precipitado foi separado por filtração de funil a vácuo e lavado cinco vezes no próprio funil. O funil com o precipitado foi colocado em um dessecador que continha aproximadamente 20 ml de nitrogênio líquido, para evitar contato com CO_2 do ar ambiente, evitando assim a formação indesejada de carbonatoapatita.

Decorrido um período de 24 horas no dessecador foi introduzida uma capsula de P_2O_5 com a intenção de desidratar o material. Após um novo período de espera de 24 horas a capsula foi substituída por outra que continha P_2O_5 fresco para completar o processo de secagem a temperatura ambiente.

No final do processo de confecção do material deixou-se secar em uma estufa a 60°C até obter a massa constante, após este processo o material foi aquecido a 1100°C durante três horas.

3.2 Animais

Os animais foram confinados em gaiolas individuais, forradas com maravalha de pinho, trocadas sempre no período matutino e a cada 24 horas para minimizar o odor e contato dos animais com as fezes e urina. Durante todo o processo experimental os animais serão mantidos em fotoperíodo sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura ambiente próxima a 23°C , ruídos mínimos, ração

sólida e água “ad libitum”, ficando por um período de dois dias para aclimatação antes do experimento.

Foram utilizados 40 ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos adultos, com aproximadamente 250-300 gramas, fornecidos pelo biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, estes animais são utilizados para experimentos após o terceiro mês de vida.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos de dez animais, através de sorteio, sendo que em três grupos foram utilizados materiais e um outro que será o controle.

No primeiro grupo, o defeito receberá a hidroxiapatita (HA) dopada com gálio; para o segundo o defeito será preenchido com HA e estrôncio; o terceiro terá HA em sua forma pura; e o quarto foi o grupo controle que não recebeu nenhum tipo de substância. Todos os grupos foram submetidos a um tempo de análise de sete dias.

3.3 Procedimentos Cirúrgicos

Após jejum alimentar de seis horas e hídrico de duas horas, em todos os animais, estes foram submetidos a anestesia dissociativa com cloridato de cetamina 2% (Cetamin® - Syntec), na dose de 0,25 mg/100g, em associação com cloridato de xilazina (Rumpum® - Bayer), na dose de 0,3 mg/100g, sendo calculada, individualmente, conforme o peso de cada animal e administrado por via intraperitoneal (SCHANAIDER & SILVA, 2004). A dosagem da solução injetada foi de 0,1 ml para cada 100 gramas de peso vivo de cada animal, utilizando-se seringa de 1 ml e agulha hipodérmica calibre 25x7. Sob técnica asséptica, o paciente em decúbito lateral esquerdo, foi realizada incisão da pele, na face crânio-medial da tíbia, com aproximadamente, 1 cm de extensão, para confecção do defeito ósseo.

Após o acesso ao perióstio e posteriormente ao osso, foi realizado o processo de perfuração com auxílio de uma microretífica (DREMEL® 3000) com 120 W a 33000 rotações por minuto, equipada com broca DREMEL® modelo 191 com 3,5 mm (figura 01) e irrigada constantemente com solução de Ringer Lactato, sendo que, posterior a confecção do defeito, foi aplicado o material, com o auxílio de uma espátula, em animais previamente sorteados. O defeito ósseo produzido estendia-se

do periósteo até o canal medular, apenas um membro de cada animal foi operado, para evitar a possibilidade de ocorrência de fraturas patológicas e pelo fato de não ser descrito influencia sistêmica dos substitutos utilizados.

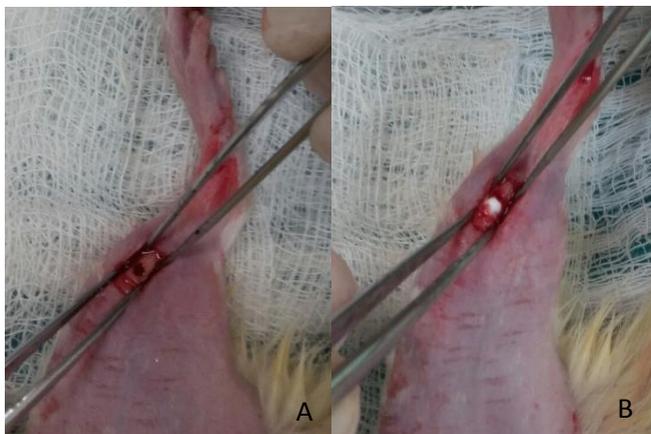


Figura 1: Acesso cirúrgico de tíbia. A) Defeito ósseo de 3,5 mm em membro pélvico esquerdo de rato. B) Preenchimento do defeito ósseo com Hidroxiapatita dopada com Estrôncio.

Após confecção do defeito, sendo certificado o controle hemostático, realizou-se sutura simples na pele (náilon 4-0) padrão simples separado, os animais ficaram em observação por um período de vinte e quatro horas, sendo neste intervalo administrado 0,1 ml/animal de anti-inflamatório (Flunixinina – Meglunina, Banamine®, Shering-Plough) via intramuscular.

Após sete dias de pós-operatório, a eutanásia foi realizada com dose letal de Tiopental Sódico 100 mg/kg via intraperitoneal. Após a coleta das tíbias, que foram removidas por incisão na cicatriz cirúrgica, acompanhadas de tecidos muscular (a fim de não remover resquícios de material adjacente). Os ossos obtidos foram adequadamente identificados e avaliados quanto ao aspecto macroscópico e acondicionados em frascos contendo formol 10%.

As amostras foram submetidas à descalcificação e posteriormente confeccionadas lâminas de histopatologia, coradas com hematoxilina-eosina, a fim de avaliar as características morfológicas e celulares de cada animal, verificando processos inflamatórios, áreas de necrose, presença de osteoclastos e osteoblastos, presença do material, presença de células brancas, neovascularização e neoformação óssea.

4 RESULTADOS

A análise histológica foi realizada por um patologista experiente, em ensaio cego, que revelou no grupo controle foram observadas, perifericamente ao osso secundário (maduro), a presença de osso primário com espessura que variou de fina a espessa, apresentando trabéculas ósseas com fileiras de osteoblastos pavimentosos e não foi observado osteoclastos, o que mostra que este tecido não estava sob remodelação óssea. Não foram observadas células gigantes de corpo estranho, o que é coerente, uma vez que não foi utilizado nenhum enxerto com biomaterial (Figura 02). O Tecido conjuntivo associado ao tecido ósseo (por fora das bordas da área de lesão) se mostrou menos celularizado, o que indica menor grau de remodelação tecidual. Na região central do canal medular, podem-se observar em algumas amostras do mesmo grupo pequenas áreas de tecido ósseo primário (osso trabecular) misturados com a medula óssea, enquanto em outras amostras só foi observado medula óssea vermelha no interior do canal medular.

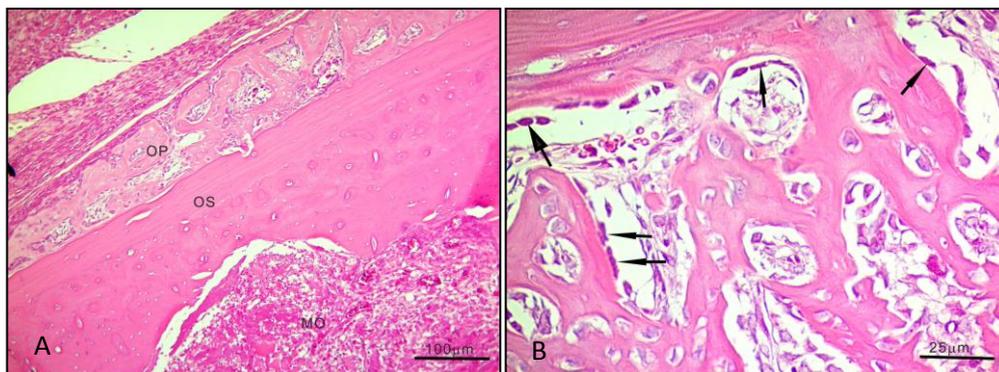


Figura 2: Grupo controle. A) Aumento em objetiva de 10x, imagem de osso secundário (OS) do grupo controle, com áreas de osso primário (OP), osso secundário (OS) e medula óssea (MO). B) Aumento em objetiva de 40x, imagem em grande aumento de osso primário do grupo controle. Fileiras de osteoblastos inativos (setas finas) e osteoblastos ativos (cabeças de setas).

Nos grupos: HAP (com enxerto do biomaterial de hidroxiapatita pura) (Figura 03), SR (com enxerto do biomaterial de hidroxiapatita e estrôncio) e GA (com

enxerto do biomaterial de hidroxiapatita e gálio) podem ser observar uma camada mais espessa de osso primário (trabecular) ao redor do osso secundário. Nesta região de osso trabecular, observamos a presença de osteoblastos cúbicos e colunares, além da de osteoclastos, o que indica neoformação com remodelação óssea. Também observamos células gigantes de corpo estranho envolta de um material amorfo, próximos à borda da lesão.

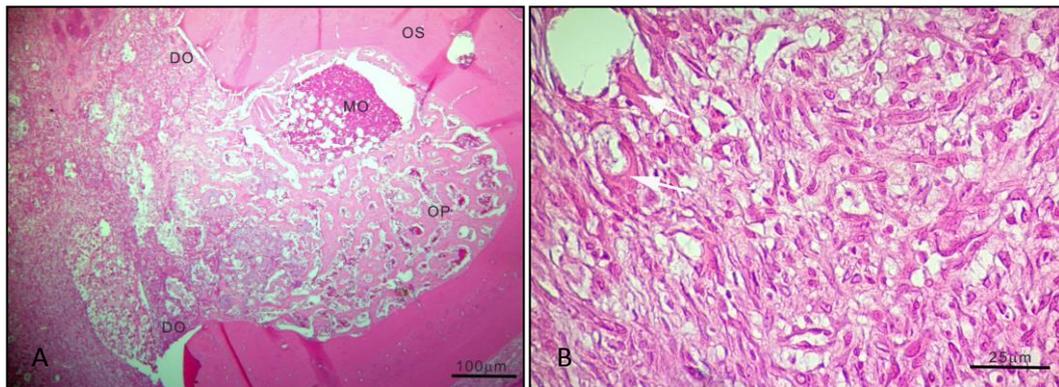


Figura 3: Grupo HAP. A) Aumento em objetiva de 10x, imagem de corte transversal de osso secundário do grupo hidroxiapatita. Note a peça de cartilagem hialina (CH); osso primário em formação (OP) dentro do canal medular, próximo à medula óssea (MO) e osso secundário (OS). Região com defeito ósseo (DO). B) Aumento em objetiva de 10x, imagem em grande aumento de tecido conjuntivo do grupo de hidroxiapatita com células gigantes de corpo estranho (seta branca).

Em relação ao tecido conjuntivo ao redor do osso (por fora das bordas da lesão) os grupos HAP e GA apresentaram-se muito celularizado, indicando intensa remodelação tecidual. Já no grupo SR não foi observado tecido conjuntivo tão celularizado (Figura 04). Nos grupos HAP e GA, o interior do canal medular apresentava-se preenchido com bastante tecido ósseo primário (trabecular) entre células da medula óssea. Já no grupo SR o canal medular se encontrava com menos osso primário e com a medula óssea mais organizada.

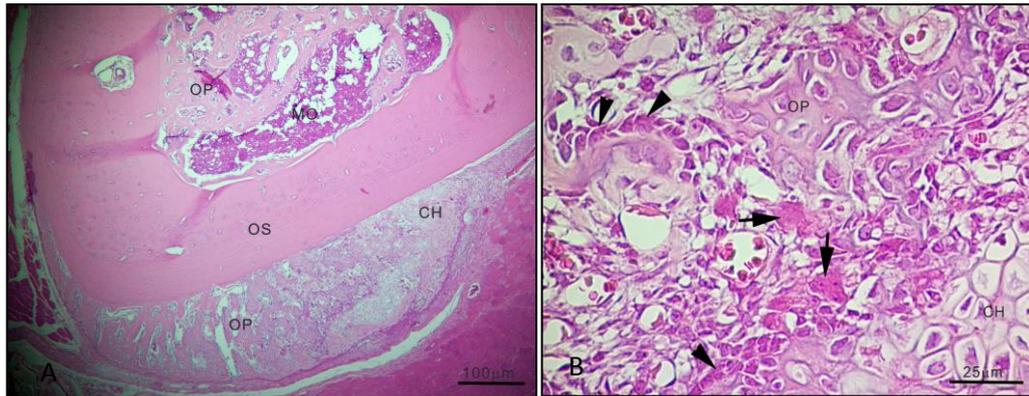


Figura 4: Grupo SR. A) Aumento em objetiva de 10x, imagem de corte transversal de osso secundário do grupo estrôncio. Note a peça de cartilagem hialina (CH); osso primário em formação (OP) dentro do canal medular, próximo à medula óssea (MO) e osso secundário (OS). B) Aumento em objetiva de 40x, Imagem em grande aumento de osso primário do grupo estrôncio. Osteoclasto (setas) e fileiras de osteoblastos ativos (cabeça de seta).

Além de se ter sido observado osso trabecular envolta do osso secundário, nos grupos GA (Figura 05) e SR, observou-se uma grande área de cartilagem hialina associado ao osso trabecular, o que indica a grande possibilidade de ossificação endocondral, por possuir muitos condrócitos se proliferando e produzindo muito matriz cartilaginosa, de modo que possa ocorrer mais formação de osso trabecular em cima da matriz cartilaginosa, o que sugere que nestes tratamentos poder haver uma maior remodelação óssea por ossificação endocondral em relação aos demais grupos.

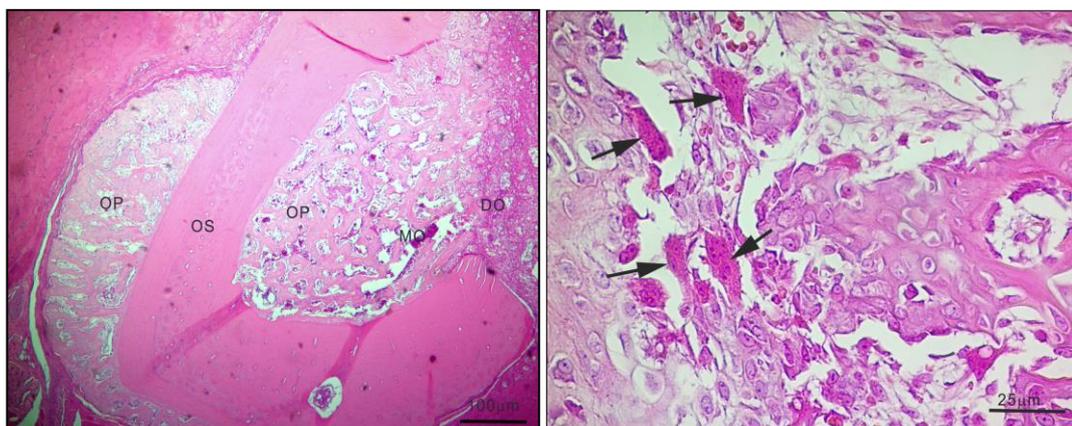


Figura 5: Grupo GA. A) Aumento em objetiva de 10x, imagem de corte transversal de osso secundário do grupo gálio. Note a peça de cartilagem hialina

(CH); osso primário em formação (OP) dentro do canal medular, próximo à medula óssea (MO) e osso secundário (OS). Região com defeito ósseo (DO). B) Aumento em objetiva de 40x, imagem em grande aumento de osso primário do grupo gálio. Osteoclastos (setas).

A fim de se obter um valor que pudesse ser tabulado, foi proposto a medição da maior área do calo ósseo, para posterior mensuração e comparação, sendo que, o comprimento da área do osso primário (mm) (Figura 06) no grupo controle foi de 15.13 ± 97.39 , no grupo que recebeu a hidroxiapatita de baixa pureza obteve um valor de 49.55 ± 19.60 , os animais tratados com SR os valores foram de 36.83 ± 12.23 e no grupo GA os comprimento ósseo em mm foi de 48.74 ± 10.13 . Após confirmação da normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, foi aplicado o teste de variância ANOVA de um critério para verificar se havia diferença estatística e o teste de Tukey. Onde foi constatado que entre o grupo controle e os tratados o $p < 0,01$, e entre os grupos que receberam os materiais o $p < 0,05$.

Comprimento da área (mm) de Osso primário após tratamento com biomateriais.

Comprimento da área de osso primário (mm)	G1 Controle	G2 HAP	G3 HAP+Ga	G4 Sr
	15.13 ± 97.39^a	$49.55 \pm 19.60^{b,c}$	$48.74 \pm 10.13^{b,c}$	$36.83 \pm 12.23^{b,d}$

Figura 6: letras distintas comparadas entre colunas apresentam diferença estatística significativa (a, b significa $p < 0,01$) (c, d significa $p < 0,05$). Após confirmação da normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, foi aplicado o teste de variância ANOVA de um critério para verificar se havia diferença estatística e o teste de Tukey para mostrar onde estavam as diferenças. G1: grupo controle, sem biomaterial; G2: grupo que recebeu hidroxiapatita; G3: grupo que recebeu hidroxiapatita e gálio; G4: grupo que recebeu estrôncio.

5 DISCUSSÃO

Rosa (2014), ao avaliar os efeitos do ranelato de estrôncio administrado por gavagem na dose de 650 mg/kg/dia, em ratas submetidas a ovariectomia e com defeito ósseo de tíbia de 2,5 mm, a autora descreve que houve incremento nos valores de densidade óssea, sendo o estrôncio capaz de prevenir as mudanças de *turnover* ósseas induzidas pela deficiência estrogênica, e no período inicial da reparação óssea a inibição da reabsorção óssea e a promoção da formação óssea contribuíram para este resultados.

Bain e colaboradores (2009), estudando os efeitos de ranelato de estrôncio em diferentes doses (125, 250, 650 ml/kg/dia), constatou que o mesmo não apresenta efeitos adversos, sendo considerado seguro e bem tolerada, e o estrôncio impediu a deterioração induzida pela ovariectomia em ratas, quando estas foram submetidas a estresse mecânico a energia necessária para que ocorresse a fratura foi maior que no grupo controle e ele observou um maior numero de trabéculas e menor separação trabécular nestes animais.

Pesquisa de Machado et al. (2010), ao analisar o efeito de nanohidroxiapatita dopada com estrôncio em defeitos ósseos de ovelhas, concluiu que este material, promoveu neoformação óssea na periferia para o centro do defeito, além da presença de tecido conjuntivo frouxo na porção central do defeito, pouco infiltrado inflamatório e grande quantidade de biomaterial na periferia de matriz óssea.

Tian et al. (2009), estudando a biocompatibilidade, osteogênese e a degradação *in vivo* (coelhos), de polifosfato de cálcio dopados com estrôncio, analisado por meio de histopatológica e raio-x, concluiu que o material apresenta boa compatibilidade e osteocondutividade, observando maior formação óssea, colágeno tipo 1 e proteínas morfogênicas, considerando este mineral de interesse ortopédico.

Pesquisa de Son e colaboradores (2009), avaliando os efeitos da dopagem de diferentes minerais (K, Na, Mg, Zn e Sr) em polifosfato de cálcio, pode observar que este composto quando associado com o Sr, observou que ele apresenta degradação mais lenta quando exposto a fluidos corpóreos, sendo assim, a liberação do mineral e gradativa e propicia adequada osteointegração e biocompatibilidade.

Faria et al. (2010) verificando a aplicação tópica de cloreto de estrôncio concluiu que este material, estimulou e acelerou a neoformação óssea nos defeitos cirúrgicos, tratados com cloreto de estrôncio (28 dias) quando comparado com os sem tratamento, e aos 28 dias, presenciou neoformação óssea, sendo predominantemente primária, já aos 56 dias a neoformação óssea preencheu totalmente os defeitos cirúrgicos, tanto do grupo onde se utilizou a solução fisiológica quanto do tratado com cloreto de estrôncio. No entanto, notou-se que nos coelhos tratados com estrôncio o tecido ósseo neoformado se apresentou mais desenvolvido, mostrando a presença de sistemas de Havers.

Freitas-Jesus (2014), pesquisando os efeitos do ranelato de estrôncio associado à vibração mecânica de baixa intensidade e baixa frequência no tecido ósseo de ratas osteopênicas, pode observar que o grupo que foi instituído o tratamento com ranelato de estrôncio, foi o único a obter ganho em todos os parâmetros analisados pela densitometria óssea (densidade mineral óssea, espessura e área), tanto na região de corpo total quanto na região do femurotibial, também apresentou a maior densidade mineral óssea ao final do tratamento.

Trabalho de Freitas (2013), avaliando o efeito de diferentes doses de ranelato de estrôncio (300 e 650 mg/kg/dia), em ratas osteopênicas, observou que independentemente da dose utilizada, houve aumento da espessura do fêmur e da tíbia, da densidade óssea tanto global quanto regional, da área óssea e da espessura do osso cortical, quando comparado com o controle, concluindo que o estrôncio tem efeito positivo nos constituintes do tecido ósseo e influencia positivamente a microestrutura mesmo em doses baixas.

Yogui e colaboradores (2017), propôs um estudo em que foi avaliado o reparo ósseo peri-implantar em ratas submetidas à ovariectomia e tratadas com Ranelato de Estrôncio, analisando a extensão linear de contato osso/implante, área óssea neoformada e proteína osteopontina (responsável pelo início da mineralização do tecido osseo), concluiu que estes valores quando analisados em animais que receberam o estrôncio estavam elevados, permitindo uma melhora na resposta da osteointegração.

Momesso et al. (2017), usando o ranelato de estrôncio (650 mg/kg/dia) em ratas estrógeno dependentes, observou maior neoformação ossea, melhora na

dinâmica óssea alveolar, maior quantidade de osso novo, maior espessura de trabéculas, quando comparado com grupo sem uso de medicamento.

Borges e colaboradores (2000) estudando a hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeitos experimental provocado no terço proximal de tíbia de cães, após a aplicação do material e com períodos de observação de 8, 30, 60, 120 dias, tendo sua avaliação por microscopia eletrônica, concluiu que a hidroxiapatita propiciou incremento de células multinucleadas, osteoclastos e a interação de grânulos do mineral em concomitância com o osso neoformado, indicando osteointegração e onsteoindução.

Garcia (2007), estudando o processo evolutivo do reparo ósseo de ratos em períodos de 7, 15 e 30 dias, tratados com osso bovino inorgânico e hidroxiapatita, observou que a densidade fibroblástica, densidade angioblástica e neoformação óssea, eram abundantes nestes animais quando comparados aos do grupo controle.

Figueiredo (1997), em trabalho comparativo entre a hidroxiapatita porosa de coral e o enxerto ósseo autógeno em coelhos em intervalo de 14, 28 e 90 dias, avaliando parâmetros clínicos, macroscópicos, radiológicos e histopatológicos, pode concluir que, apesar dos materiais estudados serem similares, a hidroxiapatita é um adequado substituto ósseo.

Machado e equipe (2010), ao analisar os efeitos de nanohidroxiapatita, em defeitos ósseos de ovelhas, na análise histopatológica, observou neoformação óssea na periferia em direção ao centro, presença de trabéculas, pavimentação osteoblástica, tecido conjuntivo frouxo, presença do biomaterial e pouco infiltrado inflamatório, considerando de acordo com o autor, que a hidroxiapatita apresenta papel biocompatível e potencial osteoindutor, sendo indicada para substituição óssea.

Silva (2016) propôs que a associação de hidroxiapatita com plasma rico em plaquetas (PRP) teria potencial para reparação de defeitos críticos na fíbula de ratos, porem ao analisar os efeitos obtidos, pode concluir que esta associação não apresenta incremento na reparação tecidual quando comparada com o grupo controle.

Pesquisa realizada por Fehlberg (2001) em que objetivava a avaliação da hidroxiapatita sintética em fraturas completas de terço médio de tíbia em cães com fixação percutânea, com avaliação de 30, 60, 90 e 120 dias, observou que aos 30

dias de pós-operatório, o grupo tratado tinha o defeito preenchido com tecido ósseo trabecular enquanto o não tratado apresentava tecido ósseo fibrovascular, demonstrando assim o potencial angiogênico e a possibilidade de acelerar o processo de reparo da hidroxiapatita.

Duarte et al. (2007) avaliando o processo de osteointegração da hidroxiapatita no processo alveolar da mandíbula de cães com defeitos de 6x5 mm na superfície vestibular com exposição da raiz do quarto pré-molar, com observação de 21, 42, 60, 90 e 120 dias, concluiu que a inflamação no grupo tratado foi menor que no grupo controle, com aceleração do preenchimento do defeito desencadeando inflamação e hemorragia gengival, sem comprometer sua indicação.

Resende e equipe (2006) avaliaram tíbias de ratos com defeitos bilaterais, sendo um destes preenchidos com hidroxiapatita e após, 20, 30 e 45 dias de observação, concluiu que hidroxiapatita apresentou biocompatibilidade frente ao contato direto com o tecido ósseo, havendo evolução no processo de neoformação óssea, mas não ocorreu aceleração desse processo frente a esse material em comparação com o grupo controle, e em nenhum período, nos dois grupos analisados, foi observada reação inflamatória.

É importante pontuar que a HAP é um cristal biocompatível que tem sido utilizado na biomedicina como restaurador, sendo, também, usado em ortopedia, odontologia e oftalmologia. Em ortopedia, tem dado resultados animadores a hidroxiapatita bovina, suína e humana. Comprovaram-se, também, precursores como os fosfatos carbonatos de cálcio, sobretudo na prática odontológica.

Os resultados não dão uma melhor forma no comportamento de reparação tecidual, apesar de serem compatíveis, no entanto, é necessária pesquisa mais criteriosa para elucidar quais são os melhores mecanismos de obtenção e combinação com outros elementos. Além de conhecer a forma de resposta dos tecidos em uma sequência ordenada, com base na engenharia tecidual, é necessário, também, obter avanços na regeneração dos tecidos orientados para que esses biomateriais com padrões adequados sejam mais bem utilizados.

CONCLUSÃO

Podemos concluir com o presente trabalho que, independentemente do material utilizado, houve um incremento na reparação do defeito ósseo produzido, podendo então afirmar que estas hidroxiapatita, tanto a hidroxiapatita de baixa pureza, quanto às dopadas com Gálio e Estrôncio, são eficazes com agentes osteoindutores, osteocondução, osteointegrantes e possuem biocompatibilidade. E tem indicação de uso em reparos de defeitos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, A.L.M.; SOUSA FILHO, P.G.T.; BRAGA JUNIOR, M.B.; CAVALCANTE NETO, J.S.; MEDEIROS, B.B.L.; LOPES, M.B.G. Epidemiology of fractures in patients from small towns in Ceará treated by SUS. *Acta Ortopédica Brasileira*, v. 20, n. 2, p. 66-69, 2012.

ALMEIDA, P.F.; de ANBINDER, A.L.; JAIME, A.P.G.; LIMA, A.P.; BALDUCCI, I.; ROCHA, R.F da. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*, v. 7, n.12, p 51-56, 2006.

BAIN S.D.; JEROME, C. SHEN, V.; DUPIN-ROGER, I.;AMMANN, P. Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. *Osteoporosis International*, v. 20, n. 8, p. 653-664, 2009.

BALLARINI, R.; KAYACAN, R.; ULM, F-J.; BELYTSCHKO, T.; HEUER, A.H. Biological structures mitigate catastrophic fracture through various strategies. *International Journal of Fracture*, v. 135, n. 1-4, p. 187–197, 2005.

BLISS, S.; RAWLINSON, J.J.; TODHUNTER, R. Tissue of the musculoskeletal system. In: TOBIAS, K.M.; JONHSTON, S.A. (Org.) *Veterinary Surgery: Small Animal*. Missouri:Sauders, 2012. p. 553-564.

BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B.; MELO, E.G.; NÓBREGA NETO, P.I. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, n. 6, p. 616-620, 2000.

BORTOLON, P.C.; ANDRADE, C.L.T.; ANDRADE, C.A.F. O perfil das internações do SUS para fratura osteoporótica de fêmur em idosos no Brasil: uma descrição do triênio 2006-2008. *Caderneta de Saúde Pública*, v. 27, n. 4, p. 733-742, 2011.

CALCAGNOTTO, T. Avaliação Histológica e Bioquímica do Reparo Ósseo em Crânio de ratos após Implantes de Cimento de Fosfato de Cálcio (MIMIX™) sob campo Magnético Permanente. 2009. 140f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) - Faculdade de Odontologia/UFRGS, Porto Alegre, 2009.

CORSETTI, A.; LEITE, M.G.T.; PONZONI, D.; PURICELLI, E. Avaliação da Presença de Microrganismos Aeróbios em blocos de Cimento Fosfato de Cálcio Submetidos a três Técnicas de Esterilização. Revista da Faculdade de Odontologia de Passo Fundo, v. 13, n. 2, p. 27-32. 2008.

COSTANTINO, P.D.; FRIEDMAN, C.D.; JONES, K.; CHOW, L.C.; PELZER, H.J.; SISSON, G.A. Hydroxyapatite cement. I. Basic chemistry and histologic properties. JAMA Otolaryngology - Head Neck Surgery, v. 117, n. 4, p. 379-384, 1991

CROSS, A.R. Bology and Biomechanics. In: TOBIAS, K.M.; JONHSTON, S.A. (Org.) Veterinary Surgery: Small Animal. Missouri:Sauders, 2012. p. 566-571.

DUARTE, T.S.; BORGES, A.P.B.; LAVOR, M.S.L.; FILGUEIRAS, R.; TSIOMIS, A.C.; FÓFANO, G.; ODENTHAL, M.E.; PONTESL, K.C.S. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos clínicos e radiográficos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 59, n. 1, p. 114-118, 2007.

FARIA, M.A.; VILLA, N.; CARBONEL, A.A.F.; SIMÕES, R.S.; HADAD, S.; FARACO, F.N. Análise histológica da lesão óssea de mandíbula de coelho após a aplicação local de cloreto de estrôncio. Revista Gaúcha de Odontologia, v. 58, n. 4, p. 1-4, 2009.

FEHLBERG, A.F. Hidroxiapatita sintética na regeneração de falha óssea provocada em fratura completa de terço intermédio de tíbia imobilizada pela fixação percutânea

em cães. 55f. 2001. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2001.

FIGUEIREDO, A.S. Comparação entre hidroxiapatita porosa de coral e o enxerto ósseo autógeno em coelhos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 12, n. 2, p. 84-88, 1997.

FREITAS, C.J. Influência do ranelato de estrôncio em diferentes doses no tecido ósseo de ratas osteopênicas. 134f. 2013. Dissertação (Mestrado em biologia estrutural e funcional) – Faculdade de Biologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 2013.

FREITAS-JESUS, M. Efeitos do ranelato de estrôncio associado à vibração mecânica de baixa intensidade e baixa frequência na tecido ósseo de ratas osteopênicas. 145f. 2014. Dissertação (Mestrado em biologia estrutural e funcional) – Faculdade de Biologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 2014.

FU, L.H.; QI, C.; LIU, Y.J.; CAO, W.T.; MA, M.G. Sonochemical synthesis of cellulose/hydroxyapatite nanocomposites and their application in protein adsorption. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 8292-8298, 2018.

GARCIA, R.D. Estudo do processo evolutivo do reparo ósseo frente ao implante de osso bovino inorgânico e de hidroxiapatita. 63f. 2007. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru. 2007.

HENCH, L.L. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, v.19, n.16, p. 1419-23, 1998.

MACHADO, C.P.G.; PINTOR, A.V.B.; GRESS, M.A.K DE A.; ROSSI, A.M.; GRANJEIRO, J.M.; MAIA, M.D.C. Avaliação da hidroxiapatita contendo estrôncio como substituto ósseo em tíbias de ovelhas. *Innovation in Implant Journal*, v. 5, n. 1, p. 9-14, 2010.

MALZAC, A. Hidroxiapatita dopada pelo gálio para potencial uso em Ortopedia. 2008. 89f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina/UFMS, Campo Grande, 2008.

MARTINS, G.L. Estudo Microscópico do Reparo Ósseo na Mandíbula de ratos Submetida à Osteotomias a fresa cirúrgica e laser de Er:YAG. 2001. 118f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) - Faculdade de Odontologia/UFRGS. 2001.

MELNIKOV, P.; GONCALVES, R.V. Preparation and characterization of strontium hydroxyapatite $Sr_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \cdot 10H_2O$ suitable for orthopedic applications. *Materials Letters*, v. 150, p. 89-92, 2015.

MELNIKOV, P.; MALZAC, A.; COELHO, M.B. Gallium and bone pathology. *Acta Ortopedica Brasileira*. v. 16, p. 54-57, 2008.

MOMESSO, G.A.C.; COLETE, J.Z.; ERVOLINO, A.C.S.; HASSUMI, J.S.; PUTTINI, I.O.; POLO, T.O.B.; FAVERANI, L.P.; OKAMOTO, R. Tratamento com ranelato de estrôncio melhora atividade celular e microarquitetura óssea alveolar em ratas osteopênicas. *Archives of Health Investigation*, v. 6, n. 1, p. 1, 2017.

PIRES, A.L.; BIERHALTZ, A.C.K.; MORAES, A.M. Biomaterials: types, applications, and Market. *Química Nova*, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

PORTER, R.L.; CALVI, L.M. Communications between bone cells and hematopoietic stem cells. *Archives Biochemistry Biophysics*, v. 473, n. 2, p. 193`-200, 2008.

RESENDE, A.C.; CUNHA, L.R.; SASKA, S.; BALDUCCI-ROSLINDO, E.; MINARELLI-GASPAR, A.M. Análise biológica da hidroxiapatita após implantação em tíbias de ratos. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 41, n. 4, p. 132-136, 2006.

ROSA, J.A. Influência do ranelato de estrôncio na reparação de defeitos ósseos em fêmures e nos componentes moleculares do osso em ratas ovariectomizadas. 85f.

2014. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

SASSIOTO, M. C. P.; FILHO, N. C.; FACCO, G. G.; SODRÉ, S. T.; NEVES, N.; PURISCO, S. U.; FARIAS, A. G. Efeito da *Casearia sylvestris* no reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 19, n. 6, p. 637-641, 2004.

SCHANAIDER, A.; SILVA, P.C. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 19, n. 4, p. 441-447, 2004.

SILVA, L.F. Hidroxiapatita carbonatada e plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos. 55f. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas. 2016.

SIMS, N.A.; GOOI, J.H. Bone remodeling: multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 19, n. 5, p. 444-451, 2008.

SIQUEIRA JÚNIRO, J.F.; DANTAS, C.J.S. Reparação tecidual: aspectos biodinamicos. In: SIQUEIRA JÚNIRO, J.F.; DANTAS, C.J.S. (Org.) *Mecanismos celulares e moleculares da inflamação*. Rio de Janeiro:Medsi, 200, p. 197-225.

TIAN, M.; CHEN, F.; SONG, W.; YANCHENG, S.; CHEN, Y.; WAN, C.; YU, X.; ZHANG, X.; In vivo study of porous strontium-doped calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications. *Journal of Material and Science*, v. 20, p. 1505-1512, 2009.

WARREL, R.P.; LOVETT, D.; DILMANUAN, F.A.; SCHNEIDER, R.; HEELAN, R.T. Low-dose gallium nitrate for prevention of osteolysis in myeloma: result of a pilot randomized study. *Journals of the Clinical Oncology*, v. 11, p. 2443-2450, 1993.

YOGUI, F.C.; COLÉTE, J.Z.; BATISTA, F.R.S.; MOMESSO, G.A.C.; GOMES-FERREIRA, P.H.S.; FAVERANI, L.P.; OKAMOTO, R. Avaliação do reparo ósseo periimplantar em ratas com deficiência de estrógeno e tratadas com ranelato de estrôncio. *Archives of Health Investigation*, v. 6, n. 2, p.1, 2017.