



EFEITO DO FOSFATO TRICÁLCICO DO TIPO BETA COM DIFERENTES  
TEORES DE MAGNÉSIO NO REPARO ÓSSEO

Neusa Motta de Freitas Costa

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadores: Glória Dulce de Almeida Soares  
José Mauro Granjeiro

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2013

EFEITO DO FOSFATO TRICÁLCICO DO TIPO BETA COM DIFERENTES  
TEORES DE MAGNÉSIO NO REPARO ÓSSEO

Neusa Motta de Freitas Costa

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ  
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:

---

Prof.<sup>a</sup> Glória Dulce de Almeida Soares, D. Sc.

---

Prof. José Mauro Granjeiro, D. Sc.

---

Prof. Luiz Carlos Pereira, D. Sc.

---

Dra. Lidia Agata de Sena, D. Sc.

---

Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva, D. Sc.

---

Prof.<sup>a</sup>. Mônica Diuana Calasans Maia, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

FEVEREIRO DE 2013

Costa, Neusa Motta de Freitas

Efeito do fosfato tricálcico do tipo beta com diferentes teores de magnésio no reparo ósseo/ Neusa Motta de Freitas Costa. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2013.

XIV, 100 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Glória Dulce de Almeida Soares

José Mauro Granjeiro

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2013.

Referências Bibliográficas: p. 86-98.

1. Biomateriais. 2.  $\beta$ -TCP. 3.  $\beta$ -TCMP. 4. Biocompatibilidade. 5. Reparo ósseo. 6. Defeito ósseo de tamanho crítico. 7. Histomorfometria. I. Soares, Glória Dulce de Almeida, *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título.

Aos meus amados filhos Priscila e Marcelo e meus pais Aloysio e Alda, que  
iluminam o meu caminho e me estimulam a seguir em frente.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Dra. Glória Dulce de Almeida Soares, agradeço sua orientação e cuidado desde a teoria, passando pelo laboratório até o final da escrita deste trabalho. Seus ensinamentos foram muito valiosos.

Ao professor Dr. José Mauro Granjeiro, agradeço sua orientação e estímulo constantes. Sua dedicação em ensinar e ajudar foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

A ambos os professores orientadores, dedico meu respeito e admiração.

Aos meus filhos Priscila e Marcelo, agradeço sempre a felicidade de tê-los. Vocês me dão força para lutar todos os dias e vencer.

Aos meus queridos pais Aloysio e Alda, agradeço por terem me ensinado a viver e ser o que sou. Sempre ficaram muito felizes com minhas conquistas e mesmo não estando mais aqui para me verem, tenho certeza que estão vibrando com mais este passo que dei. Estarão sempre comigo.

À Débora Helena Yassuda, companheira de curso, de trabalho, de maratonas... Enfim, me acompanha do stress ao lazer, em várias áreas de nossas vidas!! Obrigada por todo carinho e força que você me dá nestes longos anos de convivência.

À minha amiga / irmã Maria Helena Santiago e sua família, pelo ombro, abraço e palavras sempre positivas e carinhosas, que são muito importantes para mim. Sua serenidade e bom humor estão presentes e me levantam durante anos.

À Dra. Márcia Soares Sader pelos ensinamentos e paciência durante a fase laboratorial deste trabalho. Sua ajuda foi imprescindível na confecção dos biomateriais, assim como na análise dos grânulos no MEV e no Teste de Dissolução.

Ao meu amigo Gustavo de Oliveira Fernandes, pela importante ajuda na fase cirúrgica dos experimentos. Sempre pronto para trabalhar no que fosse necessário e, o mais importante, com toda boa vontade.

À Ana Paula Duarte Moreira, pela ajuda na análise de FT-IR e à Aline Fernandes, pela ajuda na análise de Distribuição Granulométrica, ambas do Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (PEMM/COPPE).

À querida Renata Nunes, do nosso Laboratório de Biomateriais (PEMM/COPPE), pela ajuda na análise de DRX.

À Dra. Lidia Agata de Sena, pela ajuda na análise sobre as amostras no MEV, realizada no INMETRO.

À Dra. Mônica Diuana Calasans Maia, pela ajuda na inclusão das peças anatômicas em resina e nas imagens obtidas no Microscópio Óptico de Luz Polarizada, no Laboratório do prof. Marcos Farina (ICB/CCS/UFRJ).

À Dra. Adriana Therezinha Alves, pela ajuda na análise histológica descritiva.

Às minhas amigas e funcionárias Rosane, Ana e Maria, que dividem comigo todos os meus momentos de felicidade, vitórias, angústias e realizações. Vocês me dão tranquilidade para fazer todo o meu trabalho dentro e fora da clínica, pois sei que posso contar sempre com vocês.

Enfim, a todos que, de um modo ou de outro, por suas atitudes e seus ensinamentos, incentivaram-me a concluir este curso.

A todos, muito obrigada!!

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

## EFEITO DO FOSFATO TRICÁLCICO DO TIPO BETA COM DIFERENTES TEORES DE MAGNÉSIO NO REPARO ÓSSEO

Neusa Motta de Freitas Costa

Fevereiro/2013

Orientadores: Glória Dulce de Almeida Soares

José Mauro Granjeiro

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

O objetivo do presente estudo foi investigar o reparo do defeito de tamanho crítico na calvária de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), tratados com grânulos de fosfato tricálcico do tipo beta ( $\beta$ -TCP) com ou sem Mg, associado ou não à regeneração óssea guiada (ROG). O  $\beta$ -TCP foi obtido comercialmente e o fosfato tricálcico do tipo beta contendo magnésio ( $\beta$ -TCMP) foi produzido através da síntese de hidroxiapatita cálcio-deficiente dopada com íons de magnésio. Foram utilizados 78 animais divididos em seis grupos experimentais, os quais foram eutanasiados com 24 h, 1 e 6 meses após a implantação (n=1/ grupo/período de 24 h e n=6/grupo/demais períodos). A análise histológica demonstrou reparo ósseo parcial e a biocompatibilidade dos biomateriais, que se apresentou com a aposição óssea em contato direto com os grânulos. A análise histomorfométrica indicou que o osso neoformado aumentou nos períodos experimentais nos grupos  $\beta$ -TCP + membrana ( $p < 0,05$ ) e  $\beta$ -TCMP + membrana ( $p < 0,001$ ), melhorando o reparo ósseo do defeito crítico em calvária de rato, com o nível de neoformação óssea sendo cerca de 4 a 5 vezes maior do que o encontrado no grupo coágulo. Não foi encontrada diferença significativa em relação à densidade de volume do biomaterial. A implantação de  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP no modelo de defeito crítico mostrou que ambos os materiais são biocompatíveis e que sua associação com ROG aumenta significativamente a formação óssea, mesmo no centro do defeito ósseo.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

EFFECT OF BETA TRICALCIUM PHOSPHATE WITH DIFFERENT LEVELS OF  
MAGNESIM ON BONE REPAIR

Neusa Motta de Freitas Costa

February/2013

Advisors: Glória Dulce de Almeida Soares

José Mauro Granjeiro

Department: Metallurgical and Materials Engineering

The objective of the present study was to investigate the repair of critical-size defect in rats skull Wistar (*Rattus norvegicus*), treated with beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) granules, with or without Mg, associated or not with bone-guided regeneration (GBR).  $\beta$ -TCP was obtained commercially and magnesium-substituted beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCMP) was produced from the synthesis of doped hydroxyapatite calcium-deficient with magnesium ions. Seventy-eight animals were divided into six experimental groups. They were euthanized after 24h, 1 and 6 months post-implantation (n=1/group/ 24h period and n=6/group/others periods). Histologic analysis showed partial bone healing and the biocompatibility of biomaterials, which presented bone apposition in direct contact to them. Histomorphometric analysis indicated that newly-formed bone increased throughout the experimental periods for  $\beta$ -TCP + membrane group ( $p < 0.05$ ) and  $\beta$ -TCMP + membrane group ( $p < 0.001$ ), improving the bone repair of critical-size defects in rat skull, with the level bone being approximately 4-5-fold greater than in the blood clot group. No significant difference was found with regard to the biomaterial volume density. Implantation of granular  $\beta$ -TCP and  $\beta$ -TCMP in a critical defect model showed that both materials are biocompatible and that their association to GBR significantly increased bone formation even at the center of the bone defect.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 – Tecido ósseo - considerações gerais.....	5
2.2 – Biomateriais como substitutos ósseos.....	8
2.3 – Defeito crítico.....	11
2.4 – Dissolução iônica de fosfatos de cálcio.....	13
2.5 – Fosfatos de cálcio dopados com Magnésio.....	14
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1 – Materiais.....	17
4.2 – Métodos.....	17
4.2.1 – Produção do pó de hidroxiapatita cálcio deficiente com magnésio.....	17
4.2.2 – Obtenção das pastilhas e produção dos grânulos de $\beta$ -TCMP e $\beta$ -TCP..	18
4.2.3 – Determinação da faixa do tamanho dos grânulos.....	19
4.2.4 – Caracterização físico-química dos grânulos de $\beta$ -TCMP e $\beta$ -TCP.....	19
4.2.5 – Caracterização morfológica dos grânulos de $\beta$ -TCMP e $\beta$ -TCP.....	20
4.2.6 – Teste <i>in vitro</i> dos grânulos de $\beta$ -TCMP e $\beta$ -TCP.....	21
4.2.7 – Grupos experimentais, preparo dos animais e procedimento de implantação.....	22
4.2.8 – Obtenção das biópsias e processamento histológico.....	24
4.2.9 – Análise das amostras.....	27
4.2.10 – Análise histomorfométrica.....	29
4.2.11 – Análise estatística.....	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1 – Caracterização físico-química dos grânulos de $\beta$ -TCMP e $\beta$ -TCP.....	31
5.1.1 – Difração de raios X (DRX).....	31
5.1.2 – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT- IR).....	31

5.2 – Caracterização morfológica dos grânulos de $\beta$ -TCMP e $\beta$ -TCP.....	32
5.2.1 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	32
5.2.2 – Distribuição Granulométrica.....	32
5.3 – Teste <i>in vitro</i> dos grânulos de $\beta$ -TCMP e $\beta$ -TCP.....	34
5.3.1 – Teste de dissolução.....	34
5.4 – Análise das amostras.....	41
5.4.1 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	41
5.4.2 – Microscopia de luz polarizada.....	45
5.4.3 – Microscopia de luz.....	50
5.5 – Análise histomorfométrica.....	75
6. DISCUSSÃO.....	78
7. CONCLUSÕES.....	84
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	85
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
10. APÊNDICE.....	99
10.1 – Aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais.....	99
10.2 – Composição do fosfato de cálcio fabricado pela MERCK®.....	100

## LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura das pastilhas sinterizadas.....	18
Figura 4.2 – Esquema do modelo experimental utilizado.....	22
Figura 4.3 – Esquema do preparo dos animais e procedimento de implantação.....	23
Figura 4.4 – Eutanásia através de punção cardíaca.....	24
Figura 4.5 – Peça anatômica coletada.....	24
Figura 4.6 – Esquema da peça anatômica coletada.....	25
Figura 4.7 – Peças anatômicas incluídas em parafina.....	25
Figura 4.8 – Peça anatômica incluídas em resina.....	26
Figura 4.9 – Representação esquemática das imagens capturadas com o microscópio..	29
Figura 4.10 – Tela do programa Image-Pro Plus® .....	30
Figura 5.1 – Espectros de DRX dos grânulos $\beta$ -TCMP e $\beta$ -TCP.....	31
Figura 5.2 – Detalhes dos espectros de FT-IR dos grânulos de $\beta$ -TCMP e $\beta$ -TCP.....	32
Figura 5.3 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos grânulos.....	33
Figura 5.4 – Concentrações (ppm) do íon Ca liberado na solução a partir dos grânulos.....	36
Figura 5.5 – Concentrações (ppm) do íon Mg liberado na solução a partir dos grânulos.....	38
Figura 5.6 – Concentrações (ppm) do íon P liberado na solução a partir dos grânulos.....	40
Figura 5.7 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura do defeito ósseo no período experimental de 1 mês (x100).....	42
Figura 5.8 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura do defeito ósseo no período experimental de 6 meses.....	44
Figura 5.9 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês - $\beta$ -TCMP (x10).....	45
Figura 5.10 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês – (x10).....	47
Figura 5.11 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses – (x10).....	49
Figura 5.12 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês – coágulo (x20).....	52
Figura 5.13 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês – membrana (x20).....	54

Figura 5.14 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês – $\beta$ -TCP (x20).....	56
Figura 5.15 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês – $\beta$ -TCP + membrana (x20).....	58
Figura 5.16 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês – $\beta$ -TCMP (x20).....	60
Figura 5.17 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês – $\beta$ -TCMP + membrana (x20).....	62
Figura 5.18 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses – coágulo (x20).....	64
Figura 5.19 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses – membrana (x20).....	66
Figura 5.20 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses – $\beta$ -TCP.....	68
Figura 5.21 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses – $\beta$ -TCP + membrana.....	70
Figura 5.22 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses – $\beta$ -TCMP.....	72
Figura 5.23 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses – $\beta$ -TCMP + membrana.....	74
Figura 5.24 – Percentual de área ocupada por osso neoformado em função dos períodos experimentais (1 e 6 meses).....	75
Figura 5.25 – Percentual de área ocupada por tecido conjuntivo em função dos períodos experimentais (1 e 6 meses). ....	76
Figura 5.26 – Percentual de área ocupada por biomaterial em função dos períodos experimentais (1 e 6 meses). ....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Faixas dos tamanhos dos grânulos.....	19
Tabela 4.2 – Sequência de processamento da amostra não desmineralizada.....	27
Tabela 5.1 – Análise de distribuição granulométrica.....	34
Tabela 5.2 – Dissolução do Ca (ppm).....	35
Tabela 5.3 – Dissolução do Mg (ppm).....	37
Tabela 5.4 – Dissolução do P (ppm).....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>β-TCP</b> .....	Fosfato tricálcico do tipo beta
<b>β-TCMP</b> .....	Fosfato tricálcico do tipo beta contendo magnésio
<b>HA</b> .....	Hidroxiapatita
<b>HE</b> .....	Hematoxilina e Eosina
<b>ROG</b> .....	Regeneração óssea guiada
<b>RANKL</b> .....	Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand / Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B

## 1. INTRODUÇÃO

O organismo humano está sujeito a inúmeras adversidades que podem levar à perda de um órgão (perda dental, por exemplo), de massa corpórea (perdas ósseas), ou podem levar à substituição de um tecido por outro, podendo ser este novo tecido indesejado ou ineficiente. Tal evento é especialmente verdadeiro no que se refere ao tecido ósseo. Este é um tecido altamente dinâmico e versátil, com funções diversas, como proteção de órgãos, reservatório de cálcio, sustentação do corpo. Em determinadas situações, como em casos de acidentes ou patologias ósseas, nem sempre a dinâmica do organismo é capaz de regenerar o tecido perdido e, assim, devolver forma e função adequadas. Outros distúrbios podem interferir no crescimento craniofacial, como no caso da crânio-sinostose (MARDAS *et al.*, 2002), e, novamente, o organismo não consegue realizar o reparo adequado, o que prejudica o crescimento do indivíduo. De acordo com a American Academy of Orthopaedic Surgeons (2010), todo ano são realizados ao redor de 500.000 enxertos ósseos nos Estados Unidos principalmente em fraturas com perda tecidual.

Na odontologia são inúmeras as situações nas quais as perdas ósseas prejudicam a função estomatognática, como nas periodontites, ou até mesmo impedem a reabilitação bucal, como é o caso de pacientes edêntulos que necessitam de reabilitação com implantes osseointegráveis, mas não possuem quantidade ou qualidade óssea adequadas. BOYNE, em 1971, foi o primeiro autor a estudar a aplicação dos enxertos ósseos por razões protéticas. Com o tempo, o mesmo tipo de enxerto passou a ser utilizado de forma regular para que fosse possibilitada a instalação de implantes osseointegráveis, com o máximo de resultado na avaliação estética.

Os biomateriais utilizados para restabelecer ou aumentar os tecidos biológicos devem apresentar propriedades físicas, químicas, biomecânicas e biológicas apropriadas para serem utilizados em pacientes, caracterizados em testes *in vitro* e *in vivo*. Devem prover sítios para ancoragem celular, ter estabilidade mecânica, proporcionar a interface para responder a mudanças fisiológicas e biológicas e remodelar a matriz extracelular, a fim de integrar-se com o tecido nativo adjacente (GE *et al.*, 2004). Deseja-se que o enxerto ósseo apresente as propriedades biomecânicas mais próximas possíveis ao osso normal, acelerando todo o processo regenerativo (DIMITRIOU *et al.*, 2011).

De acordo com a norma ISO 10993-6, durante as primeiras duas semanas depois da enxertia, a reação decorrente do procedimento cirúrgico pode ser difícil de distinguir da reação tecidual provocada pelo enxerto. Em músculo e tecido conjuntivo, dependendo da espécie de animal, e a severidade do trauma cirúrgico, a homeostase celular é vista depois de 9 a 12 semanas.

A previsibilidade dos tratamentos para a regeneração do tecido ósseo perdido depende de vários fatores como a técnica cirúrgica utilizada, assepsia, topografia e extensão do defeito ósseo, vascularização e do material de substituição óssea utilizado (MISCH, 2006; SALGADO, *et al.*, 2011).

A utilização de substitutos ósseos na odontologia teve um grande avanço nas últimas décadas com o desenvolvimento dos biomateriais, que se tornaram indispensáveis para os profissionais que atuam nas áreas de cirurgia buco-maxilofacial, periodontia, cirurgia paraendodôntica, cirurgia ortognática e implantodontia. Com o aumento na expectativa de vida da população, há o aumento da necessidade de reposição de partes perdidas do corpo devido às doenças degenerativas ou aos acidentes, visto que este tem maior probabilidade de acontecer durante um maior tempo de vida. A maioria da população vive em grandes cidades, o que proporciona um índice maior de trauma, decorrente de acidentes ou da violência urbana, com isto também há uma maior necessidade de reabilitação funcional e estética.

Dentre os diversos substitutos ósseos avaliados, as apatitas são intensamente estudadas devido à suas propriedades físico-químicas e biológicas. As apatitas biológicas são pouco cristalinas e contém substituições catiônicas e aniônicas na sua rede cristalina. O magnésio é um dos mais importantes íons associados com apatitas biológicas. A substituição do magnésio em fosfatos de cálcio tem recebido muita atenção, pois promove mudanças qualitativas na matriz óssea, influencia indiretamente no metabolismo mineral, promove reações catalíticas e controla funções biológicas (BOSE *et al.*, 2011; ELSHAL *et al.*, 2012). A deficiência de magnésio afeta adversamente todos os estágios do metabolismo esquelético, causando paralisação do crescimento ósseo, diminuição das atividades osteoblásticas e osteoclásticas, osteopenia e fragilidade óssea (RUDE *et al.*, 2009).

Pode-se especular que os materiais à base de hidroxiapatita modificada por magnésio sejam biocompatíveis e apresentem propriedades biológicas adequadas quando utilizados como substitutos ósseos (SUCHANEK, 2004). Portanto, o fosfato tricálcico dopado com Mg (TCMP) também pode ser interessante para engenharia óssea, como uma fonte de magnésio para modulação de eventos biológicos.

Uma vez que o biomaterial é introduzido no corpo, uma sequência de eventos ocorre no tecido adjacente podendo terminar com a formação de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho na interface entre o tecido e o material e desenvolvimento de cápsula fibrosa (ANDERSON, 2000; ANDERSON, 2001; GRETZER *et al.*, 2006; LUTTIKHUIZEN, 2006). As consequências da reação à superfície do material podem ser devastadoras. ANDERSON *et al.* (2008), demonstraram que a química da superfície pode causar impacto no comportamento dos macrófagos como a adesão, apoptose, fusão e secreção de citocinas. Aumentar nossos conhecimentos sobre as complexas interações entre célula e material contribui para o desenvolvimento de novos biomateriais e maior avanço na engenharia tecidual.

Como o campo da engenharia de tecidos e medicina regenerativa se expande, biomateriais poderão ser combinados com células, proteínas e/ou outros componentes biológicos, criando estruturas híbridas, apropriados para a regeneração funcional dos tecidos doentes ou traumatizados. Um dos problemas para qualquer modelo de biomaterial são as interações entre o hospedeiro e a superfície do material alógeno, células do xenógeno ou possíveis células tronco implantadas. Quanto ao sítio receptor, o biomaterial poderia desencadear a liberação de mediadores inflamatórios sinalizando moléculas como as citocinas, fatores de crescimento, enzimas e proteínas da matriz extracelular (MEC), visto ser diferente das células nativas do local. Dependendo do tipo celular do implante estes mediadores podem causar várias respostas como ativação, diferenciação, proliferação ou migração celular. Adicionalmente, células próximas ou sobre a superfície do material podem estar sujeitas a um ambiente de baixo pH e enzimas digestivas que são específicas para a reação de corpo estranho. O biomaterial deve prover um ambiente apropriado biomimético para permitir a sobrevivência celular (ANDERSON *et al.*, 2008).

O conceito de regeneração óssea guiada (ROG) é comumente considerado para reconstrução óssea em defeitos de tamanho crítico. Neste caso, membranas especiais

atuam como barreira para prevenir a invasão de tecido mole para dentro do defeito durante o reparo ósseo (TAGA *et al.*, 2008). O processo de regeneração que ocorre com a membrana envolve a angiogênese e migração de células osteogênicas da periferia para o centro do tecido, criando um tecido fibrocelular bem vascularizado (DIMITRIOU *et al.*, 2012).

Em vista do que foi citado, é natural a busca de substitutos ósseos e de produtos que estimulem a formação óssea e que possam ser utilizados em situações onde o restabelecimento do volume e qualidade óssea seja desejável. Tal biomaterial deve ser utilizado em íntimo contato com os tecidos do indivíduo e, para tanto, possuir características como: biocompatibilidade, previsibilidade, aplicação clínica, ausência de riscos trans-operatórios e sequelas pós-operatórias mínimas, além de aceitação pelo paciente (DIMITRIOU *et al.*, 2011). Apesar de haver uma grande variedade de implantes ósseos, associado a um avanço crescente no seu desenvolvimento e aperfeiçoamento, ainda não existe um biomaterial que preencha todos esses requisitos.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do  $\beta$ -TCP dopado com Mg ( $\beta$ -TCMP) em grânulos no reparo de defeitos de tamanhos críticos em calvária de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), associado ou não à membrana para regeneração óssea guiada.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Tecido Ósseo - Considerações gerais**

O tecido ósseo é uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo, onde a matriz extracelular é mineralizada, conferindo-lhe rigidez, mas mantendo algum grau de elasticidade. O osso é a maior reserva primária de cálcio do organismo, sendo o cálcio um íon essencial para a vida, pois participa da manutenção do pH interno do corpo, assim como na transmissão e condução do impulso elétrico em nervos e músculos. Deste modo, o tecido ósseo tem uma grande capacidade de remodelação, renovando-se constantemente para responder às necessidades metabólicas do corpo e a manutenção da estabilidade da calcemia (LIPPUNER, 2012). O osso tem a função de suporte, proteção dos órgãos internos e em conjunto com os músculos promovem a movimentação dos seres (DOROZHKIN, 2007).

Em nível molecular, o osso é constituído, basicamente, de uma matriz orgânica colagênica (colágeno tipo I), contendo proteoglicanas de baixa massa molecular e proteínas não colágenas, que correspondem a 25% de seu peso; uma parte mineral, principalmente hidroxiapatita (HA) correspondente a 65% e água (10%). Sua função geral está relacionada com a constituição do esqueleto, sustentação e fixação dos músculos e depósito para íons cálcio para manutenção da calcemia (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Macroscopicamente há duas formas de osso: cortical (compacto) e esponjoso (medular). No osso compacto, a matriz de colágeno está organizada em forma de lamelas concêntricas, geralmente ao redor de um canal de Havers, constituindo o ósteon. Os canais centrais contendo nervos e vasos sanguíneos se comunicam entre si e com a cavidade medular óssea através dos canais de Volkmann (PAZZAGLIA *et al.*, 2009). Já o osso esponjoso apresenta uma matriz mais porosa, organizada em trabéculas. As diferenças entre osso cortical e esponjoso não são apenas estruturais, mas também funcionais. Assim, o osso cortical dá resistência e proteção, enquanto que o esponjoso atua nas funções metabólicas. O osso cortical ou compacto é encontrado nas diáfises de ossos longos e na superfície externa de ossos chatos. O osso esponjoso ou medular delimita espaços intertrabeculares que são preenchidos por medula óssea vermelha, onde há a produção ativa de células sanguíneas a partir de células

mesenquimais, ou, com o envelhecimento, por medula óssea amarela, um sítio de reserva de gordura (BOSKEY e COLEMAN, 2010; TULJAPURKAR *et al.*, 2011).

Protegendo externamente o osso existe uma fina camada de tecido conjuntivo com grande potencial osteogênico, denominado periósteo, e um tecido equivalente, o endósteo, que recobre as superfícies internas dos ossos.

Quanto às células presentes no tecido ósseo, temos:

1. **Osteoblastos:** Células cuboidais organizadas em uma camada contínua sobre o osteóide, ou seja, camada não mineralizada de matriz, que recobre a superfície óssea mineralizada. Estas células são responsáveis pela osteogênese, isto é, pela síntese e secreção da matriz orgânica, sua maturação e mineralização. O osteoblasto além de sintetizar e secretar o colágeno tipo I, que corresponde a 90% da matriz orgânica, também produz as outras proteínas não colagênicas encontradas na matriz, como: sialoproteína óssea, osteopontina, osteonectina, osteocalcina, proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), proteoglicanas e outras (MISCH, 2006). É uma célula muito rica em fosfatase alcalina, enzima essencial para o processo de mineralização da matriz. Vários fatores sistêmicos e locais regulam o seu número, a sua diferenciação e a sua atividade, incluindo fatores autócrinos. Assim, estas células possuem receptores para hormônios sistêmicos (paratormônio, estrógenos, glicocorticóides, insulina, hormônios tireoideanos), vitamina D3 e fatores locais como prostanóides (PGE, PGF<sub>2α</sub>), citocinas (TGF-βs, BMPs, FGFs, IGF-1, PDGF) e interleucinas (NEVE *et al.*, 2011). Os osteoblastos se diferenciam a partir de células mesenquimais indiferenciadas, e a sua diferenciação em osteoblastos depende de estímulos externos, fatores de crescimento, hormônios e interações celulares.
2. **Osteócitos:** Por volta de 90% de todas as células ósseas do esqueleto humano adulto são osteócitos, que são osteoblastos incorporados à matriz óssea mineralizada, durante a osteogênese. São residentes das pequenas lacunas presentes na matriz óssea mineralizada. Os osteócitos emitem longas e finas protrusões, os dendritos, que viajam no interior de pequenos canais (*canaliculi*) no interior do osso compacto, mas também alcançam a superfície do osso e compartimento da medula óssea. Por meio de *gap junctions* com células vizinhas, os osteócitos estão conectados não somente entre si, mas também com outras células da superfície, incluindo osteoblastos. Tais células formam uma

rede celular complexa que parece ideal para captar estímulos mecânicos e integrá-los aos sinais locais e sistêmicos para assegurar a integridade do esqueleto e homeostase óssea (BONEWALD e JOHNSON, 2008; KRAMER *et al.*, 2010). Na ausência de estímulo mecânico, o osso é reabsorvido e na presença de estímulo mecânico, a massa óssea é mantida ou aumentada. O esqueleto é único na habilidade de remodelar-se em resposta adaptativa a percepção da presença ou ausência de carga mecânica. As células com potencial para perceber o estímulo mecânico e transformar tais estímulos em sinais incluem os osteoblastos e osteócitos. Devido a sua distribuição por toda a matriz mineralizada e extensa interconectividade, os osteócitos são considerados os responsáveis pela orquestração dos sinais de formação/reabsorção ósseas a partir dos estímulos mecânicos. O osteócito parece ser capaz de perceber a intensidade dos estímulos e de distribuí-los ao longo de todo o osso por meio de sinais para regular o processo de remodelação. Em anos recentes foi demonstrado que a deleção específica dos osteócitos resulta em perda de osso e que o osso não responde ao estímulo mecânico. Estes estudos demonstraram que os osteócitos são necessários para manutenção da massa óssea em resposta à tensão mecânica normal, mas na ausência de tal tensão, envia sinais de reabsorção (BONEWALD e JOHNSON, 2008).

3. **Osteoclastos:** são células primariamente responsáveis pela degradação de osso mineralizado durante o desenvolvimento, homeostase e reparo ósseo. São células grandes multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleares. Quando ativo é polarizado, com parte da membrana envolvida na absorção fortemente aderida à superfície óssea e que delimita a zona absorvente da célula, denominada “borda em escova” ou “borda franjada”, que é formada a partir da exocitose de vesículas da membrana apical. Há secreção de ácido clorídrico levando à dissolução da matriz inorgânica e também há liberação de enzimas proteolíticas promovendo a degradação da matriz orgânica óssea (HENRIKSEN *et al.*, 2011). Com o início da absorção aparece uma depressão na superfície óssea junto à borda em escova que é conhecida como lacuna de Howship (BRUZZANITI e BARON, 2006; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A interação da atividade de osteoblasto-osteoclasto é responsável pela remodelação óssea, ou seja, a absorção e a neoformação óssea contínua que ocorre em todos os ossos (BERNHARDT *et al.*, 2010). O osso é remodelado numa velocidade tal

que, em um ano, aproximadamente 10% do conteúdo total é substituído nos adultos humanos. Tal fato comprova o papel extraordinário dos osteoclastos na manutenção do esqueleto ósseo. Estas células multinucleadas contribuem dinamicamente para a remodelação óssea em coordenação com os osteoblastos, que depositam a matriz óssea (ASAGIRI e TAKAYANAGI, 2007). Deste modo, os osteoblastos produzem fatores que vão influenciar a diferenciação e função dos osteoclastos, alguns destes são depositados e armazenados na matriz e outros secretados localmente em resposta a hormônios ou fatores locais (LIU *et al.*, 2008). Segundo SINGH *et al.* (2012), os receptores para a maioria dos fatores osteolíticos são encontrados nos osteoblastos e não nos osteoclastos. Por outro lado, a absorção óssea libera fatores que recrutam e ativam os osteoblastos (AMADEI *et al.*, 2006), assim os osteoclastos liberam fatores que estimulam osteoblastos a neoformação óssea (HENRIKSEN *et al.*, 2012).

Um destes fatores que controlam a função do osteoclasto é a osteoprotegerina (OPG), descoberta em 1997 por SIMONET *et al.*, os quais demonstraram que a sua superexpressão em camundongos transgênicos resultava em osteopetrose devido ao bloqueio da diferenciação de osteoclastos. A identificação e o estudo funcional da OPG mostraram que, além de esteróides e outros hormônios, novas moléculas secretadas podem atuar sistemicamente no controle da diferenciação de osteoclastos. Obviamente a identificação de um receptor solúvel que controla a osteoclastogênese sugeriu que deveria existir um fator associado a este receptor, o qual foi chamado de RANKL (Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand / Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B), ou fator de diferenciação de osteoclastos (ODF). RANKL está presente na membrana de precursores de osteoclastos, bem como solúvel no microambiente ósseo. A deficiência em RANKL leva a osteopetrose (DOUNI *et al.*, 2012; WALKER *et al.*, 2010).

## **2.2 Biomateriais como substitutos ósseos**

Ao mesmo tempo em que intensa investigação é conduzida no sentido de se entender a base da remodelação óssea, muito se estuda também sobre alternativas terapêuticas para perdas ósseas (BERNABÉ *et al.*, 2012). Objetiva-se o desenvolvimento de biomateriais para implantes ósseos com propriedades semelhantes à do próprio osso, como por exemplo, a capacidade de remodelar. Já é amplamente difundido e pesquisado o uso clínico de biomateriais osteosubstitutos na odontologia

(CALDERONI *et al.*, 2011; CONZ *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2009a; GE *et al.*, 2004; MARINS *et al.*, 2004; MEIJER *et al.*, 2007; PARELMAN-KARMON *et al.*, 2012; ROKN *et al.*, 2012; ROY *et al.*, 2012; YASSUDA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2008).

A razão biológica que sustenta o uso de substitutos ósseos é o potencial que esses materiais possuem de conter células formadoras de osso (osteogênico), ou servir de arcabouço para a formação óssea (osteocondutor) ou conter substâncias indutoras ósseas (osteoindutor) (LINDHE *et al.*, 2005; MATASSI *et al.*, 2011; TONELLI *et al.*, 2011).

Os materiais substitutos ósseos utilizados podem ser classificados quanto à sua origem (LINDHE *et al.*, 2005; MISCH, 2006) em autógeno (do próprio indivíduo, osteoindutor, osteocondutor e osteogênico), alógeno (de indivíduos diferentes, osteocondutor e osteoindutor), xenógeno (de espécie diferente, osteocondutor) (CIANI *et al.*, 2006) e aloplástico (sintético, osteocondutor) (CONZ *et al.*, 2005). Eles são utilizados para reabilitação funcional e estética dos pacientes, porém existem várias escolhas possíveis para tal (CHIARA *et al.*, 2012; KHALED *et al.*, 2011; YUAN, 2010).

Dentre os aloplásticos destaca-se a hidroxiapatita cálcio deficiente, que se apresenta com diferentes características (blocos, grânulos, diferentes porosidades e cristalinidades, entre outros). A escolha de substitutos ósseos sintéticos com características físico-químicas controladas no processo de fabricação permite a eliminação de um segundo sítio cirúrgico, diminuindo o tempo de cirurgia e sua morbidade e maior segurança para o paciente, eliminando a possibilidade de transmissão de doenças.

As cerâmicas compostas por ortofosfato de cálcio têm sido muito estudadas. Estruturalmente, apresentam-se geralmente sob a forma de hidroxiapatita não estequiométrica, contendo sódio e carbonato (DOROZHKIN, 2007). A similaridade entre tecido ósseo e cerâmica propicia a interação química entre eles. Dentre as cerâmicas de ortofosfato de cálcio, o fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , TCP) tem sido amplamente estudado (MARCHI, 2007).

A hidroxiapatita cálcio deficiente pode ser sintetizada pela via química úmida, a partir de diversos precursores. A decomposição térmica em temperatura acima de 800°C leva à formação fosfato tricálcico na fase beta ( $\beta$ -TCP). Em temperaturas acima de 1125°C, ocorre transformação para a fase alfa-fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP). O  $\beta$ -TCP é estável na temperatura ambiente e menos solúvel em água que o  $\alpha$ -TCP (DOROZHKIN, 2007).

Materiais aloplásticos podem ser produzidos com grande controle de sua composição e propriedades e, assim, otimizados para aplicações específicas. As cerâmicas bioativas recebem uma atenção considerável quanto a sua utilização como materiais de implantes ósseos sintéticos, incluindo a hidroxiapatita, fosfato tricálcico e biovidros cerâmicos (LICHTÉ *et al.*; 2011, MISCH, 2006; SUBBAIAH e THOMAS, 2011). Algumas propriedades dos materiais de implantes ósseos sintéticos como serem absorvíveis ou não, densos ou porosos, cristalinos ou amorfos, podem modular diretamente o resultado clínico da sua aplicação (CONZ *et al.*, 2005; MISCH, 2006).

Hidroxiapatitas altamente cristalinas são mais resistentes às alterações e absorções em longo prazo, enquanto que aquelas com menor cristalinidade são mais suscetíveis à decomposição (WANG *et al.*, 2009). Apesar de ser altamente biocompatível, a hidroxiapatita estequiométrica, com alta cristalinidade é um biomaterial praticamente não absorvível, não permitindo uma substituição efetiva por tecido ósseo neoformado. A grande vantagem do  $\beta$ -TCP é ser mais solúvel que a hidroxiapatita, sendo mais rapidamente bioabsorvido no organismo (BARRERE *et al.*, 2006).

Outra propriedade importante da hidroxiapatita é sua produção contendo porosidade. Estes poros acarretam aumento de sua área superficial proporcionando maior contato do material com os tecidos e células (FASSINA *et al.*, 2010). A rede de poros interconectados promove vantagens para a circulação dos fluidos tecidual e sanguíneo, com o suprimento de nutrientes e íons minerais para o necessário processo funcional e biológico. Poros com pequenos tamanhos e em pequena quantidade dificultam a circulação dos fluidos através dos grânulos, podendo restringir o crescimento tecidual e formação óssea, reduzindo a bioperformance dos grânulos (XU *et al.*, 2010).

Observa-se também que quanto maior for o tamanho da partícula, por mais tempo o material poderá permanecer no local sem ser absorvido (MISCH, 2006). O material particulado permite mais formação óssea numa região pós-extração do que um material sólido (PAGNI *et al.*, 2012).

### **2.3. Defeito crítico**

A reparação da área ferida, na maioria dos casos, pode ocorrer através da substituição da arquitetura do tecido lesado por outra distinta da original conceituada como cicatrização, diferentemente da regeneração onde o processo de reparo tecidual culmina com o restabelecimento integral dos aspectos morfológicos e funcionais (YANNAS, 2004).

O defeito ósseo de tamanho crítico é definido como um defeito cujas dimensões não permitem a regeneração espontânea do tecido ósseo durante o tempo de vida do animal. Tais defeitos, quando não tratados, são reparados por tecido conjuntivo fibroso, embora possa ocorrer alguma neoformação óssea nas margens do defeito. Utilizando este defeito, o reparo ósseo é diretamente dependente do biomaterial utilizado como enxerto (ACCORSI-MENDONÇA *et al.*, 2011; COOPER *et al.*, 2010; GOMES e FERNANDES, 2011; STEPHAN *et al.*, 2010).

O defeito de tamanho crítico em calvária usado neste estudo, atende aos requisitos descritos por COOPER *et al.* (2010) para testes de regeneração óssea, ou seja: a) o tamanho mínimo do defeito ósseo experimental não deve ser menor do que o defeito crítico ósseo, individualizado para a espécie; b) o modelo deve ser reprodutível e os resultados coletados com relativo curto espaço de tempo; c) pode ser testado diferentes tipos de terapia para reparo ósseo; d) a duramater é fonte de células osteogênicas e de fatores osteoindutivos durante o reparo, devendo ser preservada durante o ato cirúrgico.

Segundo SPICER *et al.* (2012), modelos animais são mais reprodutíveis, podem ser utilizados como análogos às condições clínicas investigadas e oferecem morbidade e mortalidade mínima, sendo fundamental para o desenvolvimento de novas tecnologias. Para engenharia óssea tecidual, um número menor de animais pode ser utilizado, tornando a calvária de rato uma boa escolha, antes de utilizar em humanos. Este modelo

permite a avaliação de biomaterias e do reparo ósseo de forma reprodutível. O defeito de tamanho crítico em calvária de rato também é um bom modelo, pois é um osso plano, facilitando a criação de defeitos, implantação de enxertos e a análise do reparo ósseo (PAULO *et al.*, 2011; ZONG *et al.*, 2010).

Contudo, na literatura há discordância quanto ao tamanho crítico dos defeitos em calvária de ratos. KATO *et al.* (2012) e ZONG *et al.* (2010), consideraram crítico defeitos de 5 mm de diâmetro. Já para COOPER *et al.* (2010), SPICER *et al.* (2012) e STEPHAN *et al.* (2010), defeitos de 8 mm.

Outro fator discutido é a localização de defeito na calvária. Foi realizado o defeito na região frontoparietal da calvária por vários fatores, como: a não interferência da musculatura da orelha; a disponibilidade de grande área óssea e a grande facilidade para o manejo e realização do defeito.

Entretanto, convém salientar que existem pesquisadores que contraindicam esta localização, devido ao risco de lesar durante a cirurgia a estrutura anatômica vascular existente abaixo da sutura sagital e de introduzir o tecido conjuntivo proveniente da sutura na avaliação da regeneração óssea (COOPER *et al.*, 2010). Estes pesquisadores preconizam a realização de defeitos bilaterais em cada animal, o que permitiria uma análise pareada entre o defeito controle e o teste. De acordo com alguns pesquisadores (KOSTOPOULOS e KARRING, 2000; MARDAS *et al.*, 2002), é contraindicado também esse procedimento porque defeitos bilaterais ficam muito próximos um do outro, podendo a reparação de um defeito interferir no defeito contralateral e até mesmo haver a intercomunicação entre os defeitos por reabsorção da fina parede divisória e, conseqüentemente, a transformação em um único grande defeito, afetando os resultados do experimento.

O tipo de incisão a ser usada na calvária é também um aspecto de discussão, já que deve facilitar a visão do leito cirúrgico, gerar um retalho de fácil manejo, manter o periósteo íntegro, conter o material em experimentação no local e facilitar a sutura. Nos trabalhos de HUANG *et al.* (2012), PARK *et al.* (2011) e TERECCA *et al.* (2010), foi utilizada a incisão sobre a sutura sagital. Contudo, acreditou-se que esse tipo de incisão seja contraindicado, uma vez que a coaptação do retalho e do periósteo, dividido no meio pela incisão, fica no meio do defeito fazendo com que os dois processos de

cicatrização, o do tecido mole e o do osso, fiquem sobrepostos, possibilitando a interferência entre ambos e o desvirtuamento do processo de reparo ósseo. Também pode ocorrer neste tipo de incisão, que a sutura seja realizada de forma inadequada, promova a deslocamento do material ou pode ocorrer ainda a deiscência, o que provocaria a exposição do material, com instalação de um processo infeccioso e, conseqüentemente, alteração no resultado final do reparo. Devido a estas considerações, optou-se por realizar uma incisão em meia-lua (CONZ *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2009a), deixando o retalho e o periósteo íntegro sobre o defeito, fazendo com que a sutura fique a uma distância segura, sem a possibilidade de deslocamento do material em experimentação.

#### **2.4. Dissolução iônica de fosfatos de cálcio**

Um dos mecanismos que contribuem para a osteocondutividade de fosfatos de cálcio envolve a rápida dissolução e liberação de íons cálcio e fosfato de sua rede cristalina, com a conseqüente precipitação de uma apatita semelhante à fase mineral do osso na superfície do enxerto. Assim sendo, fosfatos de cálcio sintéticos mais solúveis poderiam promover a rápida formação de uma camada de apatita e aceleração do processo de reparo na região do enxerto (GUTH *et al.*, 2011).

Segundo LI *et al.* (2009), a reabsorção *in vivo* de materiais baseados no  $\beta$ -TCP é controlada por dois fatores: sua própria dissolução no meio e a mediada por células. Avaliaram pós de  $\beta$ -TCMP com zero; 2,3; 4,9; 7,3 e 10,1% de Mg que foram imersos em solução tampão 0,08M de ácido acético/acetato de sódio com pH 5,5 a 25°C por até 27 meses. Observou-se que com a incorporação do Mg, o  $\beta$ -TCP se torna menos solúvel, devido ao aumento da sua estabilidade estrutural. Isto porque a estrutura do  $\beta$ -TCP pode acomodar íons com raio iônico na faixa de 0,06 a 0,08 nm (o raio iônico do Mg é 0,072 nm). Constatou-se também que o grau de dissolução dos materiais é um fator importante, pois está diretamente relacionada à quantidade de íons disponíveis no meio para a neoformação óssea.

Fatores que afetam a solubilidade dos fosfatos de cálcio incluem o método de síntese, a cristalinidade, a densidade e o grau de substituições iônicas na rede cristalina da apatita (FULMER *et al.*, 2002).

No entanto, também foi reportado que Mg estabiliza a fase  $\beta$  em altas temperaturas e permite a sinterização do  $\beta$ -TCP em altas temperaturas quando comparado ao TCP sem Mg, o que poderia aumentar a cristalinidade e assim diminuir a solubilidade de fosfatos quando substituindo parcialmente o Ca na rede cristalina (JIA *et al.*, 2010; MARCHI *et al.*, 2007).

## 2.5. Fosfatos de cálcio dopados com Magnésio

A preparação de hidroxiapatita com magnésio é de grande interesse para o desenvolvimento de substitutos de osso artificial, apresentando características de alta reabsorção e pode positivamente agir ao mesmo tempo como uma fonte de magnésio. Em seus estudos, LANDI *et al.* (2008) afirmaram que a hidroxiapatita com magnésio apresentou maior osteocondutividade ao longo do tempo e maior reabsorção do biomaterial, comparada com a hidroxiapatita estequiométrica. A hidroxiapatita com magnésio inicialmente permite o crescimento ósseo mais lento na proximidade dos grânulos, mas quando o osso começa a ser depositado, encontra condições mais favoráveis para o seu crescimento devido à composição, nano dimensão e características superficiais.

Estudos com substituições iônicas nos fosfatos de cálcio são de grande importância devido ao fato de que a maior parte dos tecidos biológicos, tais como ossos e dentes, são compostos por uma fase mineral apatítica contendo uma variedade de outros elementos. O magnésio (Mg) é um importante íon que está presente na apatita óssea, onde pode substituir parcialmente os íons de cálcio. Sua presença altera as propriedades físico-químicas e biológicas destes materiais (SHEPHERD *et al.*, 2012; SUCHANEK, 2004). Assim, o fosfato tricálcico dopado com Mg (TCMP) parece ser de grande interesse para engenharia óssea, como uma fonte de liberação de magnésio para eventos de modulação biológica.

A substituição do Ca por Mg diminui o tamanho da célula unitária. Esta diminuição ocorre porque o tamanho do íon Mg é menor que o do Ca substituído (KANNAN *et al.*, 2010). Ao substituir o cálcio no cristal de apatita, os átomos de magnésio, por possuírem raio atômico menor, assumem posição mais central, aumentando a estabilidade estrutural (BANDYOPADHYAY, 2006). CAI *et al.* (2010), incorporaram íons de Mg em recobrimentos de hidroxiapatita fluoretada e observaram

que a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  existente sobre o recobrimento aumentou com o tempo e era maior nos recobrimentos que tinham Mg do que aqueles que não tinham. Observaram também que o Mg estimula a proliferação celular.

GENG *et al.* (2009), estudaram recobrimentos de beta-tricálcio fosfatos ( $\beta$ -TCP) biodegradáveis e bioativos preparados com magnésio (Mg) e observaram que eram biocompatíveis e apresentavam boa citocompatibilidade. Materiais bioativos caracterizam-se por sua integração com o tecido ósseo através da formação de uma camada de apatita semelhante à biológica, que se forma na superfície em contato com o fluido corporal (KOKUBO e TAKADAMA, 2006; ZHAO *et al.*, 2005).

ZHAO *et al.* (2011), compararam o efeito do recobrimento de titânio por HA e HA parcialmente substituída por Mg [ $\text{Mg}/(\text{Mg} + \text{Ca}) = 10\% \text{ mol}$ ] na indução da osteogênese *in vitro* e osseointegração *in vivo*. Células MC3T3-E1 (osteoblastos) cultivadas sobre o titânio revestido por Mg-HA promoveram diferenciação osteogênica *in vitro*, podendo melhorar a osseointegração do implante durante as fases iniciais de cicatrização óssea quando comparado com o revestimento de HA pura.

A adição de Mg estabiliza a fase beta, pois eleva a temperatura de transformação da fase alfa para valores acima de  $1500^{\circ}\text{C}$  (ZHANG, 2008). Além disso, a presença do Mg aumenta a densidade após compactação e conseqüentemente as propriedades mecânicas (RYU *et al.*, 2004).

O magnésio está intimamente relacionado com a mineralização dos tecidos calcificados e influencia indiretamente o metabolismo mineral. Seu papel, no entanto, não é totalmente conhecido. Tem sido sugerido que o magnésio estimula diretamente a proliferação osteoblástica, com efeito comparável ao da insulina, conhecida como fator de crescimento do osteoblasto (CAI *et al.*, 2010; SUCHANEK, 2004).

SADER *et al.*, (2009), cultivaram osteoblastos humanos (SaOs2) sobre pastilhas sinterizadas de TCP e TCMP e concluram que TCMP estimulou maior adesão e proliferação destas células em comparação com o comportamento do TCP. No entanto, alguns autores observaram que o Mg reduz a absorção do fosfato tricálcico (LI *et al.*, 2009), com influência negativa na formação óssea *in vivo* quando usado como enxerto em alvéolo dental (YASSUDA, 2012).

### 3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do  $\beta$ -TCP dopado com Mg ( $\beta$ -TCMP), com relação molar Mg/Ca de 0,15, em grânulos no reparo de defeitos de tamanhos críticos de 8 mm em calvária de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), associado ou não à membrana para regeneração óssea guiada. Assim, houve a produção, caracterização e análise do efeito da incorporação do íon Mg nas propriedades físico-químicas e biológicas do  $\beta$ -TCP, correlacionando essas propriedades com reação inflamatória e o reparo tecidual. Os objetivos específicos foram:

- Produzir os grânulos de  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP (a partir da síntese de Mg hidroxapatita cálcio-deficiente seguida de sinterização) com faixa granulométrica entre 250 $\mu$ m e 500 $\mu$ m;
- Caracterizar os materiais utilizando as técnicas de: microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de Raios-X (DRX), espectroscopia no infra-vermelho (FT-IR), teste de dissolução (Ca, Mg e P).
- Avaliar o efeito destes materiais sobre o reparo ósseo *in vivo*;
- Determinar as densidades de volume, com a histomorfometria, dos tecidos conjuntivo e ósseo e dos biomateriais.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1- Materiais

a) Grânulos de  $\beta$ -TCP– Fosfato tricálcico do tipo beta (MERCK® – Darnstadt – Alemanha, ref. n.º.1021439026). Lote K92901043, *data sheet* do fabricante: 1.02143.9026.

b) Grânulos de  $\beta$ -TCMP– Fosfato tricálcico do tipo beta contendo magnésio (relação molar Mg/Ca = 0,15).

### 4.2- Métodos

Como o  $\beta$ -TCP não pode ser obtido por precipitação em meio aquoso devido a sua instabilidade em água, este foi produzido através da sinterização de uma apatita cálcio deficiente a 1000°C. Após a temperatura de 1120°C é formada a fase  $\alpha$ -TCP (SADER *et al.*, 2009; YASSUDA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2008).

#### 4.2.1 Produção do pó de hidroxiapatita cálcio deficiente com magnésio

Assim como YASSUDA (2012), foi utilizado para a produção do pó o método úmido com a relação molar Mg/Ca de 0,15. A reação entre o hidróxido de cálcio [ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , 96% puro, MERCK®] a 1,3M, cloreto de Mg hexahidratado [ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , P.A., MERCK®] a 0,17M e a solução de ácido fosfórico [ $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 85% puro, MERCK®] a 2,8M, ocorreu com auxílio de bomba peristáltica, fazendo com que as soluções sejam incorporadas concomitantemente, a 50 ml de água, em pH 9, temperatura de 39°C por 3 h e controlando o pH com solução de hidróxido de amônia [ $\text{NH}_4\text{OH}$ , MERCK®] a 50%, com auxílio de um agitador mecânico. O produto da reação (cujo volume final foi de 250mL) foi deixado em suspensão, sob agitação e aquecimento a 39°C e pH 9, por 3 horas (tempo de digestão). Em seguida, este foi deixado *overnight* sob agitação magnética e à temperatura ambiente. O produto foi filtrado e lavado até a neutralização do pH (tirar o hidróxido de amônia) com 1 L de água ultra pura (Purelab, ELGA) até ser alcançado o pH 7 e foi para a estufa a 40° C (*overnight*), resultando em cerca de 15g de pó. O pó foi moído em gral e pistilo e peneirado (abaixo de 125 $\mu\text{m}$ ).

### Quantidades utilizadas para cada síntese

Ca(OH)<sub>2</sub> (MERCK<sup>®</sup>, Darmstadt, Germany) – 9,6316g

MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (MERCK<sup>®</sup>, Darmstadt, Germany) – 3,5022g

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - 19,18mL

### 4.2.2. Obtenção das pastilhas e produção dos grânulos de β-TCMP e β-TCP

Os diferentes materiais foram triturados e peneirados, sendo utilizados os pós com fração menor que 125 μm. Foram produzidas pastilhas de ambos os materiais (Figura 4.1) inserindo 0,3g dos respectivos pós em uma matriz de aço de 13 mm de diâmetro. As pastilhas foram obtidas após a compactação uniaxial dos pós a frio, sob tensão compressiva de 216MPa, por 1 minuto (prensa CARVER), com a utilização de ácido oleico (VETEC) como lubrificante. Após a remoção das pastilhas da matriz, elas foram inseridas na estufa a 37° C por pelo menos 24 h (para haver evaporação parcial do ácido oleico) antes de ser realizado o tratamento térmico com temperaturas controladas. O início do processo ocorreu com um aquecimento lento (6h) até alcançar a temperatura de 1000°C, permaneceram no forno nesta temperatura por mais 4h e depois voltaram a temperatura ambiente lentamente durante 6 h.

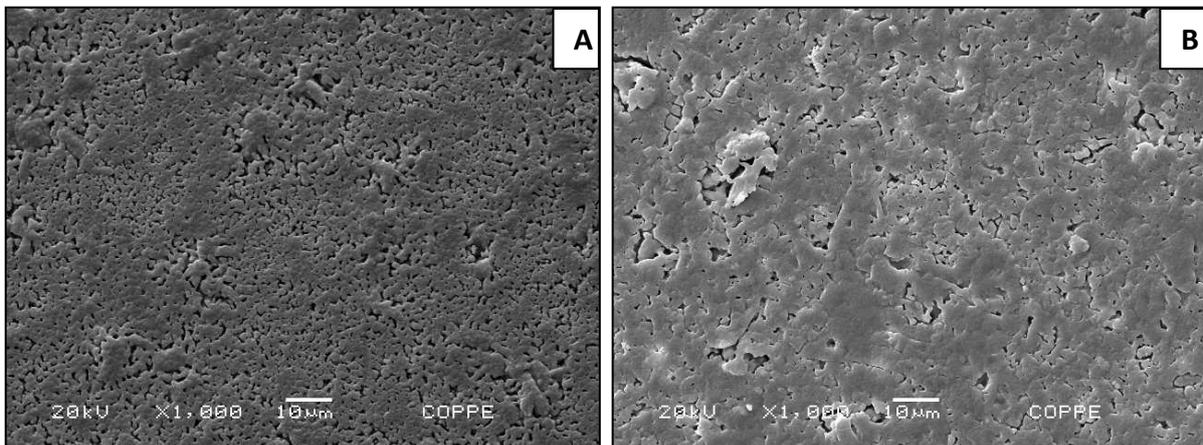


Figura 4.1 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura das pastilhas sinterizadas. A) β-TCP; B) β-TCMP.

Após o tratamento térmico, as pastilhas foram moídas em gral e pistilo para obtenção dos grânulos que foram selecionados, por meio de peneiramento, na faixa granulométrica entre 250 a 500μm. Esta faixa foi escolhida por apresentar um maior rendimento do biomaterial. Os grânulos foram esterilizados com radiação gama e então

caracterizados através de MEV, FT-IR, DRX, distribuição granulométrica e teste de degradação.

Todos os biomateriais utilizados (grânulos de  $\beta$ -TCMP e  $\beta$ -TCP) foram confeccionados em uma batelada para cada, sendo então esterilizados, caracterizados e enxertados. Foram manuseados assepticamente e com cuidado para não contaminá-los, antes ou durante a implantação.

#### 4.2.3. Determinação da faixa do tamanho dos grânulos

O rendimento do peneiramento dos grânulos em determinadas faixas é apresentado na Tabela 4.1. Com base nesses dados, foi escolhida a faixa do tamanho dos grânulos entre 250-500  $\mu\text{m}$  por ter o melhor rendimento percentual entre as diferentes faixas analisadas de ambos os biomateriais.

Tabela 4.1 - **Faixas dos tamanhos dos grânulos** – Diferentes faixas obtidas e os respectivos rendimentos

<b>Faixa (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Rendimento em % <math>\beta</math>-TCP</b>	<b>Rendimento em % <math>\beta</math>-TCMP</b>
<b>355-500</b>	35,9	35,5
<b>350-420</b>	14,4	32
<b>250-500</b>	46	84,6
<b>355-600</b>	47,5	40,3
<b>420-500</b>	24,1	10,2

#### 4.2.4. Caracterização físico-química dos grânulos de $\beta$ -TCMP e $\beta$ -TCP

##### 4.2.4.1 Difração de raios X (DRX)

A difração de raios X ocorre segundo a Lei de Bragg, a qual estabelece a relação entre o ângulo de difração e a distância entre os planos que a originaram, característicos de cada fase cristalina. Consiste em uma técnica importante para a caracterização de materiais, destacando-se: sua simplicidade e rapidez, a confiabilidade dos resultados obtidos (pois, o padrão de difração obtido é característico para cada fase cristalina), a possibilidade de análise de materiais compostos por uma mistura de fases e uma análise quantitativa dessas fases. Esta análise avalia a cristalinidade e composição das fases das

amostras. Foi utilizado o Difratorômetro de raios X Shimadzu 6000, alvo de cobre empregando radiação Cuka (30KV, 15mA);  $2\theta$ :  $0^\circ - 80^\circ$ .

#### **4.2.4.2. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR, *Fourier transformed infrared spectroscopy*)**

Nesta técnica, a radiação converte-se quando absorvida em energia de rotação molecular, sendo identificados os modos de vibração molecular em seus respectivos comprimentos de onda, característico de cada grupamento químico presente no material analisado, sendo realizada para identificar as bandas características do material.

A análise no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (PEMM/COPPE), em pastilhas de brometo de potássio (KBr, MERCK®), na seguinte proporção: 0,002g de pó sinterizado da amostra e 0,15g de KBr. As pastilhas foram confeccionadas sob tensão compressiva de 6 toneladas por 1 minuto (Perkin Elmer, Spectrum 100. Scan de 32, resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e região espectral de  $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ ).

#### **4.2.5. Caracterização morfológica dos grânulos de $\beta$ -TCMP e $\beta$ -TCP**

##### **4.2.5.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

O microscópio eletrônico de varredura é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação e resolução. A morfologia dos grânulos foi observada no equipamento MEV – JEOL, JSM 6460 LV, com espectroscopia por dispersão de energia (EDS – Thermo / System Sixm modelo 200), no Laboratório de Microscopia Eletrônica – PEMM/COPPE/UFRJ.

##### **4.2.5.2. Distribuição Granulométrica**

Foi utilizado o equipamento de sistema óptico Mastersizer 2000, do Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (PEMM/COPPE), para medir materiais entre 0,02 até 2000  $\mu\text{m}$  de tamanho (Malvern®, Inglaterra). O modelo para análise de dispersão Hydro 2000MU foi empregado, com a água como meio dispersante. Os

grânulos foram inseridos no meio dispersante que ficaram em movimento e um feixe de laser passou através do líquido para aferir o tamanho dos grânulos.

#### 4.2.6. Teste *in vitro* dos grânulos de $\beta$ -TCMP e $\beta$ -TCP

##### 4.2.6.1. Teste de dissolução

Esta análise foi realizada segundo as normas da ISO 10993-14 e 10993-9. Foram medidas as concentrações de Ca, Mg e P na solução em contato com os grânulos, através do fotômetro Diasys (Diagnostic Systems International), modelo Star Dust MC 15, no Laboratório de Biomateriais para Engenharia Óssea – PEMM/COPPE/UFRJ.

A solubilidade *in vitro* de um material com alto potencial como substituto ósseo é um parâmetro muito importante na avaliação do seu desempenho *in vivo*. Substituições na rede da apatita afetam sua cristalografia (tamanho de cristal, parâmetros de rede), bem como suas propriedades físico-químicas (solubilidade) e sua resposta às células e aos tecidos (INOUE *et al.*, 2004; SAKAE *et al.*, 2003; WOPENKA e PASTERIS, 2005; YAO *et al.*, 2009; ZYMAN *et al.*, 2009).

O experimento de dissolução foi dinâmico à 37°C e conduzido a pH=4 simulando as condições ácidas durante a reabsorção osteoclástica. Osteoclastos ativos, quando em contato com a superfície óssea calcificada, secretam H<sup>+</sup> dentro do espaço extracelular da lacuna de Howship e as bordas pregueadas dos osteoclastos podem regular o pH ao seu redor em torno de 4 a 5 (YAO *et al.*, 2009).

Para o preparo da amostra foi utilizado 1g de cada biomaterial (grânulos entre 315  $\mu$ m e 400  $\mu$ m), que ficaram em 120° C em estufa *overnight*, para 20 mL da solução teste (o pH é levado à 4 com ácido láctico). A solução teste foi preparada com 100mM NaCl; 45mM NaHCO<sub>3</sub> e 2mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Os períodos de dissolução utilizados foram 1, 2, 3 e 7 dias, em triplicata. Após estes períodos, as soluções foram filtradas com membrana Durapore (Millex em polietileno).

## 4.2.7. Grupos Experimentais, preparo dos animais e procedimento de implantação

### 4.2.7.1. Grupos Experimentais

A Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA) da Universidade Federal Fluminense (UFF) aprovou este estudo (nº 53/11), conforme Apêndice 10.1, e os protocolos *in vivo* seguiram as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Foram utilizados 78 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), fêmeas, com peso médio de 300g, mantidos em caixas com ração e água sem restrições, divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais: grupo I (coágulo, controle), grupo II (coágulo + membrana), grupo III (grânulos de  $\beta$ -TCP), grupo IV (grânulos de  $\beta$ -TCP + membrana), grupo V (grânulos de  $\beta$ -TCMP) e grupo VI (grânulos de  $\beta$ -TCMP + membrana), os quais foram mortos com 24 h (n=1/ grupo), 1 e 6 meses (n=6/grupo) após a implantação (Figura 4.2). A membrana utilizada foi a GenDerm<sup>®</sup>, membrana biológica de origem bovina, com espessura de 150 a 200  $\mu$ m, código 980 M (Baumer, São Paulo – Brasil), assim como DIMITRIOU *et al.* (2012).

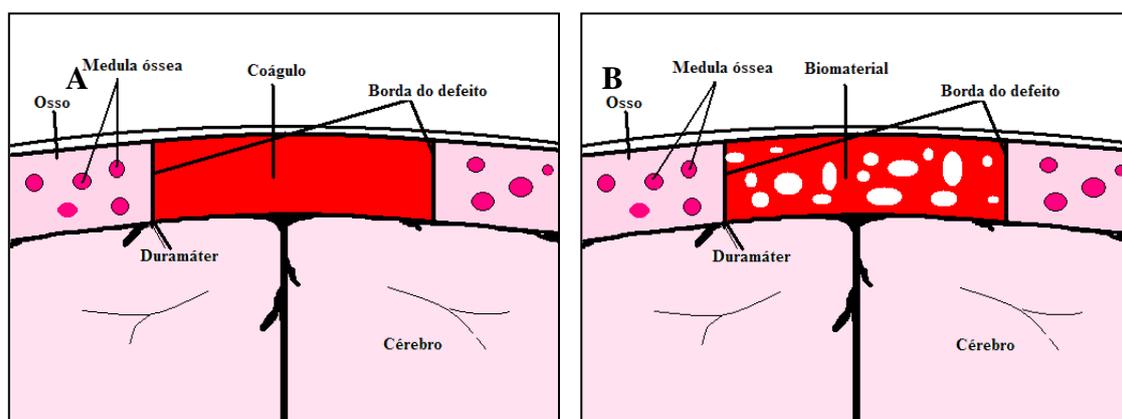


Figura 4.2: **Esquema do modelo experimental utilizado.** A) Defeito preenchido com coágulo e B) Grupos experimentais, defeito preenchido com os biomateriais.

### 4.2.7.2. Preparo dos animais e procedimento de implantação

Os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de 75mg/kg de hidrocloridrato de cetamina (Ketamina, Veltbrands, Brasil) e 1,5mL/kg de xilazina (Rompun, Veltbrands, Brasil), seguindo a proporção de 3:1. Após a anestesia foi realizada a tricotomia da região frontoparietal da cabeça do animal com auxílio de tesoura e lâmina de barbear e anti-sepsia na região com solução de clorexidina

degermante 0,2%, para evitar a presença de microrganismos patogênicos e infecção secundária que pudessem modificar a resposta tecidual local. Foi realizada uma incisão na pele até o plano esquelético, com uma lâmina de bisturi nº15, em formato de meia-lua na calota craniana e com auxílio de um descolador de periósteo de Molt, os retalhos de espessura total foram elevados, expondo amplamente a cortical óssea da região. A seguir, foi removido um fragmento da porção mediana dos ossos parietais, com auxílio de um motor cirúrgico da SIN<sup>®</sup> para instalação de implantes e um contra-ângulo reductor 16:1, por meio de uma broca trefina cirúrgica de 8 mm de diâmetro (Wellfare S.A) sob irrigação abundante e contínua com solução fisiológica. O fragmento ósseo foi removido com o auxílio do cinzel de Ohsenbein nº1 (SSWHITE<sup>®</sup>) e a dura-máter mantida íntegra. Após a remoção das tábuas corticais externa e interna, os defeitos ósseos com 8 mm de diâmetro foram preenchidos apenas com coágulo no grupo controle, enquanto nos grupos experimentais os defeitos foram preenchidos com os biomateriais delicadamente e sem compressão excessiva, umidificados com soro para melhor manipulação, com ou sem membrana. Os retalhos, a seguir, foram reposicionados e suturados com fio mono nylon 5.0 (Ethicon<sup>®</sup>, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) para proteger o leito cirúrgico e nova anti-sepsia local com clorexidina degermante 0,2% foi efetuada para proteção da ferida cirúrgica e evitar contaminação secundária (Figura 4.3).

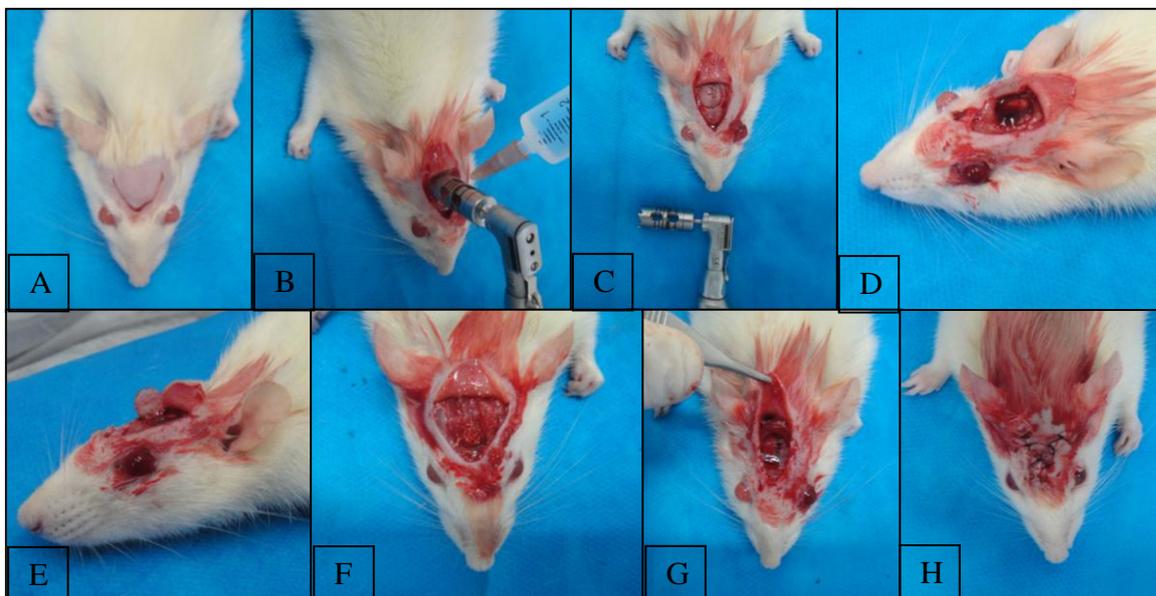


Figura 4.3: **Esquema do preparo dos animais e procedimento de implantação.** A) Incisão semilunar na região tricotomizada; B) Perfuração com fresa trefina de 8mm sob refrigeração; C) Trefina utilizada; D) Remoção das tábuas ósseas externa e interna; E) Fragmento ósseo deslocado; F) Biomaterial inserido; G) Membrana utilizada; H) Sutura.

## 4.2.8. Obtenção das biópsias e processamento histológico

### 4.2.8.1. Eutanásia e obtenção das amostras

A eutanásia foi realizada sob anestesia geral, através de punção cardíaca com seringa e agulha de 0,70mmx30mm, causando a morte do animal (Figura 4.4) nos devidos tempos previamente estabelecidos.



Figura 4.4 – Eutanásia através de punção cardíaca

Em seguida foram coletadas as calotas cranianas, mantendo margens de 2 mm de tecido ósseo em torno do defeito, tendo sido dissecadas, removido todo o tecido mole e acondicionadas em formol a 10% tamponado e posteriormente imergidas em solução de desmineralização (Alkimia, Brasil) por 48h (Figura 4.5). Porém, uma peça em cada grupo dos períodos de 1 e 6 meses foram acondicionadas em álcool 70%, para posterior inclusão em resina.

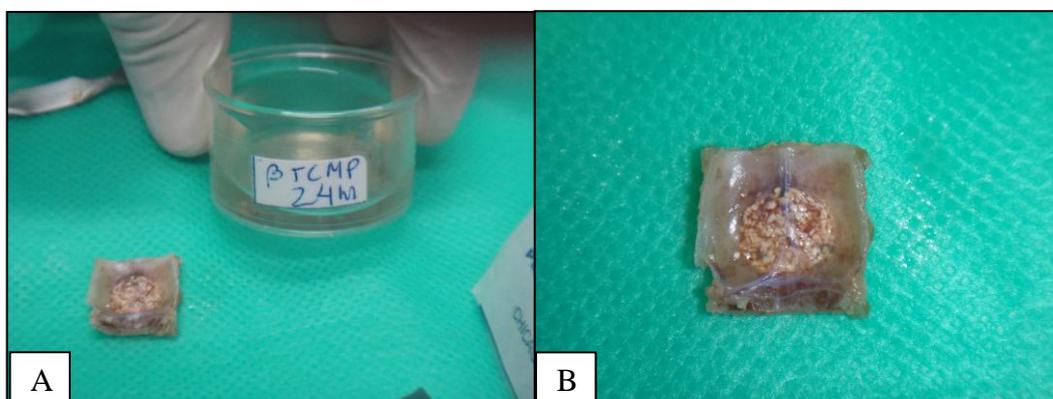


Figura 4.5 – Peça anatômica coletada - A) Frasco com formol a 10%; B) Peça anatômica em maior detalhe.

#### 4.2.8.2. Processamento histológico (inclusão em parafina e em resina)

As calotas cranianas foram desidratadas em banhos de álcool com concentrações de 70%, 80% e 100% sucessivamente, seguidos por banho em xilol. Em seguida, as peças anatômicas foram seccionadas ao meio (Figura 4.6), incluídas em parafina (para coloração com hematoxilina e eosina - HE) (Figura 4.7) e levadas ao micrótomo para obtenção de cortes de 5 µm de espessura no maior diâmetro laterolateral do defeito e 1 peça anatômica de cada grupo (dos períodos de 1 e 6 meses) foi incluída em resina (para análise do MEV e microscopia de luz polarizada) (Figura 4.8).

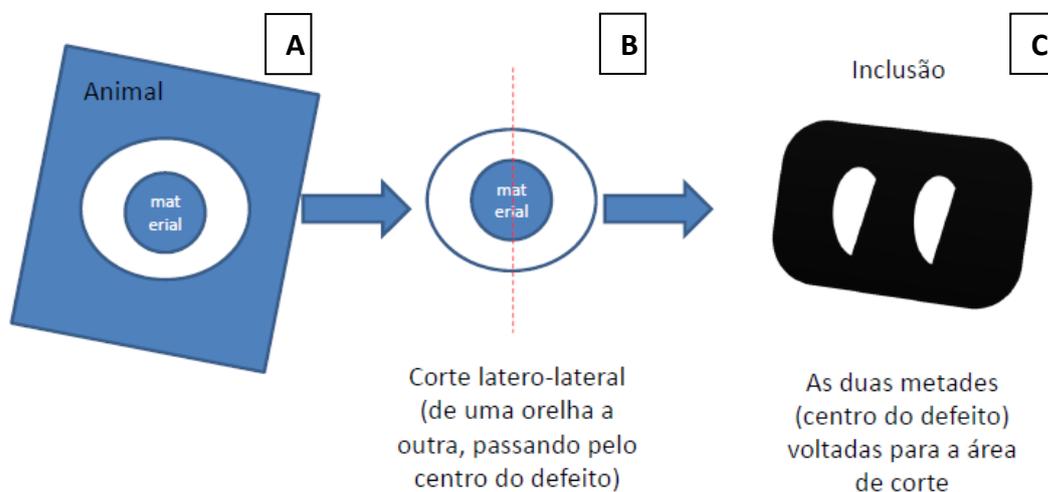


Figura 4.6 – **Esquema da peça anatômica coletada** - A) Calvária do animal apresentando o local onde o biomaterial foi inserido; B) Sentido do corte que foi realizado na peça anatômica coletada, dividindo-a em 2 metades iguais; C) Posição em que as duas metades foram incluídas na parafina, portanto os cortes histológicos foram realizados no centro, passando pelo maior diâmetro da região que recebeu o biomaterial .



Figura 4.7 – **Peças anatômicas incluídas em parafina.**

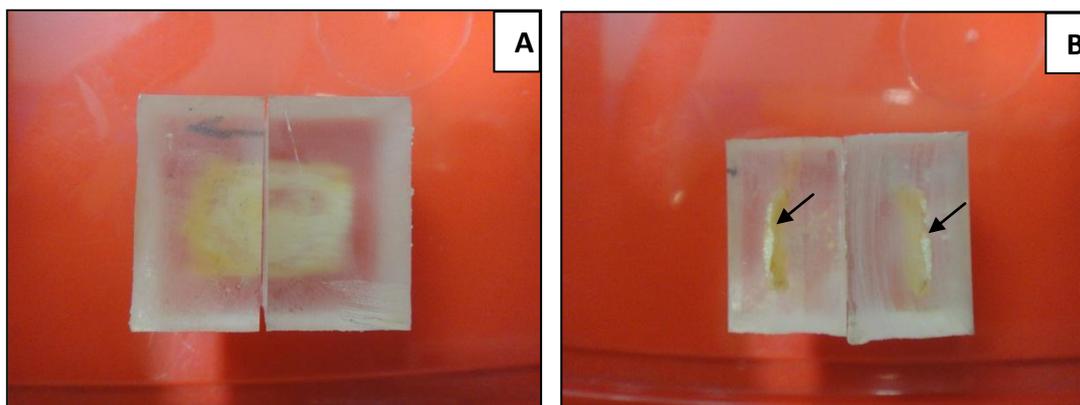


Figura 4.8 – **Peça anatômica incluída em resina** - A) Peça anatômica incluída em bloco de resina; B) Bloco de resina dividido ao meio com setas indicando o biomaterial inserido no defeito.

### **Inclusão em resina**

Conforme descrito na Tabela 4.2, as amostras fixadas em álcool 70% foram desidratadas com banhos sucessivos de álcool – álcool 70%, álcool 95% e álcool 100% absoluto – permanecendo dois dias em cada solução. As amostras foram então diafanizadas em solução de xilol por 24 horas, seguidas de banhos consecutivos em três soluções para completa impregnação. Solução 1: Metil Metacrilato e Di-Butil Ftalato, na proporção 3:1 – 7,5 ml de Metil Metacrilato e 2,5 ml de Di-Butil Ftalato para cada amostra por dois dias. Solução 2: 7,5 ml de Metil Metacrilato, 2,5 ml de di-Butil Ftalato e 0,1 g de Peróxido de Benzoíla para cada amostra, também por dois dias. Passados estes períodos, cada amostra foi incluída na solução 3: 7,5 ml de Metil Metacrilato, 2,5 ml di-Butil Ftalato e 0,25 g de Peróxido de Benzoíla, acomodadas em potes plásticos resistentes com tampa rosqueável (Labcom Materiais e Equipamentos) para minimizar a entrada de ar e consequente formação de bolhas. Os frascos foram então devidamente etiquetados, identificados e posicionados verticalmente, dentro de uma estufa de termômetro digital a 39°C por um período mínimo de sete dias, até a sua completa polimerização.

Tabela 4.2 – Sequencia de processamento da amostra não-desmineralizada

Soluções	Tempo	Temperatura
Álcool 70%	2 dias	26° C
Álcool 95%	2 dias	26° C
Álcool 100%	2 dias	26° C
Xilol	1 dia	26° C
<i>Solução 1</i> (7,5 ml de metil-metacrilato e 2,5 ml de di-butil-ftalato)	2 dias	4° C
<i>Solução 2</i> (7,5 ml de metil-metacrilato; 2,5 ml de di-butil-ftalato e 0,1 g de peróxido de benzoíla)	2 dias	4° C
<i>Solução 3</i> (7,5 ml de metil-metacrilato; 2,5 ml de di-butil-ftalato e 0,25 g de peróxido de benzoíla)	7 dias	39° C

Posteriormente, cada bloco contendo a amostra foi recortado no maior diâmetro, do sentido latero-lateral da amostra e então posicionadas num equipamento de cortes de precisão em baixa velocidade (Isomet<sup>®</sup>, Buehler) para cortes finos de aproximadamente 100 µm. Cada corte foi então, lavado, seco e colado (Araldite<sup>®</sup>, Brascola) sobre uma lâmina fosca de microscopia (Labor Slides). Após 4 horas de secagem, as lâminas sofreram acabamento e polimento com lixas d'água metalográficas de granulações decrescentes (600, 800, 1000 e 1200), na máquina lixadeira metalográfica PLO2D – Teclago, utilizando o calibrador de folga para aferir a espessura final aproximada de 30 µm. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LABA) da UFF para análise na Microscopia de Luz Polarizada.

#### 4.2.9. Análise das amostras

##### 4.2.9.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram incluídas doze peças anatômicas em resina, sendo uma de cada condição, nos períodos de 1 e 6 meses e avaliadas no MEV, para observar a morfologia do biomaterial e do reparo ósseo. As amostras foram recobertas com ouro na espessura de 12 nm.

Foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 200 da FEI Company, no modo baixo vácuo. Os valores de tensão e distância de trabalho se encontram na barra inferior das fotomicrografias. Everhart-Thornley detector (EFD), foi utilizado para captar os elétrons secundários. Esta análise foi realizada no DIMAT/INMETRO.

#### **4.2.9.2. Microscopia de luz polarizada**

A microscopia com luz polarizada com compensador é indicada para analisar as estruturas birrefringentes (estruturas anisotrópicas como o osso). Quando a luz penetra no osso produz um tipo de vibração luminosa que passa, ficando brilhante, enquanto o restante do material (resina e tecido conjuntivo) permanece escuro. Ao utilizar o compensador, há mudança na cor do osso neoformado. A utilização do campo claro facilita a identificação dos osteócitos.

Cortes com 30µm de espessura foram obtidos das peças anatômicas incluídas em resina. Estas amostras não-desmineralizadas foram avaliadas em microscopia de luz em campo claro, microscopia de luz polarizada e microscopia de luz polarizada com compensador para evidenciar a birrefringência do tecido ósseo e das fibras colágenas (microscópio Zeiss-Axioplan, Alemanha – Objetiva 10x/0,30 Acroplan, Neofluar). As imagens capturadas (Evolution MP Color 5.0, Media Cybernetics, Canadá) permitiram avaliações qualitativas do osso neoformado e sua interface com o osso pré-existente e os biomateriais. Esta análise foi realizada no Laboratório de Biomineralização - ICB/CCS/UFRJ.

Antes da colocação da lâmina na platina do microscópio, sua limpeza foi feita com lenço de papel para a remoção de impurezas. A iluminação do microscópio foi mantida constante durante todas as sessões de captura de imagem e a objetiva escolhida para a captura foi a de 10x por propiciar um bom campo de observação, além de permitir o detalhamento morfológico do tecido.

#### **4.2.9.3. Microscopia de luz**

As fotomicrografias dos cortes histológicos corados (hematoxilina e eosina, HE) incluídos em parafina foram obtidas com uma câmara digital, acoplada a um

microscópio trinocular de luz DM 5000B (Leica, Alemanha), com uma objetiva de 20x, sendo armazenadas digitalmente, no DIPRO/INMETRO. Foram fotografados dez campos distribuídos sequencialmente sem haver sobreposições dos mesmos, percorrendo todo o defeito cirúrgico (Figura 4.9) das 66 amostras, totalizando 660 fotografias.

Antes da colocação da lâmina na platina do microscópio, sua limpeza foi feita com lenço de papel para a remoção de impurezas. A iluminação do microscópio foi mantida constante durante todas as sessões de captura de imagem e a objetiva escolhida para a captura foi a de 20x por propiciar um bom campo de observação, além de permitir o detalhamento morfológico do tecido.

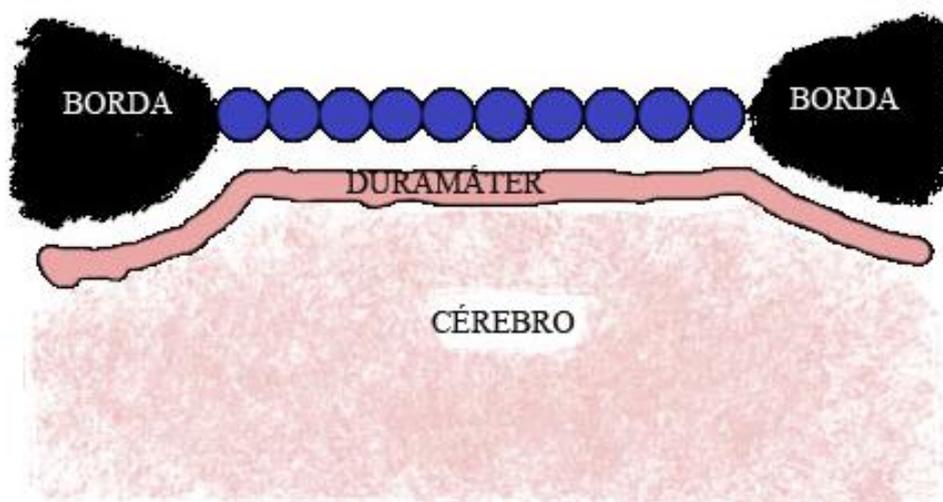


Figura 4.9- **Representação esquemática das imagens capturadas com o microscópio.** Os círculos em azul foram os campos fotografados nos cortes histológicos.

#### **4.2.10. Análise histomorfométrica**

A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio do programa Image Pro Plus<sup>®</sup> (Media Cybernetics, L. P., Silver Spring, MD), utilizando grade de 42 pontos (Figura 4.10) sobreposta nas imagens, para quantificar manualmente tecido conjuntivo, tecido ósseo neoformado e biomaterial. Os dados foram expressos como densidade de volume (%), de acordo com protocolo previamente descrito (MANDARIN-DE-LACERDA, 2003).

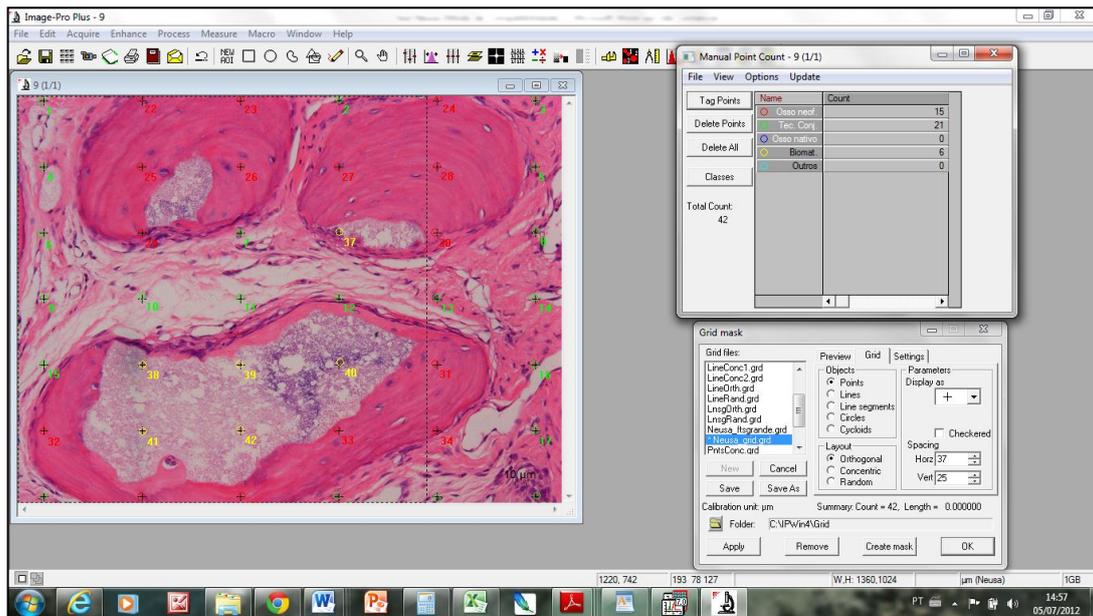


Figura 4.10- Tela do programa Image-Pro Plus®. A avaliação das áreas de tecido conjuntivo, osso e biomaterial, foram realizadas com o auxílio da grade de 42 pontos sobre a imagem.

#### 4.2.11. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O teste de D'Agostino-Pearson mostrou que os valores não seguiram uma distribuição normal. Assim, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e de comparação múltipla de Dunn, considerando as diferenças significativas se  $p < 0,05$ . Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6.00 para Windows, 2012, GraphPad Software, Inc., San Diego California, EUA ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização físico-química dos grânulos de $\beta$ -TCMP e $\beta$ -TCP

#### 5.1.1 Difração de raios X (DRX)

A Figura 5.1 apresenta os picos encontrados no difratograma característicos de  $\beta$ -TCP, quando comparados com a biblioteca de padrões de difração conhecida (ficha JCPDS 09-0169). Com a incorporação de Mg, houve deslocamento nos picos de difração, confirmando a presença de  $\beta$ -TCMP, correspondente à ficha JCPDS 13-0404.

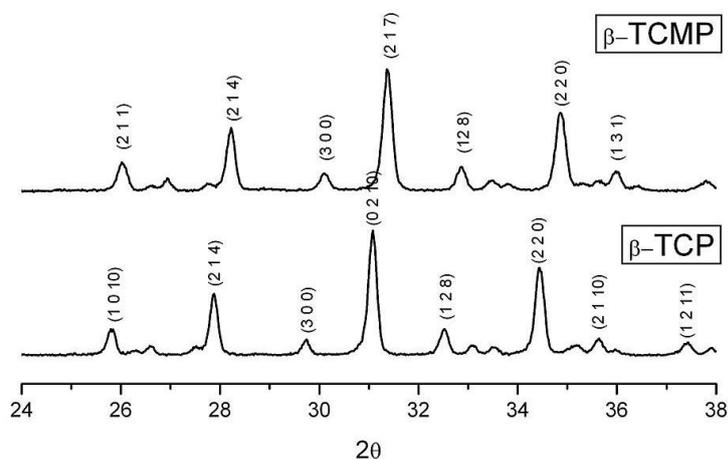


Figura 5.1: Espectros de DRX dos grânulos  $\beta$ -TCMP e  $\beta$ -TCP (Detalhe entre 24° e 30°).

#### 5.1.2. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR, *Fourier transformed infrared spectroscopy*)

A Figura 5.2 mostra os espectros de FT-IR do  $\beta$ -TCMP e  $\beta$ -TCP, onde bandas de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) em 1035, 603 e 564  $\text{cm}^{-1}$  características dos fosfatos foram identificadas em ambos os grânulos. Pequenas variações na intensidade e no comprimento de onda de uma determinada banda foram encontradas, mas não foram associadas a mudanças físico-químicas significativas.

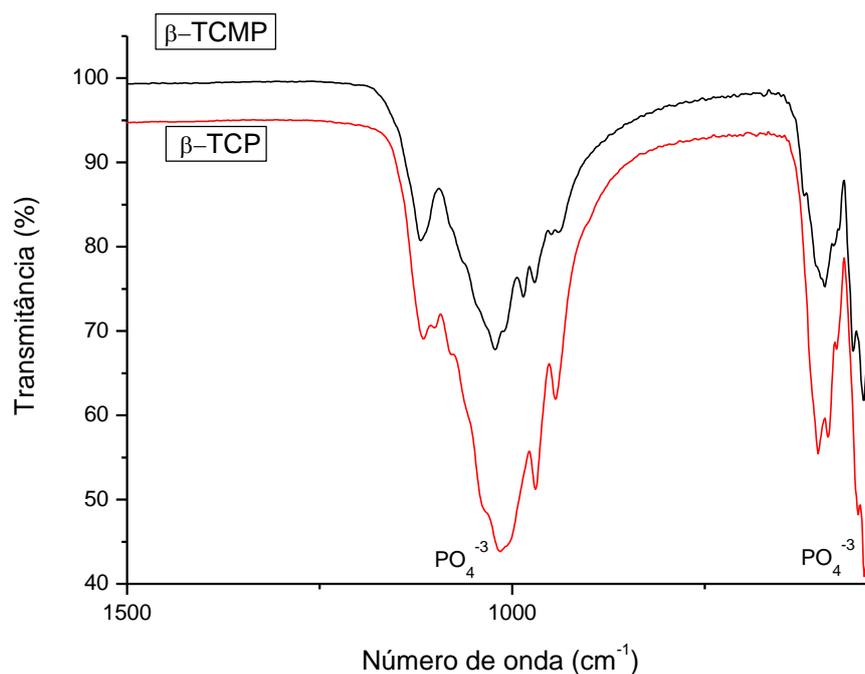


Figura 5.2: Detalhes dos espectros de FT-IR dos grânulos  $\beta$ -TCMP e  $\beta$ -TCP

## 5.2. Caracterização morfológica dos grânulos de $\beta$ -TCMP e $\beta$ -TCP

### 5.2.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As pastilhas de  $\beta$ -TCMP apresentaram contração volumétrica maior quando comparadas às de  $\beta$ -TCP. Segundo SADER *et al.* (2009), isto ocorre devido às diferenças na densificação e variações na microporosidade superficial, havendo uma microporosidade menor nos grânulos de  $\beta$ -TCMP.

Observando as imagens da Figura 5.3, com aumento de 5000x parece que a sinterização foi mais efetiva no  $\beta$ -TCMP, pois apresenta mais áreas contínuas, enquanto que a de  $\beta$ -TCP ainda tem pouca ligação entre as partículas (daí a maior porosidade da  $\beta$ -TCP).

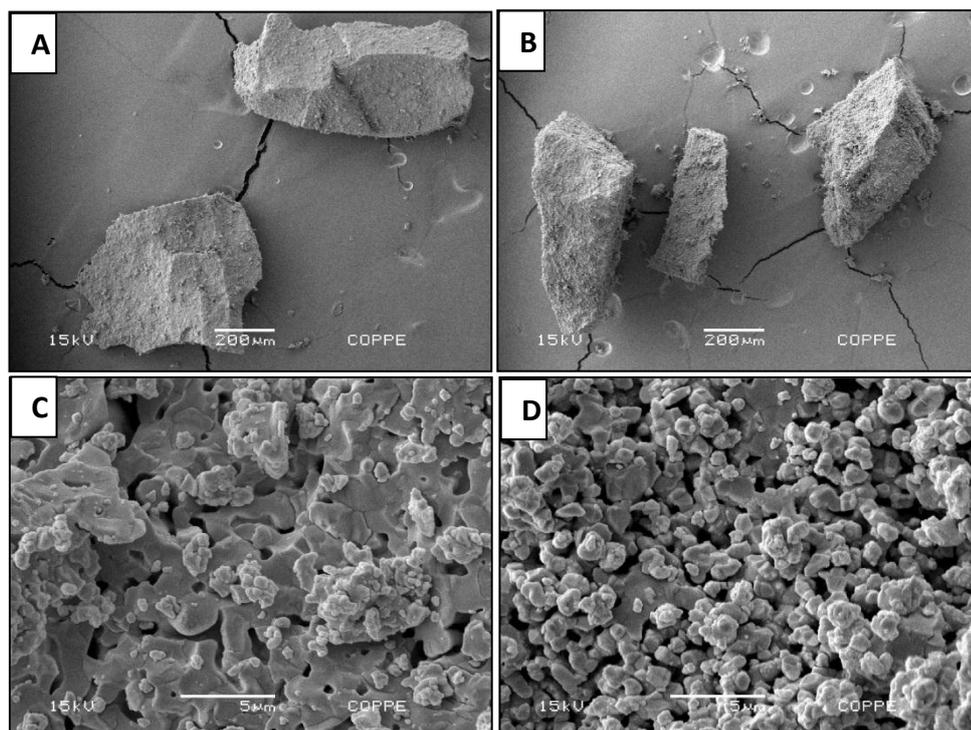


Figura 5.3 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura dos grânulos. A) Grânulos de  $\beta$ -TCMP (x80); B) Grânulos de  $\beta$ -TCP (x80); C) Grânulos de  $\beta$ -TCMP apresentando menor microporosidade (x5000); D) Grânulos de  $\beta$ -TCP (x5000).

### 5.2.2. Distribuição Granulométrica

A Tabela 5.1 apresenta os resultados da distribuição granulométrica (percentual de volume para três faixas de tamanho dos grânulos e o diâmetro esférico equivalente do tamanho do grânulo), para ambos os biomateriais. Na faixa entre 150-1900  $\mu\text{m}$ , tanto o  $\beta$ -TCP como o  $\beta$ -TCMP apresentaram comportamento semelhante, com o valor mediano da distribuição granulométrica,  $d_{50}$ , igual a 465 e 462  $\mu\text{m}$  para  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP, respectivamente. Como o peneiramento foi realizado para obter um diâmetro menor que 500  $\mu\text{m}$ , é possível sugerir que os aglomerados não foram adequadamente dispersos durante a preparação da amostra e/ou alguns grânulos passaram através dos poros da peneira com o seu menor diâmetro. A fração de volume de 1,48%, correspondendo à faixa de tamanho de grânulo de 30-100  $\mu\text{m}$ , foi encontrada em ambos os materiais. A maior diferença de tamanho observada ocorreu nos grânulos de  $\beta$ -TCP. Neste material, 3,52% do volume total foi composto de grânulos com 1-30  $\mu\text{m}$  de diâmetro, resultando em uma área específica superficial (0,0686  $\text{m}^2/\text{g}$ ) quatro vezes

maior que nos grânulos de  $\beta$ -TCMP ( $0,0156 \text{ m}^2/\text{g}$ ) . Provavelmente, esta faixa de tamanho de grânulo (1-30  $\mu\text{m}$ ), surgiu em consequência da menor densidade dos grânulos de  $\beta$ -TCP, causando um esfrelamento durante o preparo da amostra, cujos grânulos ficaram na superfície daqueles acima de 250 $\mu\text{m}$  durante o peneiramento.

A análise de distribuição granulométrica comprovou que 53,8% e 55,5% do tamanho dos grânulos estavam na faixa entre 250  $\mu\text{m}$  e 500  $\mu\text{m}$  para o  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP, respectivamente. Aproximadamente 35% de ambos os materiais estavam entre 500  $\mu\text{m}$  e 850  $\mu\text{m}$ .

Tabela 5.1 – **Análise de distribuição granulométrica** (percentual de volume e diâmetro esférico equivalente dos grânulos) - para ambos os biomateriais.

	Volume (%) para as diferentes faixas de tamanho de grânulo			Diâmetros dos grânulos ( $\mu\text{m}$ ) entre 150-1900 $\mu\text{m}$		
	1-30 $\mu\text{m}$	30-100 $\mu\text{m}$	150-1900 $\mu\text{m}$	$d_{10}$	$d_{50}$	$d_{90}$
<b><math>\beta</math>-TCP</b>	3,5	1,5	95	241.3	465.1	849.3
<b><math>\beta</math>-TCMP</b>	-	1,5	98,5	251.6	462.2	860.8

### 5.3. Teste *in vitro* dos grânulos de $\beta$ -TCMP e $\beta$ -TCP

#### 5.3.1. Teste de dissolução

As concentrações dos íons de Ca, Mg e P liberados quando os grânulos de  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP, com relação molar de Mg/Ca = 0,15, foram colocados em uma solução ácida pH = 4, em meio dinâmico a 37°C, por 1, 2, 3 e 7 dias, em triplicatas, podem ser vistas nas Figuras 5.4, 5.5 e 5.6.

No início do processo de imersão (primeiras 24h), a dissolução do Ca observada nos grânulos de  $\beta$ -TCP é menor (menos que a metade) do que nos grânulos de  $\beta$ -TCMP, como visto na Figura 5.4. Porém durante os períodos avaliados, no  $\beta$ -TCP a dissolução é contínua e aumenta progressivamente até o 7º. dia. No 2º. dia de análise o teor de Ca presente na solução onde os grânulos de  $\beta$ -TCMP encontravam-se imersos, diminui

cerca de 65%, permanecendo assim em torno da metade do teor de Ca encontrado na solução do  $\beta$ -TCP, neste mesmo período. A partir do 2º dia, a dissolução aumenta progressivamente, porém no último dia (7º. dia) o teor de Ca é cerca de 30% menor do que o observado na solução com os grânulos de  $\beta$ -TCP.

A Tabela 5.2 apresenta os resultados da dissolução do Ca (ppm), dos grânulos de  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP.

Tabela 5.2 – Dissolução do Ca (ppm) - para ambos os biomateriais.

<b>Períodos</b>	<b><math>\beta</math>-TCP – Ca (ppm)</b>	<b><math>\beta</math>-TCMP – Ca (ppm)</b>
1 dia	181,6 $\pm$ 0,4	470,1 $\pm$ 5,2
2 dias	446 $\pm$ 3,4	168,1 $\pm$ 4,8
3 dias	636,0 $\pm$ 34,1	231,6 $\pm$ 4
7 dias	1197 $\pm$ 8,5	807,2 $\pm$ 2,8

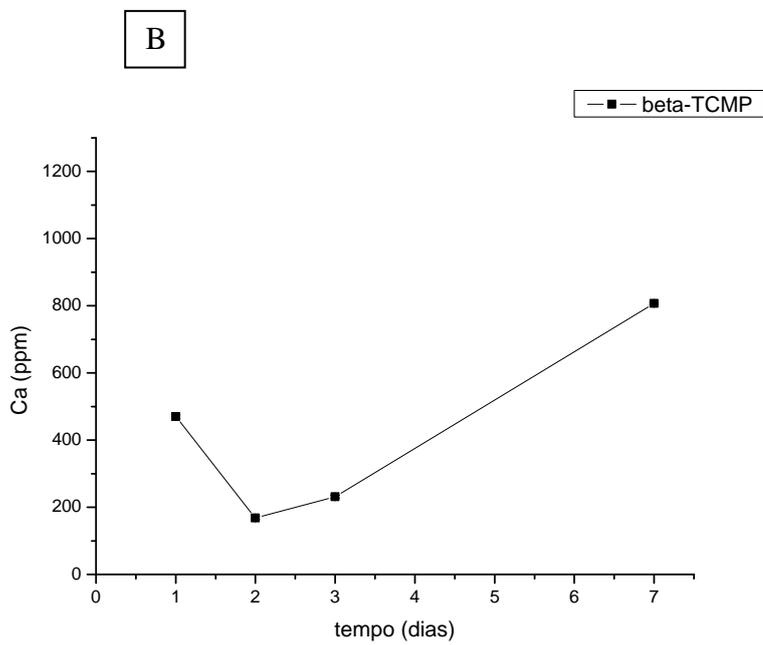
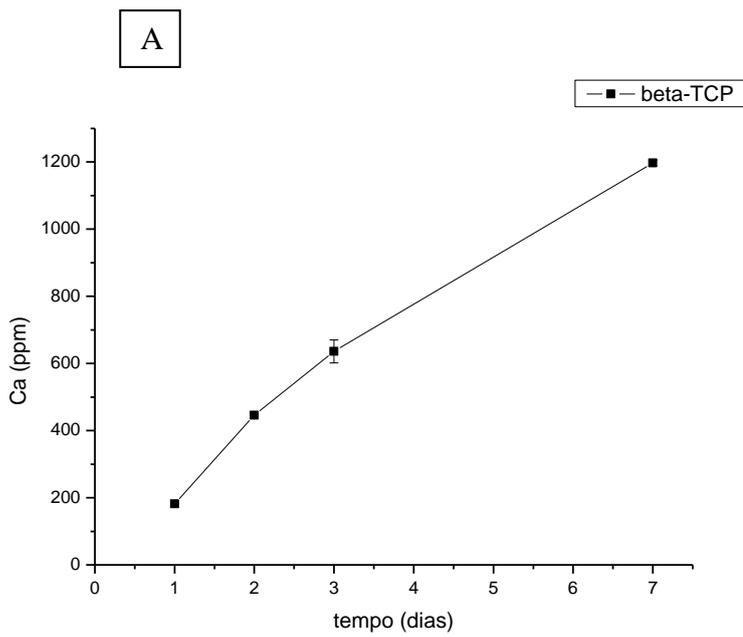


Figura 5.4 – Concentrações (ppm) do íon Ca liberado na solução a partir dos grânulos. A) Grânulos de  $\beta$ -TCP; B) Grânulos de  $\beta$ -TCMP.

Nas primeiras 24h, a dissolução do Mg observada nos grânulos de grânulos de  $\beta$ -TCP é cerca de 8 vezes maior do que nos grânulos de  $\beta$ -TCMP, como visto na Figura 5.5. Porém, a quantidade de Mg liberada diminui abruptamente no 2º. dia (cerca de 7 vezes), aumentando em torno de 20% no 3º. dia, alcançando sua saturação até o 7º. dia. A dissolução do Mg nos grânulos de  $\beta$ -TCMP aumentou progressivamente até o 3º. dia, quando a quantidade do Mg é 13 vezes maior que no 1º. dia, alcançando sua saturação até o 7º. dia.

A Tabela 5.3 apresenta os resultados da dissolução do Mg (ppm), dos grânulos de  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP.

Tabela 5.3 – Dissolução do Mg (ppm) - para ambos os biomateriais.

<b>Períodos</b>	<b><math>\beta</math>-TCP – Mg (ppm)</b>	<b><math>\beta</math>-TCMP – Mg (ppm)</b>
1 dia	107,6 $\pm$ 6,5	13,6 $\pm$ 0,6
2 dias	16,5 $\pm$ 2,8	146,9 $\pm$ 4
3 dias	20 $\pm$ 2,2	169,8 $\pm$ 24,3
7 dias	18 $\pm$ 3	171,9 $\pm$ 4

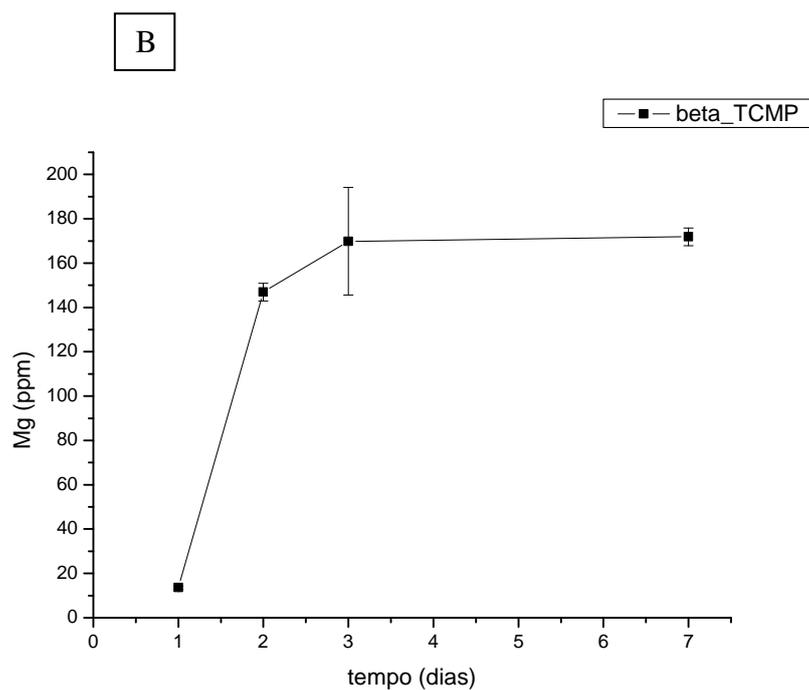
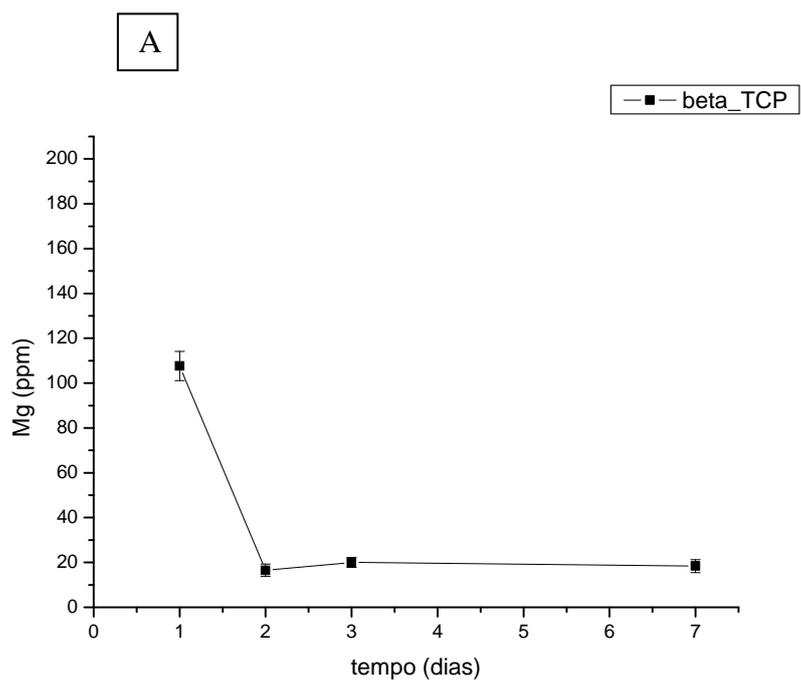


Figura 5.5 – Concentrações (ppm) do íon Mg liberado na solução a partir dos grânulos. A) Grânulos de  $\beta$ -TCP; B) Grânulos de  $\beta$ -TCMP.

Como apresentado na Figura 5.6, em 24h a dissolução do P dos grânulos de  $\beta$ -TCMP é quase que o dobro do encontrado no 3º. dia, quando alcança a sua saturação. Com os grânulos de  $\beta$ -TCP é observado um intenso aumento da dissolução até o 3º. dia, quando inicia um declínio até o 7º. dia.

A Tabela 5.4 apresenta os resultados da dissolução do P (ppm), dos grânulos de  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP.

Tabela 5.4 – **Dissolução do P (ppm)** - para ambos os biomateriais.

<b>Períodos</b>	<b><math>\beta</math>-TCP – P (ppm)</b>	<b><math>\beta</math>-TCMP – P (ppm)</b>
1 dia	66,3 $\pm$ 8,9	158,5 $\pm$ 7,6
2 dias	212,9 $\pm$ 6,8	82,5 $\pm$ 4,4
3 dias	221,5 $\pm$ 21	74,2 $\pm$ 6,4
7 dias	173,7 $\pm$ 7,3	72,1 $\pm$ 2,2

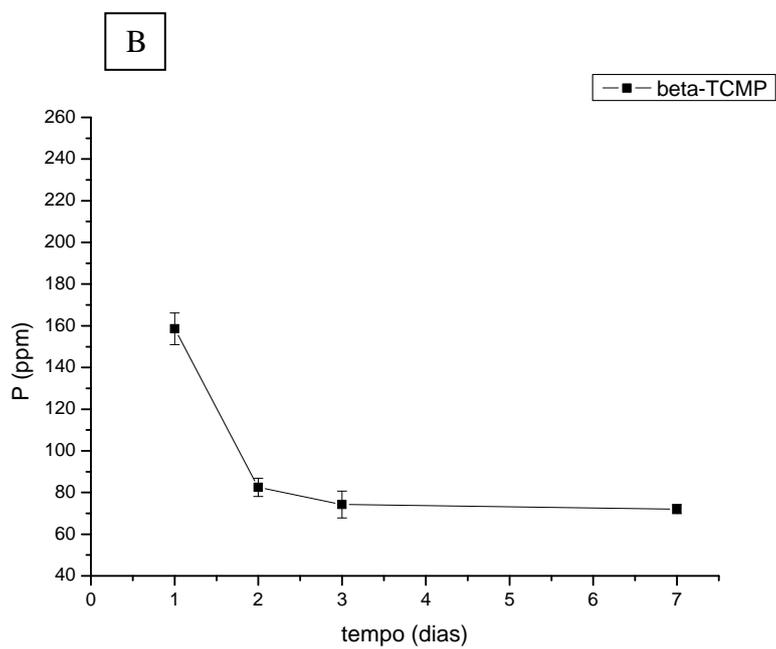
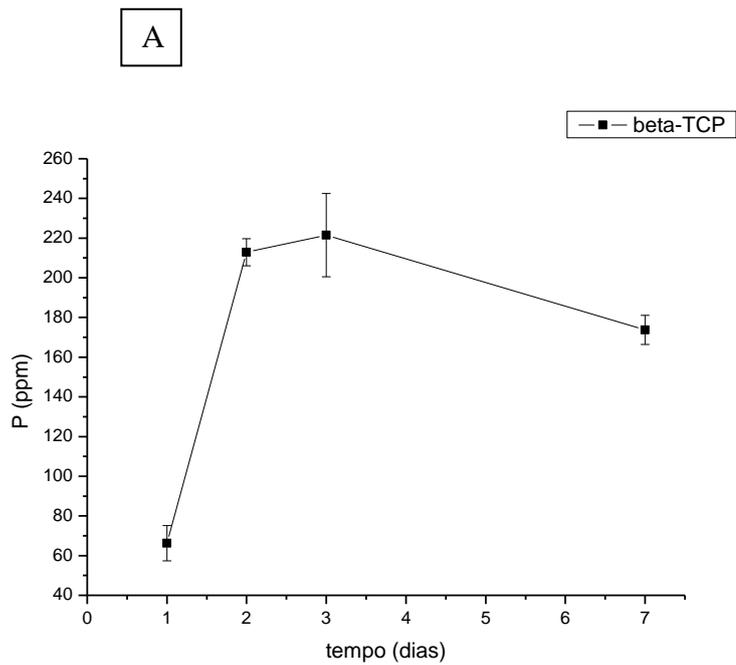


Figura 5.6 – Concentrações (ppm) do íon P liberado na solução a partir dos grânulos. A) Grânulos de  $\beta$ -TCP; B) Grânulos de  $\beta$ -TCMP.

## **5.4. Análise das amostras**

### **5.4.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A análise das amostras nos vários grupos experimentais mostrou os seguintes estágios da morfologia do biomaterial e do reparo ósseo, nos períodos de 1 mês (Figura 5.7) e de 6 meses (Figura 5.8):

#### **1 mês**

Em todos os grupos, há área de osso neoformado na proximidade da borda do defeito. Em algumas amostras dos grupos onde a membrana foi utilizada, esta é observada. Nos grupos  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP (com ou sem membrana), há osso neoformado perifericamente ao biomaterial, em proximidade com as bordas. Mas, apenas nos grupos sem membrana, há pequenos grânulos, sugerindo que estejam sendo absorvidos, dentro do osso neoformado na proximidade da borda do defeito.

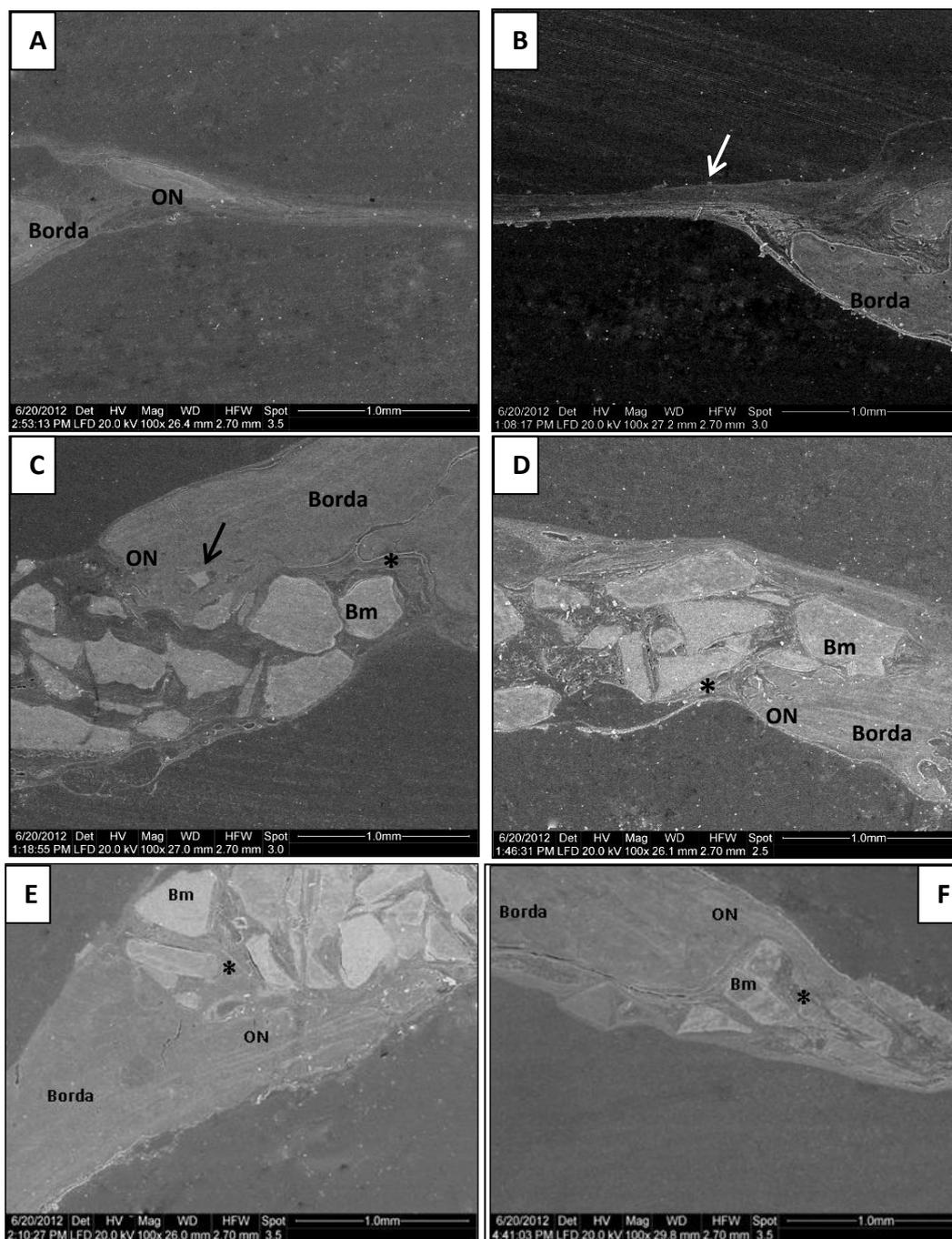


Figura 5.7 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura do defeito ósseo no período experimental de 1 mês (x100). A) Coágulo - Na borda do defeito, tecido ósseo neoformado (ON); B) Membrana - Membrana (seta) é observada; C)  $\beta$ -TCP – Tecido ósseo neoformado (ON) na borda do defeito e perifericamente (\*) ao biomaterial (Bm). Alguns grânulos (seta) se apresentam incluídos dentro do osso neoformado; D)  $\beta$ -TCP + membrana - Tecido ósseo neoformado (ON) na borda do defeito e perifericamente (\*) ao biomaterial (Bm); E)  $\beta$ -TCMP e F)  $\beta$ -TCMP + membrana - Biomaterial (Bm), com aparente redução no tamanho do grânulo, tecido ósseo neoformado (ON) próximo à borda do defeito e circundando os grânulos (\*) que estão mais próximos à borda.

## **6 meses**

Em todos os grupos, há área de osso neoformado na proximidade da borda do defeito. Nos grupos  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP (com ou sem membrana), há osso neoformado perifericamente ao biomaterial, em proximidade com as bordas. Mas, apenas nos grupos com membrana, há pequenos grânulos, sugerindo que estejam sendo absorvidos, dentro do osso neoformado na proximidade da borda do defeito e no grupo  $\beta$ -TCMP + membrana há osso neoformado no centro do defeito.

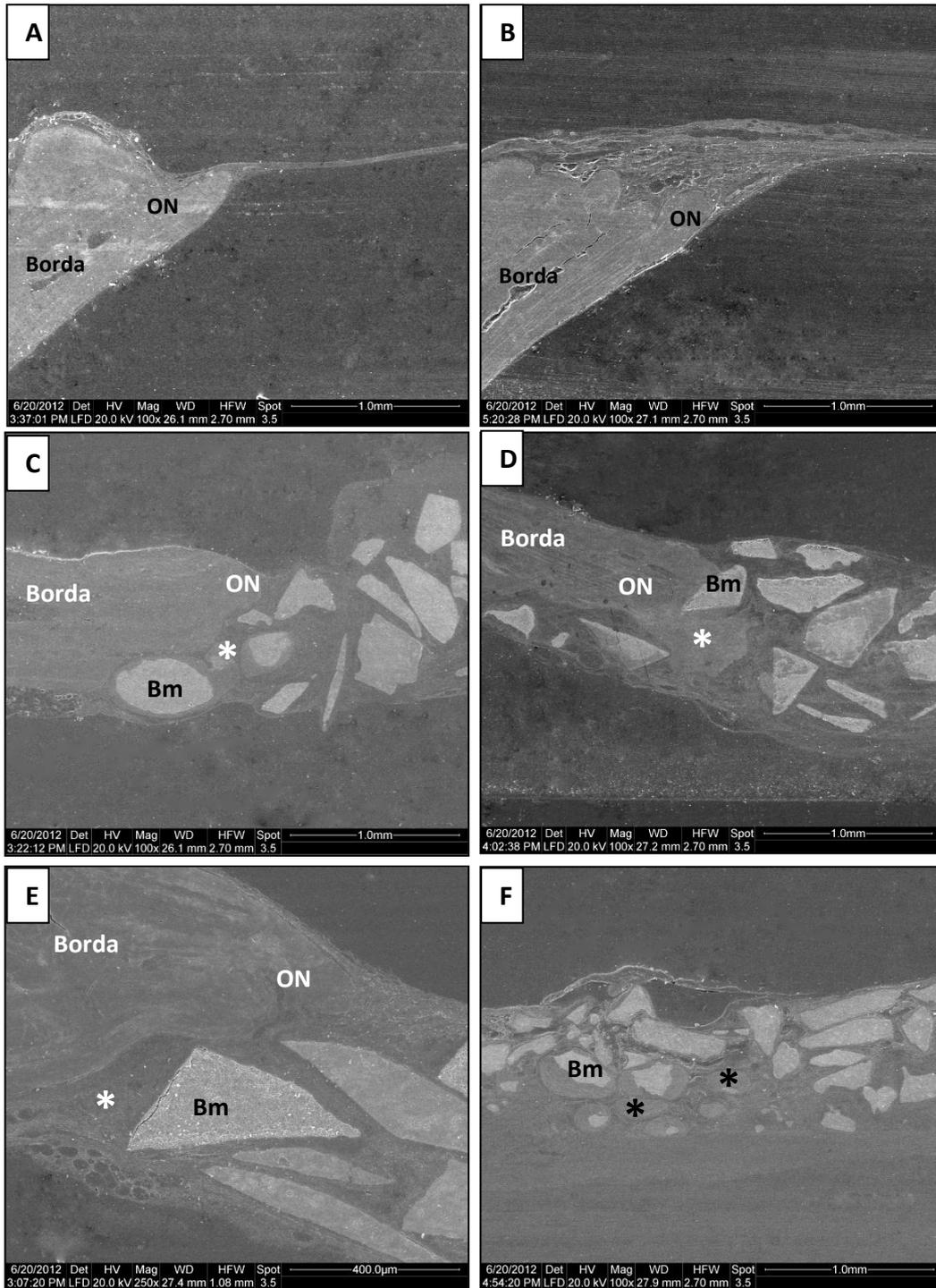


Figura 5.8 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura do defeito ósseo no período experimental de 6 meses. A) Coágulo e B) Membrana (x100) - Na borda do defeito, tecido ósseo neoformado (ON); C)  $\beta$ -TCP (x100); D)  $\beta$ -TCP + membrana (x100); E)  $\beta$ -TCMP (x250) e F)  $\beta$ -TCMP + membrana (x100) - Biomaterial (Bm), com aparente redução no tamanho do grânulo, tecido ósseo neoformado (ON) próximo à borda do defeito e circundando os grânulos (\*) que estão mais próximos à borda, porém na Figura F, a área representa o centro do defeito.

#### 5.4.2. Microscopia de luz polarizada

As amostras não-desmineralizadas foram avaliadas através da microscopia de luz em campo claro (Figura 5.9 A) e da microscopia de polarização com (Figura 5.9 B) e sem compensador (Figura 5.9 C). Os resultados mais relevantes estão descritos abaixo, de acordo com os períodos experimentais estudados.

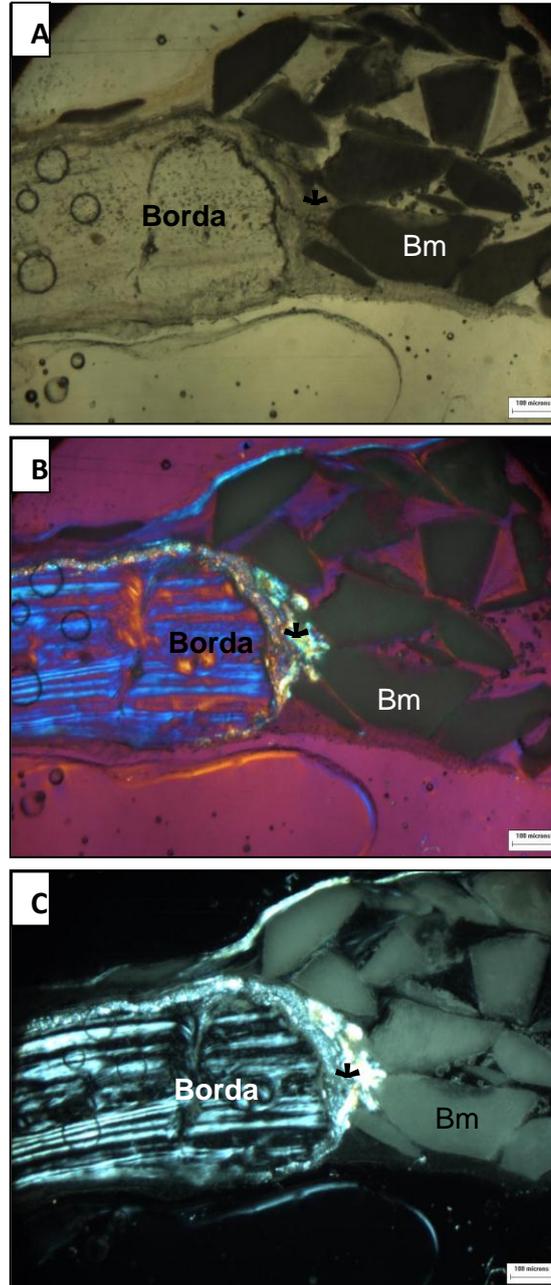


Figura 5.9 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês –  $\beta$ -TCMP (x10). Na borda do defeito, tecido ósseo neoformado (\*) similar ao osso pré-existente, porém não segue a mesma direção e organização e grânulos do biomaterial (Bm). A) Microscopia de luz polarizada com campo claro; B) Microscopia de luz polarizada com compensador; C) Microscopia de luz polarizada sem compensador. e tecido conjuntivo (TC) preenchendo o defeito; no permeio dos grânulos de biomaterial (BM).

## **1 mês**

Nota-se que a birrefringência do osso neoformado é similar à do osso pré-existente, em todos os grupos estudados, porém não segue a mesma direção e organização do osso nativo (Figuras 5.10 A e B). A crescente formação de tecido mineralizado ocorre durante os períodos observados e em todos os grupos, seguindo a orientação das fibras colágenas (Figuras 5.10 C e D) presentes no tecido conjuntivo.

A neoformação óssea é identificada com uma pequena quantidade de cristais organizados, sobretudo nos grupos com biomaterial (Figuras 5.10 E e F).

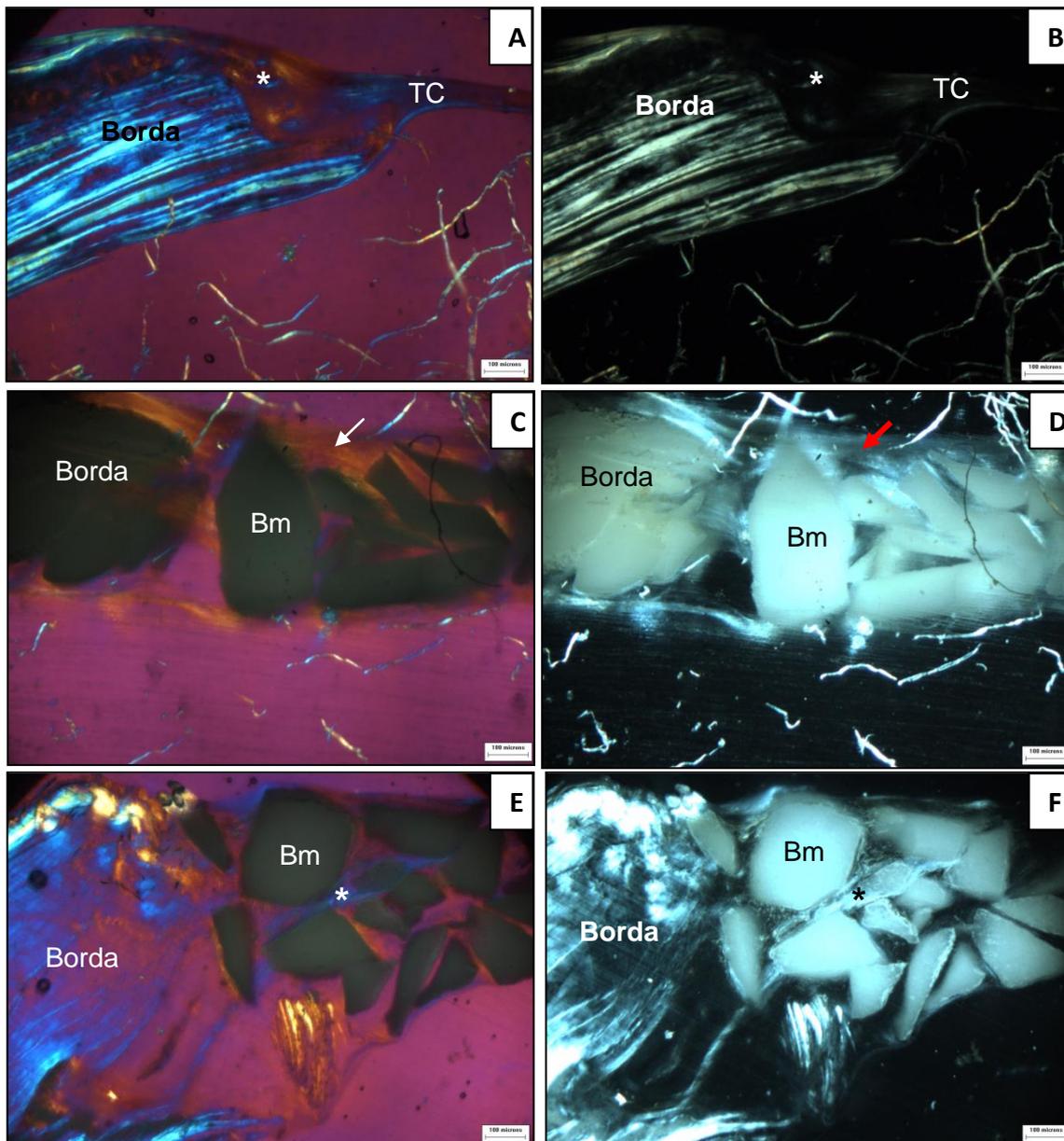


Figura 5.10 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês –(x10). A e B) **Grupo coágulo** - Na borda do defeito, tecido ósseo neoformado (\*) similar ao osso pré-existente, porém não segue a mesma direção e organização e tecido conjuntivo (TC) preenchendo o defeito; C e D) **Grupo  $\beta$ -TCP** - Crescente formação de tecido mineralizado, observado pela orientação das fibras colágenas (seta), entre os grânulos do biomaterial (BM); E e F) **Grupo  $\beta$ -TCP + membrana** - Cristais organizados, sugerindo presença de osso neoformado (\*), no permeio dos grânulos de biomaterial (BM).

## **6 meses**

Observamos pequena quantidade de cristais organizados, sugerindo presença de osso neoformado, evidenciado com a semelhante birrefringência ao osso pré-existente, indicando sua mineralização tanto no borda do defeito (Figuras 5.11 A e B), como também permeando os grânulos (Figuras 5.11 C e D).

A densidade de osso neoformado aumentou no período de 6 meses, sempre na direção osso pré-existente/biomaterial. Foi também identificado a presença de diferentes direções das fibras colágenas que se dirigem aos grânulos, sugerindo a osteocondução. No período de 6 meses houve maior formação de tecido ósseo permeando os grânulos, tanto próximo à borda quanto no centro do defeito (Figuras 5.11 E e F), naqueles grupos com membrana.

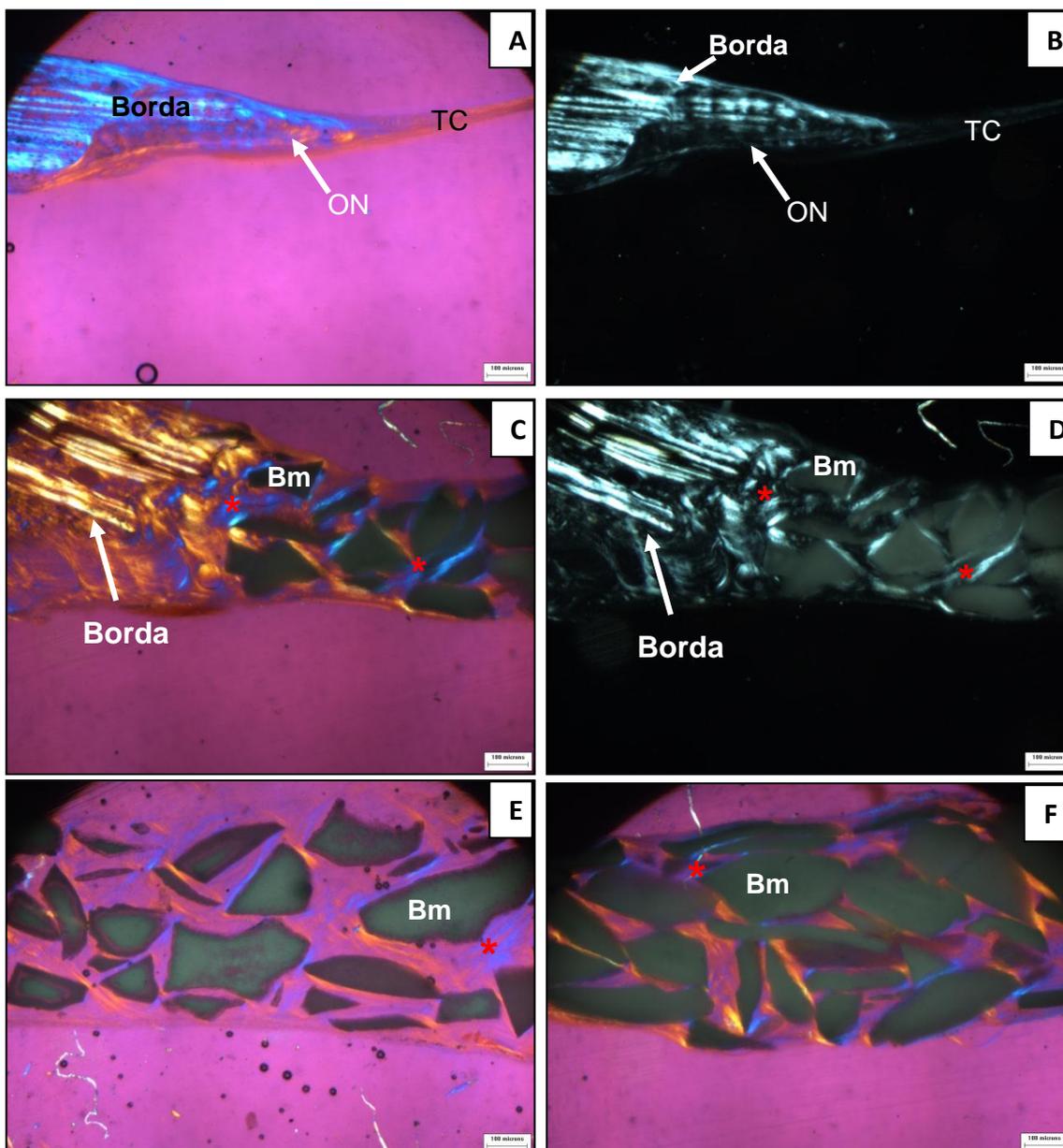


Figura 5.11 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses –(x10). A e B) **Grupo coágulo** - Na borda do defeito, tecido ósseo neoformado (ON) similar ao osso pré-existente, porém não segue a mesma direção e organização e tecido conjuntivo (TC) preenchendo o defeito; C e D) **Grupo  $\beta$ -TCMP** - Crescente formação de tecido mineralizado, sugerindo presença de osso neoformado (asteriscos), entre os grânulos do biomaterial (BM); E) **Grupo  $\beta$ -TCP + membrana** - Cristais organizados, sugerindo presença de osso neoformado (\*), no permeio dos grânulos de biomaterial (BM), no centro do defeito; F) **Grupo  $\beta$ -TCMP** - Cristais organizados, sugerindo presença de osso neoformado (\*), no permeio dos grânulos de biomaterial (BM), no centro do defeito.

### **5.4.3. Microscopia de luz**

A análise histológica das biópsias nos vários grupos experimentais mostrou que o defeito não foi preenchido completamente por tecido ósseo e que não houve degeneração tecidual (necrose e degeneração gordurosa), em nenhum dos tratamentos nos diferentes períodos estudados. O período de 24h foi realizado para avaliar a resposta inflamatória e reparo iniciais. Foram identificados na área do defeito os seguintes estágios de reparação:

#### **24h coágulo**

Defeito sendo preenchido por fina camada de escasso tecido conjuntivo frouxo, com exsudato hemorrágico. Moderado infiltrado inflamatório, predominantemente de células polimorfonucleares.

#### **24h membrana**

Artefato. Só há presença dos bordos ósseos, não tem material para observar.

#### **24h $\beta$ -TCP**

Defeito sendo preenchido por exsudato sero-fibroso-hemorrágico, que com o passar do tempo será absorvido e substituído por tecido conjuntivo, com área acelular não proteica. No permeio deste defeito há presença de espaços referentes ao biomaterial.

#### **24h $\beta$ -TCP + membrana**

Defeito sendo preenchido por exsudato sero-fibroso-hemorrágico, que com o passar do tempo será absorvido e substituído por tecido conjuntivo, com área acelular não proteica e moderado infiltrado inflamatório com polimorfonucleares dispersos, apresentando tendência de contornar o biomaterial. No permeio deste defeito há presença de espaços referentes ao biomaterial. A membrana estava presente.

### **24h $\beta$ -TCMP**

Defeito sendo preenchido por exsudato sero-fibroso-hemorrágico, que com o passar do tempo será absorvido e substituído por tecido conjuntivo, com área acelular não proteica e moderado infiltrado inflamatório com polimorfonucleares dispersos, apresentando tendência de contornar o biomaterial. No permeio deste defeito há presença de espaços referentes ao biomaterial.

### **24h $\beta$ -TCMP + membrana**

Defeito sendo preenchido por exsudato sero-fibroso-hemorrágico, que com o passar do tempo será absorvido e substituído por tecido conjuntivo, com área acelular não proteica e moderado infiltrado inflamatório com polimorfonucleares dispersos, apresentando tendência de contornar o biomaterial. No permeio deste defeito há presença de espaços referentes ao biomaterial. A membrana estava presente.

### **1 mês coágulo**

Nos cortes histológicos examinados corados em Hematoxilina e Eosina (HE), foi observado tecido ósseo neoformado nas bordas do defeito, com osteoblastos pavimentando a sua superfície. A distribuição de microvasos ocorreu de forma homogênea no tecido conjuntivo (Figura 5.12 A). Havia presença de tecido conjuntivo frouxo com discreta e dispersa proliferação celular, sugerindo células inflamatórias, com infiltrado inflamatório mononuclear (plasmócitos, linfócitos e macrófagos – não mostrados) e fibroblastos (Figuras 5.12 B e C).

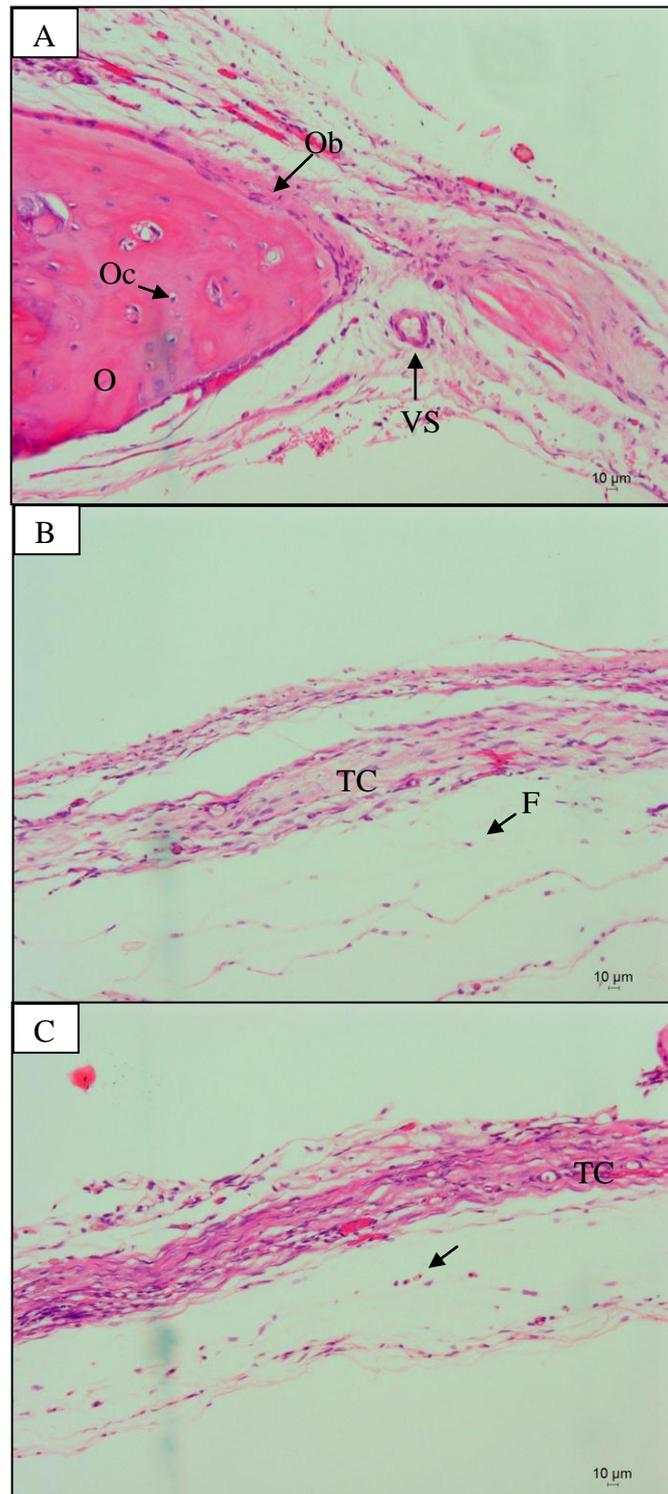


Figura 5.12 – **Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês – coágulo (x20)**. A) No bordo do defeito, tecido ósseo neoformado (O) exibindo osteócitos (Oc), osteoblastos (Ob) e microvasos (VS) distribuídos homogeneamente dentro do tecido conjuntivo; B) Tecido conjuntivo frouxo (TC) células sugestivas de fibroblastos (F); C) Tecido conjuntivo (TC) com células sugerindo serem inflamatórias (seta).

## **1 mês membrana**

Nos cortes histológicos examinados corados em HE, foi observada neoformação óssea nas bordas do defeito e tecido conjuntivo fibrocelular em todas as amostras analisadas, porém em todos os grupos que utilizou membrana, o tecido conjuntivo apresentou maior presença de fibras e uma menor incidência de células, quando comparado àqueles que não utilizaram membrana. A distribuição de microvasos ocorreu de forma homogênea e a proliferação celular era discreta e dispersa no tecido conjuntivo (Figura 5.13 A), sugerindo células inflamatórias e fibroblastos. Foi identificado escasso infiltrado inflamatório na maioria das análises, porém em algumas amostras dos grupos que utilizaram membrana, havia intenso infiltrado inflamatório com reação de granulação próximo à membrana (Figura 5.13 B), o que possivelmente dificultou a presença de osso neoformado no centro do defeito ósseo, pois este osso era visto em alguns cortes histológicos onde a membrana não era identificada (Figura 5.13 C). Em apenas 2 das 5 amostras a membrana foi observada, pois ela é absorvível.

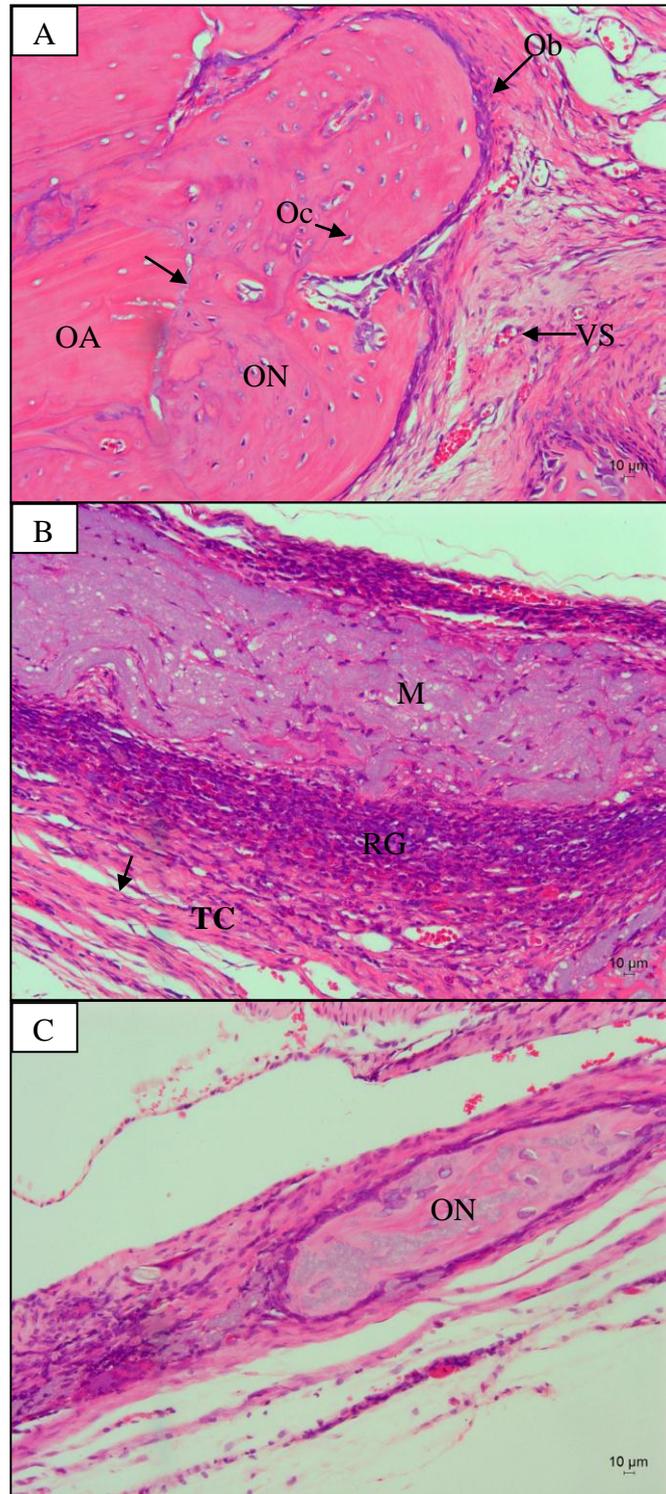


Figura 5.13 – **Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês - membrana (x20)**. A) No bordo do defeito, tecido ósseo neoformado (ON) exibindo osteócitos (Oc), osteoblastos (Ob), linha basofílica (seta) que limita o osso antigo (OA) ao osso neoformado (ON) e microvasos (VS) distribuídos homogeneamente dentro do tecido conjuntivo; B) Tecido conjuntivo fibrocelular (TC) com predominante presença de fibras (seta) e membrana remanescente (M) apresentando na sua periferia um intenso infiltrado inflamatório com reação de granulação (RG); C) Osso neoformado (ON) no centro do defeito ósseo.

## **1 mês $\beta$ -TCP**

Nos cortes histológicos examinados corados em HE, foi observada na área do defeito a presença dos espaços referentes ao biomaterial de formatos e tamanhos variados, de aspectos angulados, interceptados por tecido conjuntivo frouxo, exibindo presença de vasos sanguíneos congestos e moderado infiltrado inflamatório mononuclear (plasmócitos, linfócitos e macrófagos – não mostrados). Células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho estavam presentes na periferia dos grânulos de biomaterial (Figura 5.14 A).

Há área de neoformação óssea nas bordas do defeito com intensa atividade osteoblástica pavimentando o osso neoformado (Figura 5.14 B) e perifericamente aos espaços referentes ao biomaterial, tanto próximo à borda, quanto no centro do defeito ósseo (Figura 5.14 C).

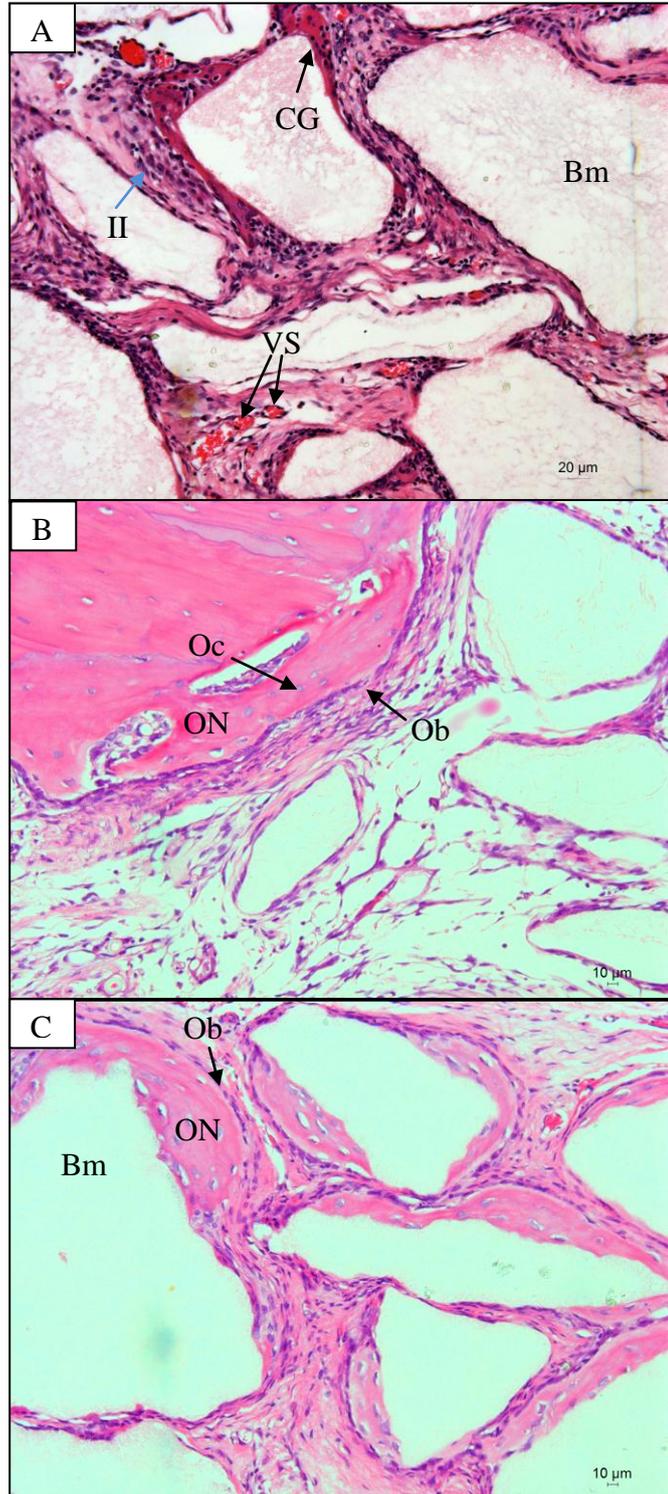


Figura 5.14 – **Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês -  $\beta$ -TCP (x20).** A) Grânulos do biomaterial (Bm) interceptados por tecido conjuntivo, exibindo presença de vasos sanguíneos (VS) congestionados e moderado infiltrado inflamatório mononuclear (II). Células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho (CG) estavam margeando os grânulos do biomaterial; B) No bordo do defeito, tecido ósseo neoformado (ON) exibindo osteócitos (Oc) e osteoblastos (Ob); C) Osso neoformado (ON) na periferia dos grânulos do biomaterial (Bm), com osteoblastos (Ob) pavimentando a sua superfície e osteócitos (Oc) no seu interior.

### **1 mês $\beta$ -TCP + membrana**

Nos cortes histológicos examinados corados em HE, foi observada na área do defeito a presença dos espaços referentes ao biomaterial de formatos e tamanhos variados, de aspectos angulados, interceptados por tecido conjuntivo frouxo, exibindo presença de vasos sanguíneos congestos e moderado infiltrado inflamatório mononuclear (plasmócitos, linfócitos e macrófagos – não mostrados) (Figura 5.15 A). Células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho estavam presentes na periferia dos grânulos de biomaterial, sugerindo tentativa de atividade de absorção (Figura 5.15 B).

Há área de neoformação óssea nas bordas do defeito com intensa atividade osteoblástica pavimentando o osso neoformado e perifericamente aos espaços referentes ao biomaterial próximo à borda (Figura 5.15 C).

A membrana não foi observada, pois ela é absorvível.

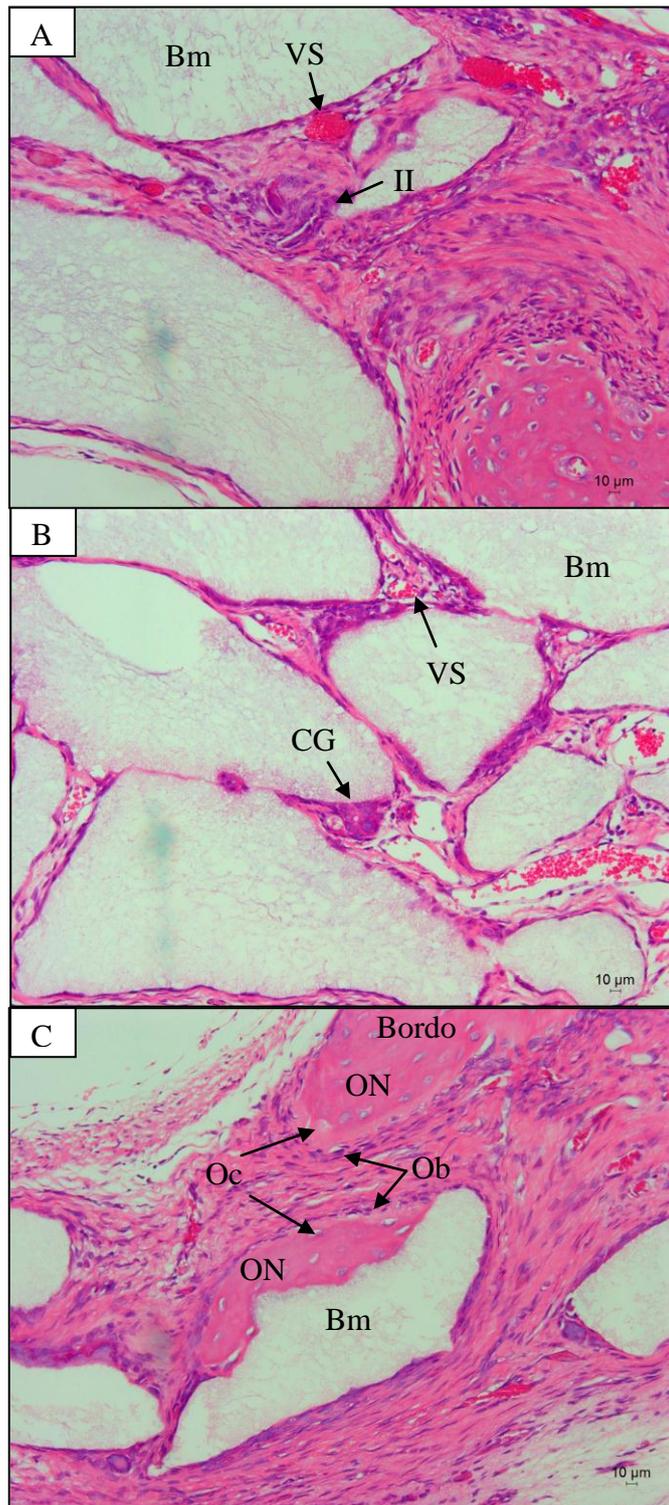


Figura 5.15 – **Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês –  $\beta$ -TCP + membrana (x20).** A) Grânulos do biomaterial (Bm) interceptados por tecido conjuntivo, exibindo presença de vasos sanguíneos (VS) congestionados e moderado infiltrado inflamatório mononuclear (II); B) Grânulos do biomaterial (Bm) interceptados por tecido conjuntivo, exibindo presença de vasos sanguíneos (VS). Células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho (CG) estavam margeando os grânulos do biomaterial; C) No bordo do defeito e na periferia do grânulo do biomaterial (Bm), tecido ósseo neoformado (ON) exibindo osteócitos (Oc) e osteoblastos (Ob) pavimentando as suas superfícies.

## 1 mês $\beta$ -TCMP

Nos cortes histológicos examinados corados em HE, foi observada na área do defeito a presença dos espaços referentes ao biomaterial de formatos e tamanhos variados, de aspectos angulados, interceptados por tecido conjuntivo frouxo, exibindo presença de vasos sanguíneos congestos (Figura 5.16 A) e moderado infiltrado inflamatório mononuclear (plasmócitos, linfócitos e macrófagos – não mostrados). Células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho estavam presentes na periferia dos grânulos de biomaterial, sugerindo tentativa de atividade de absorção.

Há área de neoformação óssea nas bordas do defeito com intensa atividade osteoblástica pavimentando o osso neoformado e perifericamente aos espaços referentes ao biomaterial, tanto próximo à borda (Figura 5.16 B), quanto no centro do defeito ósseo. Em um corte histológico foi observada a inclusão dos grânulos de biomaterial no bordo do defeito ósseo, decorrente da intensa neoformação óssea neste sítio (Figura 5.16 C).

Em todas as amostras deste grupo, há presença de osso neoformado perifericamente a alguns espaços referentes ao biomaterial, o que não ocorreu com o grupo de 1 mês  $\beta$ -TCP.

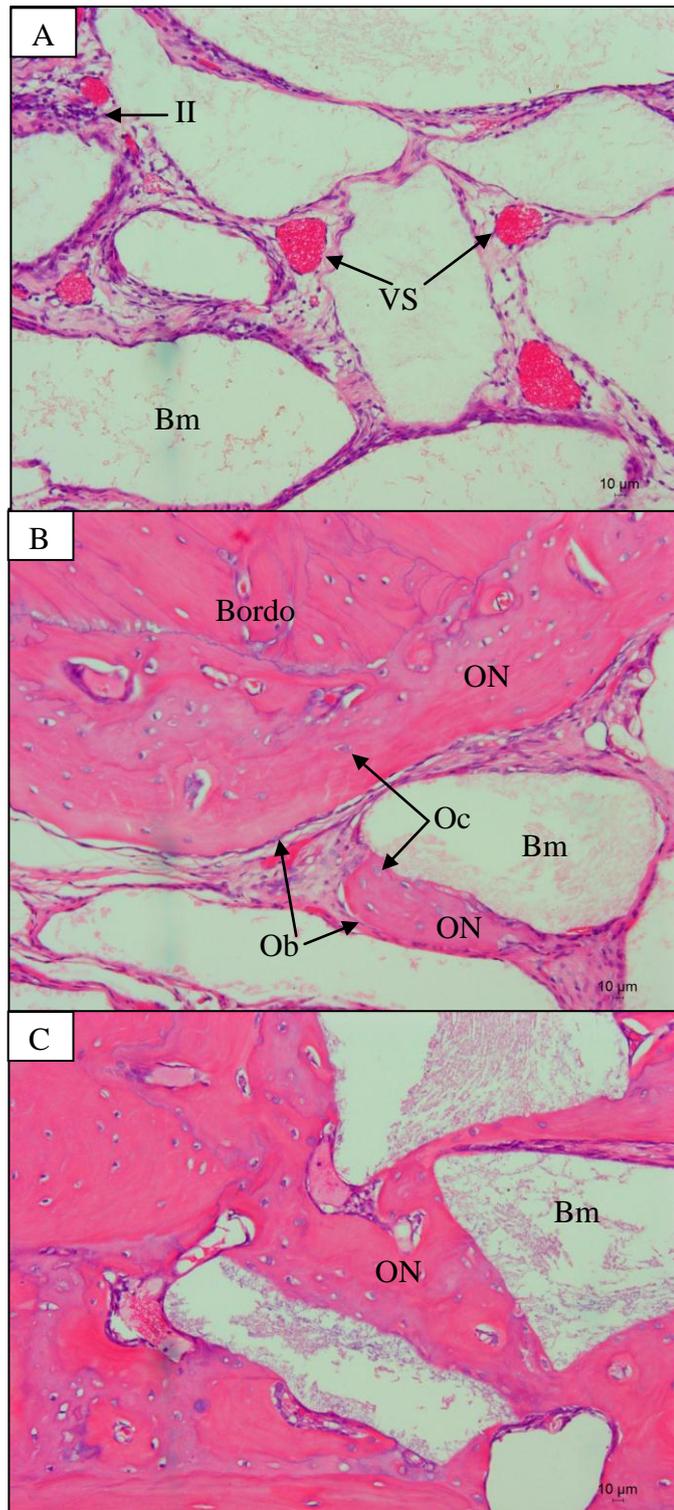


Figura 5.16 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês –  $\beta$ -TCMP (x20). A) Grânulos do biomaterial (Bm) interceptados por tecido conjuntivo, exibindo presença de vasos sanguíneos (VS) congestionados e moderado infiltrado inflamatório mononuclear (II) margeando os grânulos do biomaterial; B) No bordo do defeito e na periferia do grânulo do biomaterial (Bm), tecido ósseo neoformado (ON) exibindo osteócitos (Oc) e osteoblastos (Ob) pavimentando as superfícies; C) Inclusão dos grânulos de biomaterial (Bm) no bordo do defeito ósseo, decorrente da intensa neoformação óssea (ON) neste sítio.

### **1 mês $\beta$ -TCMP + membrana**

Nos cortes histológicos examinados corados em HE, foi observada na área do defeito a presença dos espaços referentes ao biomaterial de formatos e tamanhos variados, de aspectos angulados, interceptados por tecido conjuntivo frouxo, exibindo presença de vasos sanguíneos congestos e moderado infiltrado inflamatório mononuclear (plasmócitos, linfócitos e macrófagos – não mostrados). Neste grupo, o tecido conjuntivo é predominantemente celular, em vez de fibrilar, por causa da presença de reação de granulação, decorrente do infiltrado inflamatório crônico. Células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho estavam presentes na periferia dos grânulos de biomaterial, sugerindo tentativa de atividade de absorção (Figuras 5.17 A).

Há área de neoformação óssea nas bordas do defeito com intensa atividade osteoblástica pavimentando o osso neoformado e perifericamente aos espaços referentes ao biomaterial próximo à borda (Figura 5.17 B) e no centro do defeito ósseo (Figura 5.17 C).

A membrana não foi observada, pois ela é absorvível.

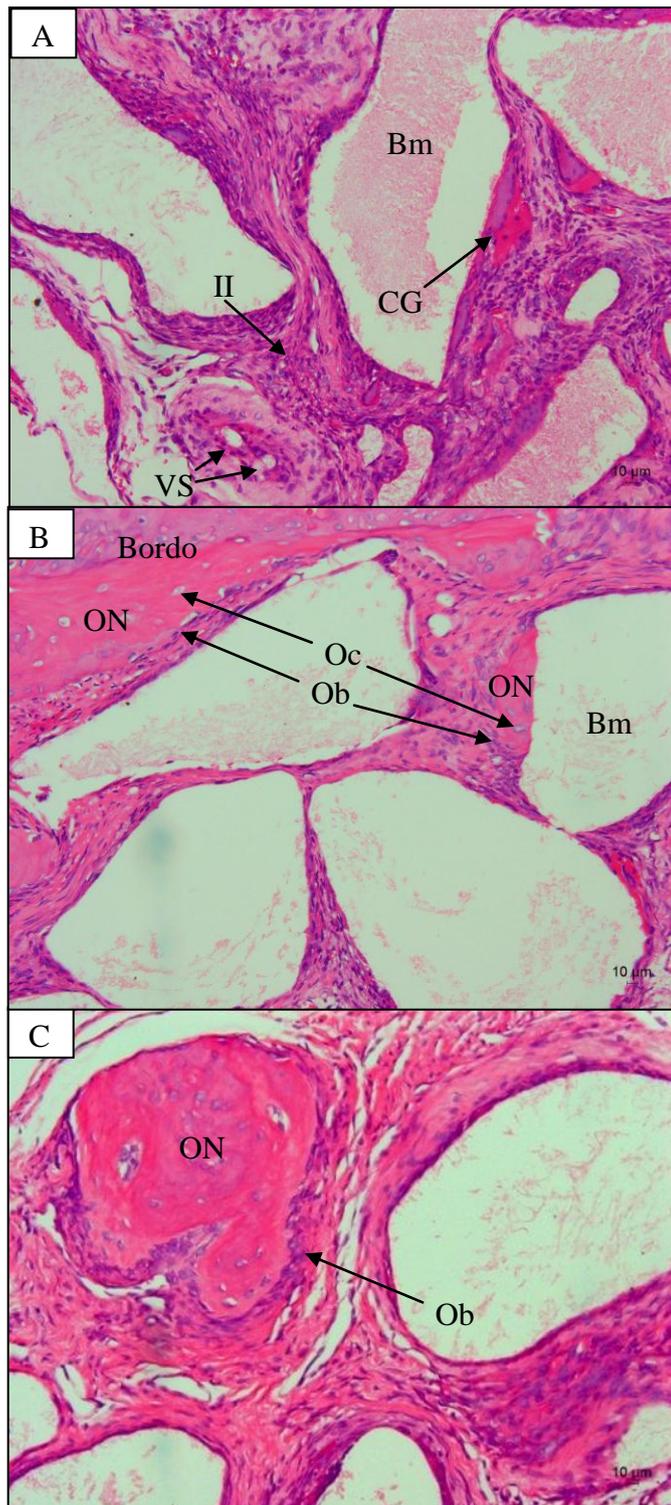


Figura 5.17 – **Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês –  $\beta$ -TCMP + membrana (x20).** A) Grânulos do biomaterial (Bm) interceptados por tecido conjuntivo, exibindo presença de vasos sanguíneos (VS) congestos e moderado infiltrado inflamatório mononuclear (II). Células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho (CG) estavam margeando os grânulos do biomaterial; B) No bordo do defeito e na periferia do grânulo do biomaterial (Bm), tecido ósseo neoformado (ON) exibindo osteócitos (Oc) e osteoblastos (Ob) pavimentando as superfícies; C) Intensa atividade osteoblástica (Ob) pavimentando uma ilha de osso neoformado (ON) no centro do defeito.

## **6 meses**

Em todas as amostras analisadas neste período, houve identificação da linha basofílica, que separa o osso neoformado do osso nativo, com intensa atividade osteoblástica pavimentando a superfície do osso neoformado e, assim como no osso nativo pré-existente, havia osteócitos no seu interior. Esta linha só é observada neste período mais longo (Figura 5.18 A).

## **6 meses coágulo**

Nos cortes histológicos examinados corados em HE, foi observado tecido ósseo neoformado de forma centrípeta nas bordas do defeito, com osteoblastos pavimentando a sua superfície e osteócitos no seu interior. Preenchendo o defeito, foi identificado tecido conjuntivo com predomínio de fibras, escasso infiltrado inflamatório (Figura 5.18 B). A distribuição de microvasos ocorreu de forma homogênea no tecido conjuntivo (Figura 5.18 C)

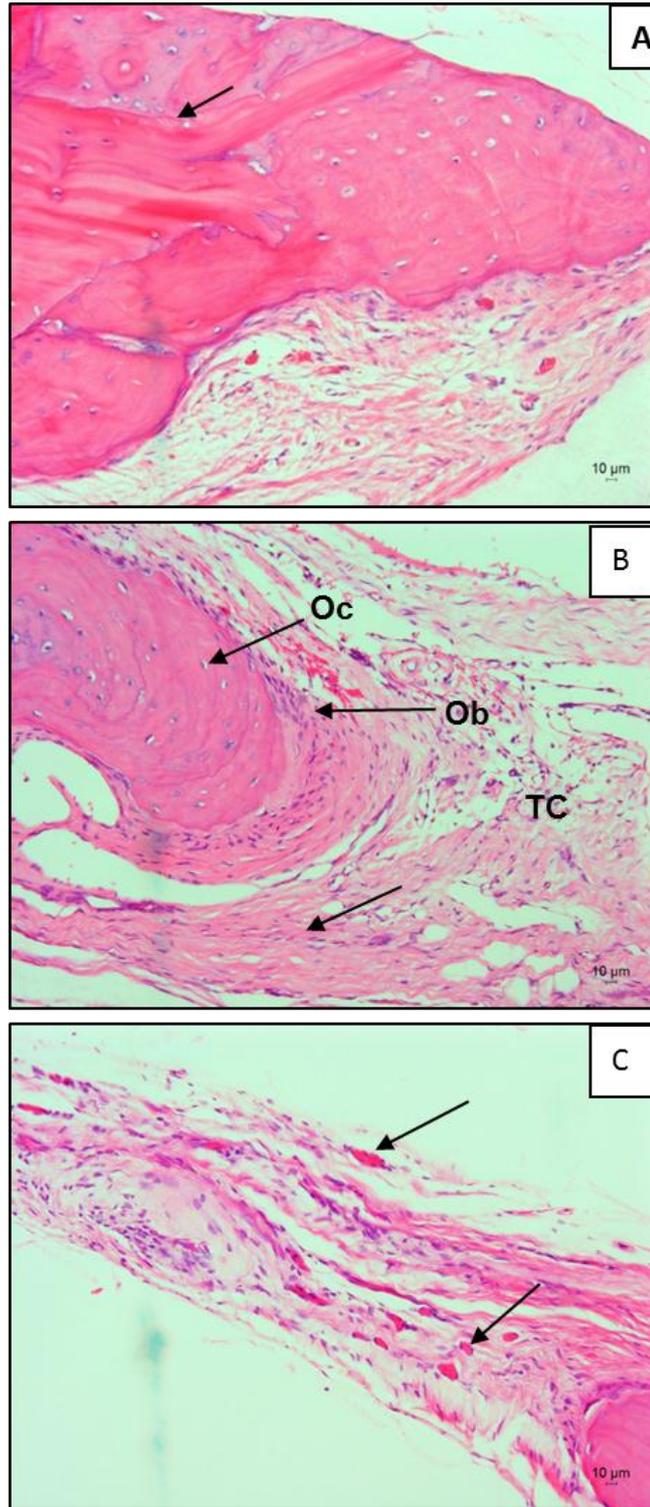


Figura 5.18 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses – coágulo (x20). A) Linha basofílica (seta) foi identificada; B) Tecido conjuntivo (TC) com predominância de fibras (seta) e intensa atividade osteoblástica (Ob) pavimentando a superfície da borda do defeito com osteócitos (Oc) no interior do tecido ósseo; C) Tecido conjuntivo com microvasos (setas) distribuídos de forma homogênea.

## **6 meses membrana**

Nos cortes histológicos examinados corados HE, foi observado tecido ósseo neoformado de forma centrípeta nas bordas do defeito, com osteoblastos pavimentando a sua superfície e osteócitos no seu interior (Figura 5.19 A). A distribuição de microvasos ocorreu de forma homogênea no tecido conjuntivo (Figura 5.19 B). Preenchendo o defeito, foi identificado tecido conjuntivo com predomínio de fibras, escasso infiltrado inflamatório (Figura 5.19 C). A membrana não foi observada em nenhuma amostra.

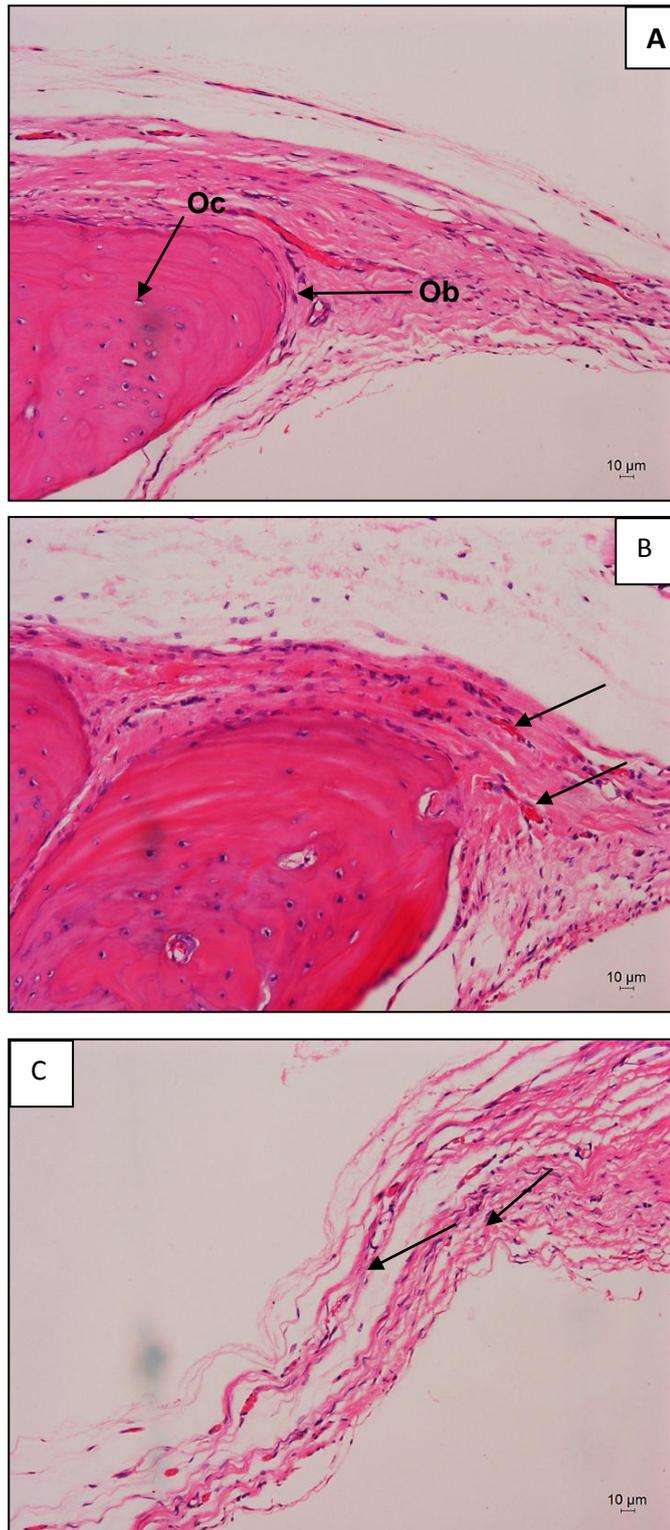


Figura 5.19– **Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses – membrana (x20)**. A) Intensa atividade osteoblástica (Ob) pavimentando a superfície da borda do defeito com osteócitos (Oc) no interior do tecido ósseo; B) Tecido conjuntivo com microvasos (setas) distribuídos de forma homogênea; C) Tecido conjuntivo (TC) com predominância de fibras (setas).

## **6 meses $\beta$ -TCP**

Nos cortes histológicos examinados corados em HE, foi observada na área do defeito a presença dos espaços referentes ao enxerto de formatos e tamanhos variados, de aspectos angulados, interceptados por tecido conjuntivo frouxo, com algumas áreas de tecido conjuntivo fibroso, em proximidade às bordas do defeito. Há presença de escasso infiltrado inflamatório (II) mononuclear (plasmócitos, linfócitos e macrófagos – não mostrados). Células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho estavam presentes, porém mais escassas neste período, na periferia dos grânulos de biomaterial (Figura 5.20 A), sugerindo tentativa de atividade de absorção.

Há área de neoformação óssea de forma centrípeta (Figuras 5.20 B e C) nas bordas do defeito com intensa atividade osteoblástica pavimentando o osso neoformado e perifericamente aos espaços referentes ao biomaterial, tanto próximo à borda, quanto no centro do defeito ósseo.

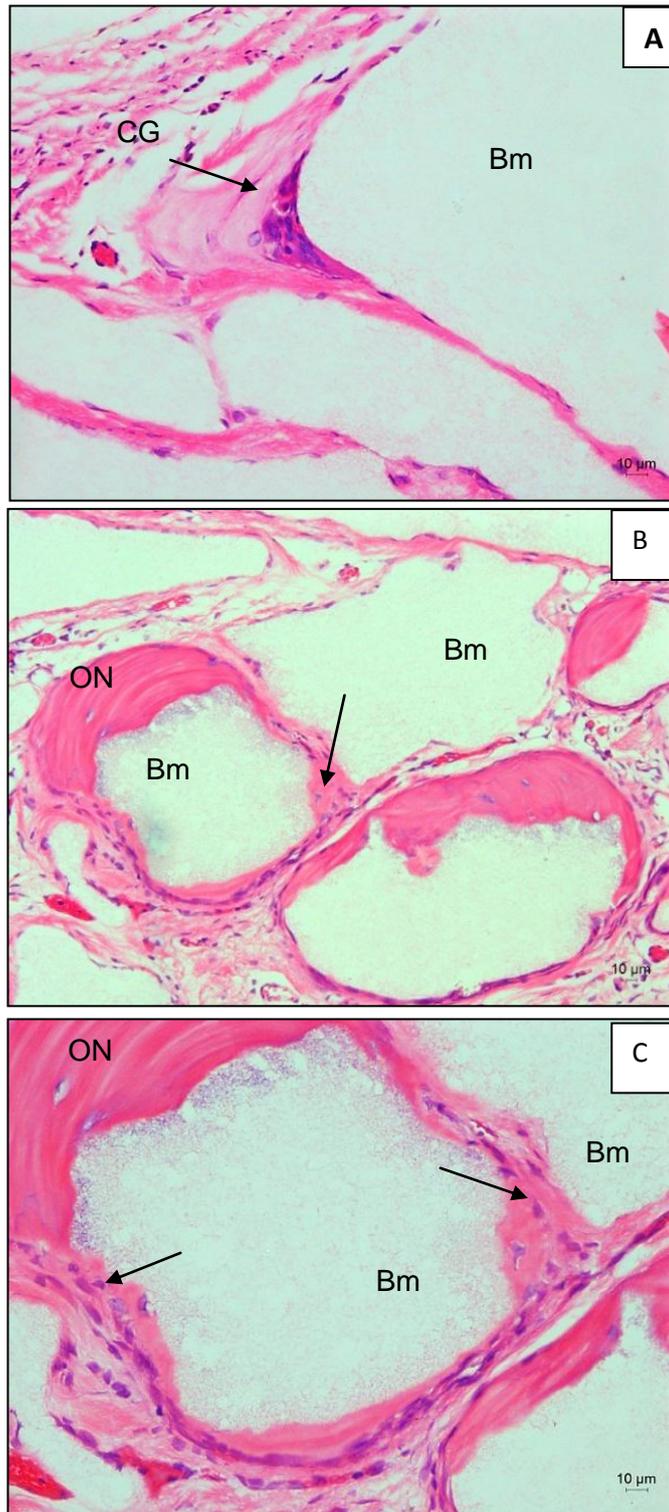


Figura 5.20 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses –  $\beta$ -TCP. A) Célula gigante multinucleada tipo corpo estranho (CG) na superfície do biomaterial (Bm) (x40); B) Osso neoformado na periferia do biomaterial (Bm), unindo os grânulos (seta) no centro do defeito (x20); C) Mesma área que a Fig B com osteoblastos (setas) pavimentando o osso neoformado, em maior aumento (x40).

## **6 meses $\beta$ -TCP + membrana**

Nos cortes histológicos examinados corados em HE, foi observada na área do defeito a presença dos espaços referentes ao biomaterial de formatos e tamanhos variados, de aspectos angulados, interceptados por tecido conjuntivo frouxo na porção central e mais fibroso na periferia. Escasso e disperso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário com mastócitos ocasionais (não mostrado). Presença de pequenos vasos sanguíneos neoformados congestionados. Envolvendo o biomaterial há área hialina (Figura 5.21 A), sugerindo matriz osteogênica. Células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho estavam presentes, porém mais escassas neste período, na periferia dos grânulos de biomaterial (Figura 5.21 B), sugerindo tentativa de atividade de absorção. A membrana não foi observada em qualquer amostra dos grupos que a continha.

Há área de neoformação óssea (Figuras 5.21 C e D) nas bordas do defeito com intensa atividade osteoblástica pavimentando o osso neoformado com presença de osteócitos no seu interior e perifericamente aos espaços referentes ao biomaterial, tanto próximo à borda, quanto no centro do defeito ósseo, com maior intensidade do que nas amostras em que a membrana não foi utilizada.

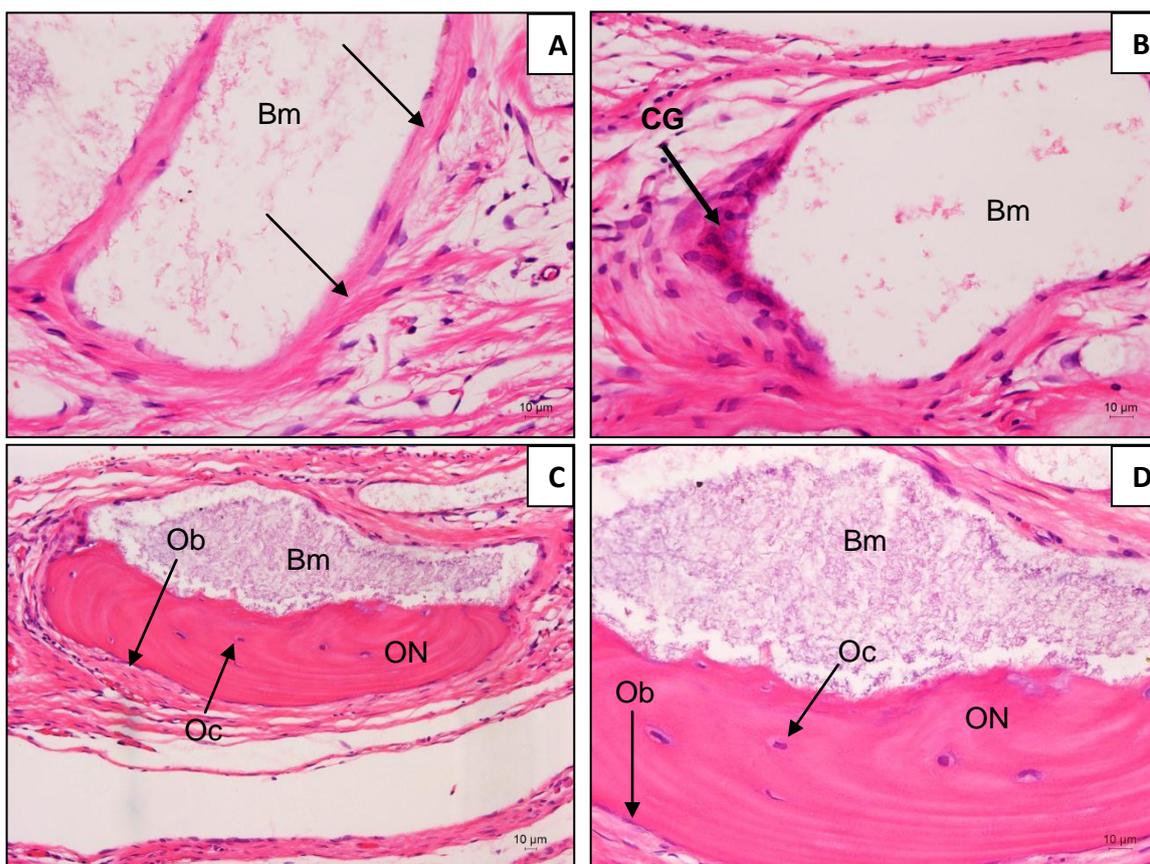


Figura 5.21 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses –  $\beta$ -TCP + membrana. A) Área hialina, sugerindo matriz osteogênica (setas), envolvendo o biomaterial (Bm) (x40); B) Célula gigante multinucleada tipo corpo estranho (CG) na superfície do grânulo do biomaterial (Bm), sugerindo sua absorção (x40); C) Osso neoformado na periferia do biomaterial (Bm), no centro do defeito, com atividade osoteoblástica (Ob) pavimentando-o e presença de osteócitos (Oc) no seu interior (x20); D) Mesma área que a Figura 5.18 C, em maior aumento (x40).

## **6 meses $\beta$ -TCMP**

Nos cortes histológicos examinados corados em HE, foi observada na área do defeito a presença dos espaços referentes ao biomaterial de formatos e tamanhos variados, de aspectos angulados, interceptados por tecido conjuntivo frouxo (Figuras 5.22 A e B) na porção central e mais fibroso na periferia, aparentando estar mais fibroso que nos grupos sem magnésio. Escasso e disperso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário com mastócitos ocasionais (não mostrado). Presença de pequenos vasos sanguíneos neoformados congestos (Figuras 5.22 B e C). Células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho estavam presentes, porém mais escassas neste período, na periferia dos grânulos de biomaterial, sugerindo tentativa de atividade de absorção.

Há área de neoformação óssea nas bordas do defeito com intensa atividade osteoblástica pavimentando o osso neoformado com presença de osteócitos no seu interior e perifericamente aos espaços referentes ao biomaterial, tanto próximo à borda (Figura 5.22 C), quanto no centro do defeito ósseo (Figuras 5.22 A e B).

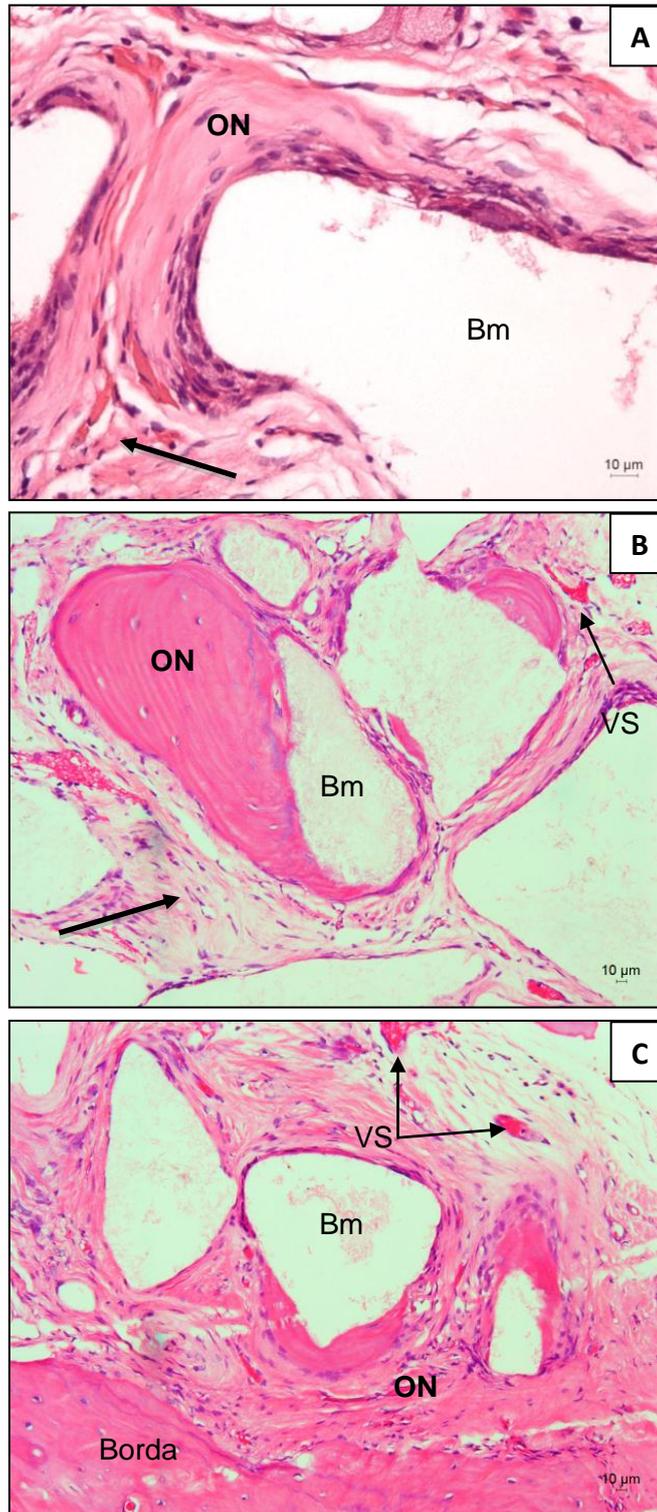


Figura 5.22 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses –  $\beta$ -TCMP. A) Osso neoformado (ON) na periferia dos grânulos do biomaterial (Bm) no centro do defeito, interceptados por tecido conjuntivo (seta) (x40); B) Osso neoformado (ON) na periferia dos grânulos do biomaterial (Bm), sugerindo estar sendo absorvido e substituído por osso, no centro do defeito, interceptados por tecido conjuntivo (seta) com presença de vasos sanguíneos (VS) neoformados (x20); C) Osso neoformado (ON) na periferia do biomaterial (Bm), e próximo à borda do defeito com presença de vasos sanguíneos (VS) neoformados.

## **6 meses $\beta$ -TCMP + membrana**

Nos cortes histológicos examinados corados em HE, foi observada na área do defeito a presença dos espaços referentes ao biomaterial de formatos e tamanhos variados, de aspectos angulados, interceptados por tecido conjuntivo frouxo no centro e fibroso na proximidade dos bordos do defeito, exibindo presença de vasos sanguíneos neoformados congestionados, inclusive dentro do tecido ósseo neoformado (Figura 5.23 A) e escasso e disperso infiltrado inflamatório. Escassas células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho estavam presentes, porém mais escassas neste período, na periferia dos grânulos de biomaterial, sugerindo tentativa de atividade de absorção. A membrana não foi observada em qualquer amostra dos grupos que a continha.

Em todas as amostras analisadas, há área de neoformação óssea nas bordas do defeito (Figura 5.23 A) com intensa atividade osteoblástica pavimentando o osso neoformado com presença de osteócitos no seu interior e perifericamente aos espaços referentes ao biomaterial tanto próximo à borda, quanto no centro do defeito ósseo (Figuras 5.23 B, C e D). Há algumas áreas de substituição dos grânulos por osso que se confluem com os grânulos adjacentes (Figuras 5.23 B e D), assim como também se unem às bordas do defeito (Figuras 5.23 E e F), em contraste com as amostras de  $\beta$ -TCP (com ou sem membrana).

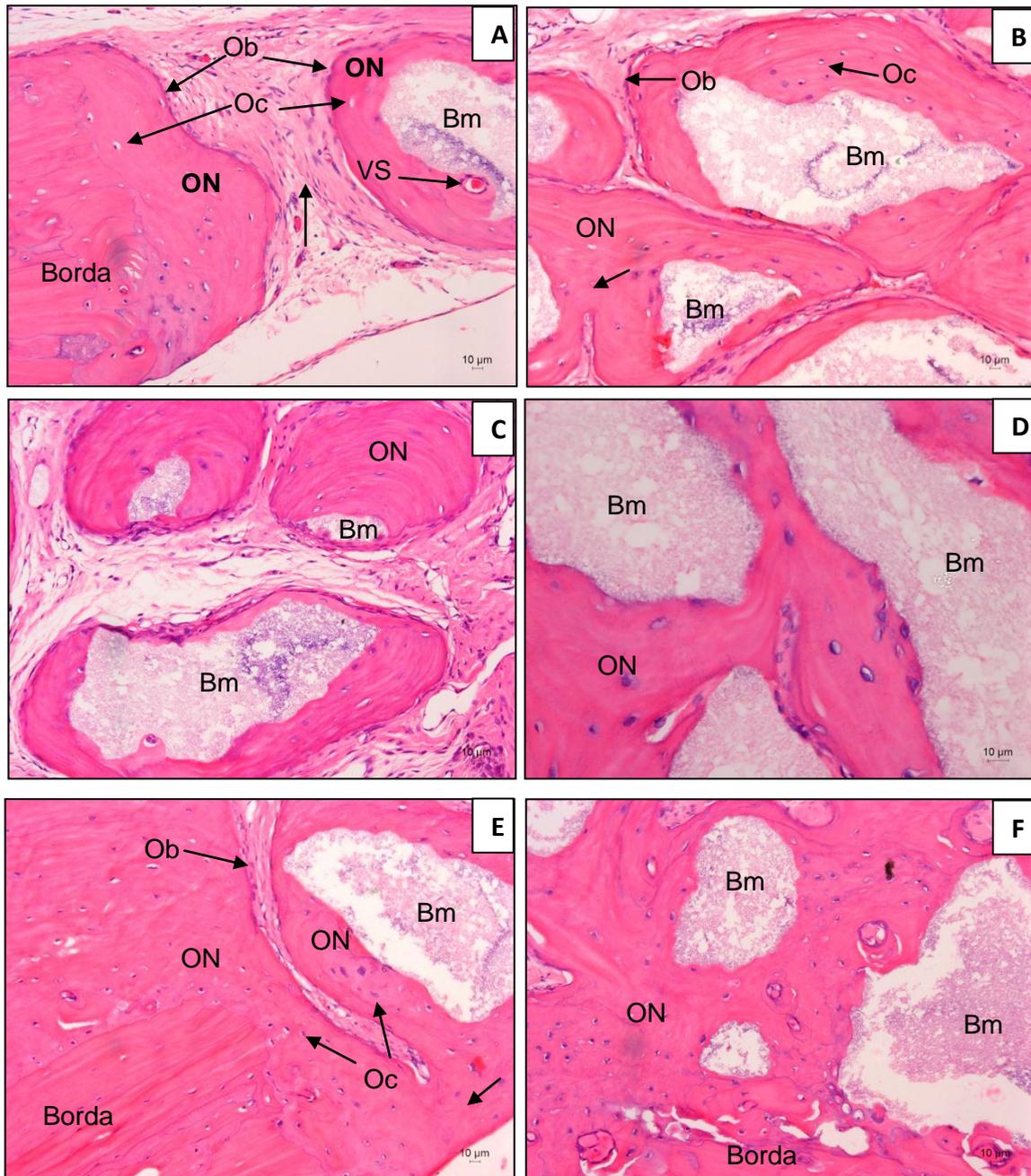


Figura 5.23 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses –  $\beta$ -TCMP + membrana. A) Na periferia do biomaterial (Bm) e na borda do defeito, há osso neoformado (ON) com atividade osoteoblástica (Ob) em sua superfície, presença de osteócitos (Oc) e vaso sanguíneo (VS) no seu interior. Tecido conjuntivo fibroso (seta) na proximidade da borda do defeito (x20); B, C) Osso neoformado (ON) na periferia do biomaterial (Bm), no centro do defeito. Há substituição de grânulos do biomaterial por osso que se confluem com os grânulos adjacentes (seta) (x20); D) Osso neoformado (ON) no espaço entre os grânulos de biomaterial (Bm), substituindo-os, no centro do defeito (x40); E e F) Na periferia do biomaterial (Bm) e na borda do defeito, há osso neoformado (ON) com atividade osoteoblástica (Ob) em sua superfície, presença de osteócitos (Oc) no seu interior. Presença de áreas de substituição dos grânulos por osso que se confluem com os grânulos adjacentes, assim como se unem às bordas do defeito (seta) (x20).

## 5.5. Análise histomorfométrica

A Figura 5.24 apresenta a porcentagem de neoformação óssea em função dos períodos experimentais (1 e 6 meses) em todas as condições analisadas. A neoformação óssea aumentou através dos períodos experimentais com diferença estatisticamente significativa para o grupo  $\beta$ -TCP + membrana ( $p < 0,05$ ) e com diferença extremamente significativa no grupo  $\beta$ -TCMP + membrana ( $p < 0,001$ ).

Aos 6 meses, nos grupos  $\beta$ -TCP + membrana e  $\beta$ -TCMP + membrana houve significativo aumento ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente), quando comparado ao grupo coágulo, assim como aumentou ( $p < 0,01$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente) quando comparado ao grupo membrana. Também aos 6 meses, o grupo  $\beta$ -TCMP + membrana aumentou significativamente ( $p < 0,01$ ), quando comparado ao grupo  $\beta$ -TCP, mas com o período de 1 mês, houve o efeito oposto, o grupo  $\beta$ -TCP apresentou maior neoformação óssea do que o grupo  $\beta$ -TCMP + membrana ( $p < 0,05$ ).

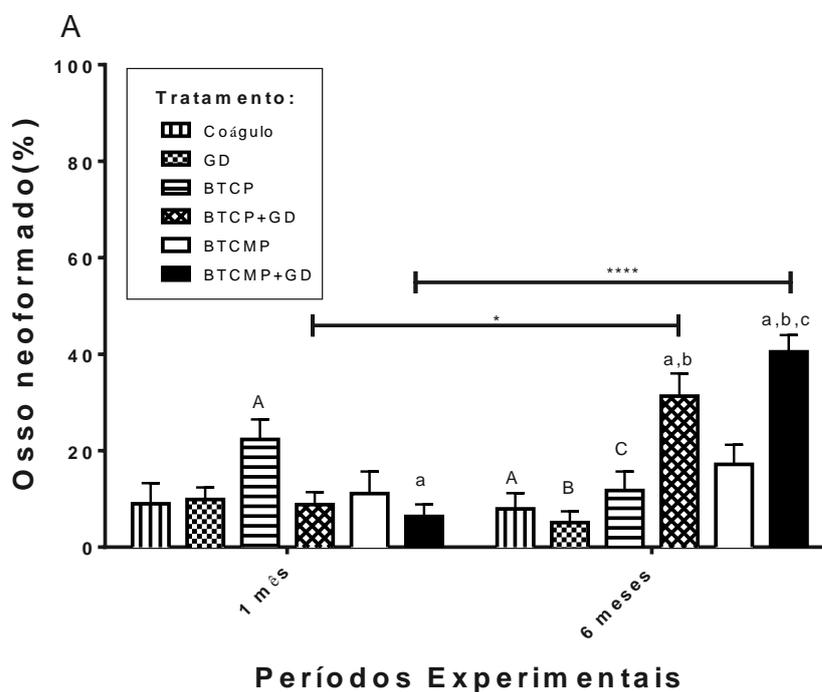


Figura 5.24 – Percentual de área ocupada por osso neoformado em função dos períodos experimentais (1 e 6 meses). Barras representam a média mais desvio padrão de cada extremidade. Asteriscos (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ) representam diferença significativa entre os períodos experimentais para o mesmo grupo experimental. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos dentro do mesmo período experimental.

O tecido conjuntivo (Figura 5.25) apresentou um pequeno decréscimo em todos os grupos experimentais, mas sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ), entre os períodos experimentais. No período de 1 mês, o grupo de  $\beta$ -TCP apresentou uma maior densidade ( $p < 0,05$ ) de tecido conjuntivo comparado ao grupo de  $\beta$ -TCMP + membrana.

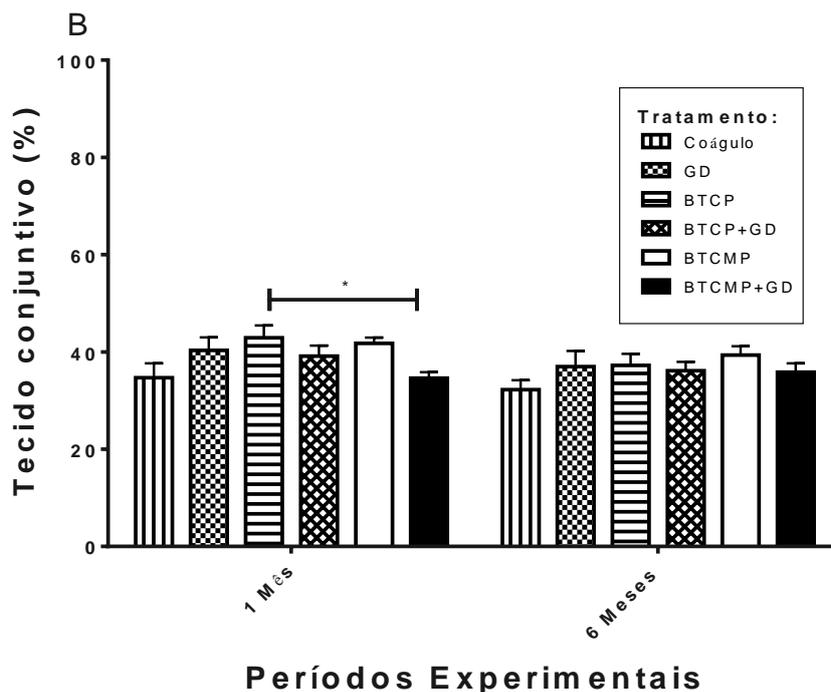


Figura 5.25 – Percentual de área ocupada por tecido conjuntivo em função dos períodos experimentais (1 e 6 meses). Barra representa a média mais desvio padrão de cada extremidade. Asterisco (\*,  $p < 0,05$ ) representa diferença significativa entre os grupos experimentais dentro do mesmo período experimental.

Como  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP apresentam perda de massa no ensaio de dissolução, esperava-se uma diminuição na área ocupada pelos grânulos durante os períodos experimentais, porém, como observado na Figura 5.26, não houve diferença significativa na variação da densidade de volume dos biomateriais ( $p > 0,05$ ). Esta diminuição confirma as observações da análise descritiva e o aumento observado da área de osso neoformado em quase todos os grupos com biomateriais.

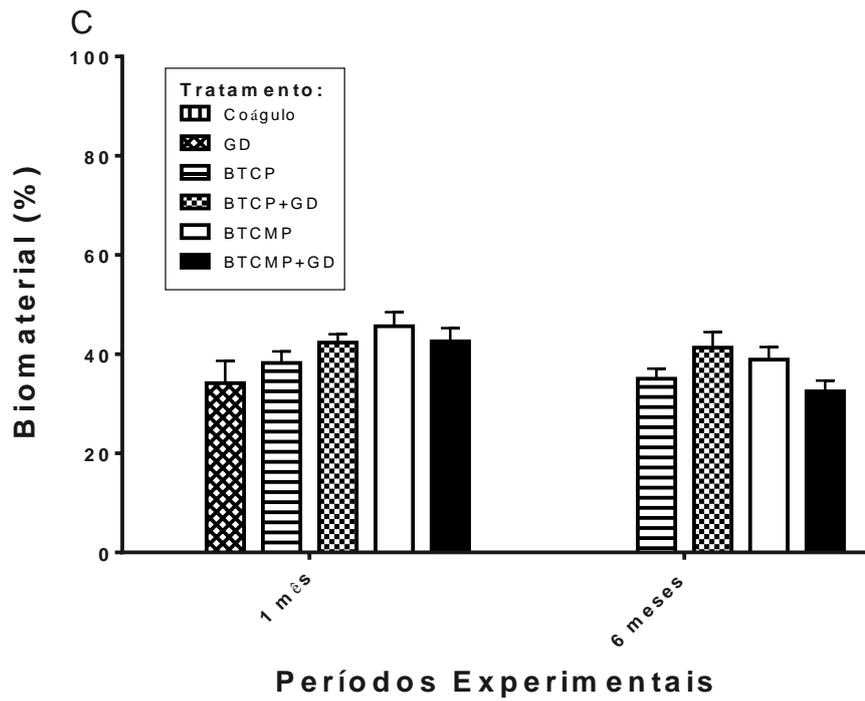


Figura 5.26 – Percentual de área ocupada por biomaterial em função dos períodos experimentais (1 e 6 meses). Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

O reparo ósseo é ainda um desafio para o envelhecimento da população e acidentes, que resultam em um número crescente de casos de fratura óssea (CALDERONI *et al.*, 2011). A hidroxiapatita é comumente utilizada como biomaterial para auxiliar o reparo ósseo, mas as formulações atuais não apresentam a propriedade de bioabsorção (BARRERE *et al.*, 2006), permanecendo no sítio de implantação por longos períodos. Por outro lado,  $\beta$ -TCP também é amplamente utilizado para o mesmo propósito, porém a taxa de absorção é mais alta e algumas vezes ocorre antes do período desejado (DEBUSSCHER *et al.*, 2009). Estratégias para manter a biocompatibilidade e osteocondutividade das cerâmicas de fosfato de cálcio e adicionar um tempo de reabsorção controlada são almejadas por vários grupos em todo o mundo. No presente trabalho, foi demonstrado que a associação da ROG (regeneração óssea guiada) e grânulos de  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP aumentam significativamente o reparo ósseo no tratamento de defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos, com o nível de neoformação óssea sendo 4 ou 5 vezes maior do que o encontrado no grupo coágulo.

A permuta de cálcio por magnésio reduz o tamanho da célula unitária no cristal de apatita. Esta redução ocorre porque o tamanho do íon de Mg é menor do que o Ca substituído (KANNAN *et al.*, 2010). Ao substituir o Ca, o átomo de Mg, por ter um raio atômico menor, toma a posição mais central, aumentando a estabilidade estrutural (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2006). LI *et al.* (2009), observaram que a solubilidade do  $\beta$ -TCMP diminuiu com o aumento da quantidade de Mg, devido ao aumento da estabilidade estrutural com a incorporação do Mg, permitindo um maior controle de dissolução do biomaterial (ZHANG *et al.*, 2008). CAI *et al.* (2010), incorporaram íons de magnésio em recobrimentos de fluorapatita e observaram que a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  existente no recobrimento aumentou com o tempo e foi maior em recobrimentos com Mg do que naqueles sem Mg. Observaram também que o Mg estimulou a proliferação celular. A adição de Mg estabiliza a fase beta, pois aumenta a temperatura de transformação da fase alfa acima de 1500° C (ZHANG *et al.*, 2008). Além disto, a presença de Mg eleva a densidade após a compressão e por consequência, as propriedades mecânicas (RYU *et al.*, 2004). XUE *et al.* (2008), concluíram que a adição de Mg aumentou o comportamento de densificação do TCP. A resistência à compressão também aumentou. Além disto, a adição de Mg reduziu a solubilidade do TCP *in vitro*. Estudo de cultura de osteoblastos (XUE *et al.*, 2008) indicou que a presença do Mg

estabilizou a interface célula-material e assim aumentou a adesão celular e seu crescimento. Estes autores também demonstraram o potencial do TCP dopado com Mg para ser usado em ortopedia e odontologia, exibindo alta resistência mecânica, baixa absorção e melhor interação célula-material.

Na análise de difração de raios X, assim como SADER (2010), a incorporação de Mg na estrutura do TCP refletiu-se no deslocamento dos picos no difratograma para a direita em relação ao  $\beta$ -TCP (evidenciado pelos ângulos  $2\theta$ ), devido à substituição parcial de Ca-por-Mg, causando uma contração na dimensão da célula unitária e estabilização da estrutura. Este efeito pode ser atribuído ao menor raio iônico do Mg (0,65 Å) em relação ao Ca (0,99 Å), pois substituições por íons de menor dimensão levam a uma deformação na rede cristalina, favorecendo sua contração e, ao mesmo tempo, a estabilização da estrutura (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2006; KANNAN *et al.*, 2010; TARDEI *et al.*, 2006).

Diferentes biomateriais derivados de fosfatos de cálcio tem sido produzidos, incluindo a hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcico. Chama-se apatita cálcio deficiente aquela em que a relação Ca/P é menor que 1,67 (valor de referência para a HA estequiométrica) e pode ser obtida em decorrência de mudanças nos parâmetros de síntese, como temperatura e pH. No presente trabalho, o pó comercial de TCP foi de fato uma HA cálcio deficiente e a HA cálcio deficiente dopada com Mg (com a relação molar Mg/Ca = 0,15), foi sintetizada de forma que, após a sinterização em 1000°C, o material resultante foi  $\beta$ -tricálcio fosfato cristalino, confirmado pela análise de difração de raios X (Figura 5.1). Como previamente descrito, SADER *et al.* (2009), a incorporação de Mg na estrutura do TCP refletiu-se no deslocamento dos picos no difratograma para a direita em relação ao  $\beta$ -TCP, confirmando a presença de  $\beta$ -TCMP. Estes deslocamentos são devido à substituição parcial de Ca-por-Mg na estrutura do  $\beta$ -TCMP. Como os íons de Mg são menores que os íons de Ca, e estabilização da estrutura é aumentada (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2006; KANNAN *et al.*, 2010).

Segundo GUTH *et al.* (2011), um dos mecanismos que contribuem para a osteocondutividade de fosfatos de cálcio, envolve a rápida dissolução e liberação de íons cálcio e fosfato de sua rede cristalina, promovendo assim a rápida formação de uma camada de apatita na superfície do enxerto. Com o teste de dissolução, foi observada maior dissolução do Ca e P no  $\beta$ -TCP, que pode ser atribuída a sua maior porosidade e

menor densificação, quando comparado ao  $\beta$ -TCMP, que apresenta uma maior estabilidade estrutural resultante da incorporação do Mg, conforme também descrito na literatura por LI *et al.* (2009). O Mg quando incorporado na rede, substitui o Ca, o que também leva a uma menor quantidade de íons Ca disponíveis para a dissolução no  $\beta$ -TCMP. Como o Mg foi incorporado na rede do  $\beta$ -TCMP, o teor de Mg liberado destes grânulos é maior do que no  $\beta$ -TCP, que também apresentou liberação de Mg, pois conforme o Apêndice 10.2, a MERCK<sup>®</sup> afirma que o fosfato de cálcio apresenta  $\leq$  0,3% de Mg em sua composição. A quantidade de Mg liberada alcança saturação no 3º. dia, porém o  $\beta$ -TCMP apresenta uma quantidade quase 10 vezes mais teor de Mg na solução que o  $\beta$ -TCP. Na dissolução dos grânulos de  $\beta$ -TCMP, as quantidades de Mg e P liberadas alcançam saturação dentro de 3 dias, enquanto que a liberação de Ca continua aumentando após esse período. Porém há uma diminuição do teor de Ca e P entre o 1º. e 2º. dias, sugerindo haver reprecipitação destes íons neste período. Na dissolução dos grânulos de  $\beta$ -TCP, as quantidades de Ca e P liberadas aumentam até o 3º. dia, porém o Ca continua aumentando e o P diminui após este período, contudo a liberação de Mg declina intensamente até o 2º. dia e aumenta ligeiramente até o 3º. dia, quando atinge a sua saturação.

Neste estudo, utilizando o modelo de defeito ósseo crítico, foi apresentado que a incorporação de magnésio aumentou a capacidade do  $\beta$ -TCP em auxiliar o reparo ósseo. Ambos os grânulos,  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP, são biocompatíveis, visto que eles não agrediram o tecido hospedeiro e permitiram a aposição de osso neoformado nas bordas e em contato direto com a superfície dos grânulos. Depois do período de 6 meses, a presença do magnésio parece ter favorecido o aumento da formação óssea, principalmente nos grupos em que utilizou a membrana como barreira. Os grupos tratados com  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP, ambos com ROG, produziram cerca de quatro vezes mais osso do que os grupos I (coágulo) e II (apenas membrana). E o mais importante, o osso neoformado foi encontrado no centro do defeito ósseo nos grupos de  $\beta$ -TCP + membrana e  $\beta$ -TCMP + membrana, mas não nos grupos I e II. Em contraste, aos grupos com  $\beta$ -TCP (com ou sem membrana), o grupo  $\beta$ -TCMP + membrana sugere haver substituição parcial dos grânulos por osso neoformado e coalescência de ilhas ósseas, em contraste com aquelas amostras sem membrana.

Estes dados são mais relevantes, considerando o desenho experimental utilizado, pois é um grande desafio para o biomaterial promover o reparo ósseo de um defeito

crítico. O defeito produzido neste modelo animal atuou como um “defeito de tamanho crítico”, isto é, um defeito grande o suficiente para não ser reparado durante a vida do animal (BERNABÉ *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2009a; COSTA *et al.*, 2009b; DIMITRIOU *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2012), fazendo com que somente os biomateriais sejam capazes de efetivamente auxiliar no reparo ósseo e produzir um resultado significativamente superior ao grupo de coágulo sanguíneo. Nos grupos experimentais que utilizaram os biomateriais, o defeito foi parcialmente preenchido por osso, assim como relatado por outros autores (STAL *et al.*, 2001; TAGA *et al.*, 2008). O grupo coágulo apresentou apenas a reação inflamatória resultante do procedimento cirúrgico (ANDERSON *et al.*, 2008) e o usual processo de reparo do osso lesionado, com discreta formação óssea localizada nos bordos do defeito ósseo, sem aumento na densidade microvascular e nem apresentou diferença significativa na proliferação celular quando comparados com os grupos  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP, com ou sem membrana. No grupo tratado apenas com a membrana, houve um comportamento semelhante ao grupo coágulo, o que poderia ser atribuído à degeneração precoce da membrana, provavelmente decorrente ao infiltrado inflamatório crônico intenso, à sua pequena espessura e a presença de um conteúdo mineral, como reportado previamente (ACCORSI-MENDONÇA *et al.*, 2011). Isto é coerente com a reação tecidual e reparo nos defeitos ósseos, como previamente descrito (MARINS *et al.*, 2004).

No presente trabalho, a associação de ROG e enxerto de  $\beta$ -TCP/ $\beta$ -TCMP permitiram a formação de microvasos, o que provê células perivasculares pluripotentes capazes de se diferenciarem em osteoblastos e, ao mesmo tempo, impedir a invasão de fibroblastos no defeito ósseo, favorecendo melhor osteogênese (DIMITRIOU *et al.*, 2011; DIMITRIOU *et al.*, 2012; BERNABÉ *et al.*, 2012; STAL *et al.*, 2001; TAGA *et al.*, 2008). Isto, aliado com a osteocondutividade dos materiais baseados em fosfato de cálcio, poderia embasar a formação óssea na região central do defeito. De fato, no período de seis meses, em todas as amostras do grupo de  $\beta$ -TCMP + membrana foi encontrado osso neoformado no entorno dos grânulos no centro do defeito e em alguns animais deste grupo, foi observado também uma substituição parcial dos grânulos por osso e coalescência das ilhas ósseas, em contraste das amostras de  $\beta$ -TCP (com ou sem membrana). Como descrito acima, CAI *et al.* (2010) observaram que a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  existente no recobrimento, aumentou durante o tempo e foi maior em recobrimentos com Mg, do que aqueles sem Mg. Observaram também que Mg estimula a proliferação celular. Estas informações sugerem que, sendo um pouco menos

propenso à reabsorção, mas ainda reabsorvível, o  $\beta$ -TCMP poderia alcançar o reparo ósseo, permitindo o tempo necessário para a substituição do  $\beta$ -TCMP por osso.

Neste trabalho, foi confirmada a biocompatibilidade do  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP, visto que o osso neoformado em contato direto com os biomateriais foi abundante. Os resultados deste estudo estão em acordo com o estudo de ROKN *et al.* (2012) que observaram tecido ósseo neoformado constituído de osso trabecular e lamelar no entorno dos grânulos de  $\beta$ -TCP. ARTZI *et al.* (2001), observaram osso neoformado circundando e aderido às partículas de osso bovino poroso mineral na maioria das amostras analisadas. Osteoblastos foram observados dentro de uma camada osteóide, pavimentando a zona de interface das partículas e o tecido ósseo neoformado e a fração média de tecido ósseo foi de 48,3% na área mediana dos alvéolos dentários humanos. Previamente, COSTA (2008) estudou hidroxiapatitas com diferentes cristalinidades em defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos e observou 34% de área de osso neoformado nos grupos com baixa cristalinidade, similarmente, CONZ *et al.* (2011) encontraram 28% de área de osso neoformado nos grupos de baixa cristalinidade. Ambos os estudos foram realizados com 6 meses de observação, mas não utilizaram a membrana como barreira. Por outro lado, no presente trabalho, no mesmo período de 6 meses foi observado 40,5% de área de osso neoformado no grupo de  $\beta$ -TCMP + membrana e, mais excitantemente, foi também encontrado osso neoformado no centro do defeito em todas as amostras deste grupo, não apenas na borda do defeito.

O objetivo do uso da membrana foi atuar como barreira mecânica, evitando a infiltração de tecido conjuntivo na região do defeito crítico, o que poderia levar a fibrose e fazer o reparo ósseo mais difícil. Além disto, diferenças ocorreram na área de tecido conjuntivo, quando comparado o uso da membrana como barreira. COSTA (2008) e CONZ (2011) apresentaram, respectivamente, 41% e 47% de área de tecido conjuntivo e no presente trabalho foi observado 35% no grupo de  $\beta$ -TCMP + membrana. PERELMAN-KARMON *et al.* (2012) compararam alvéolos dentários humanos após as extrações preenchidos com osso mineral bovino com e sem recobrimento com membrana reabsorvível e concluíram que a quantidade de fração óssea aumentou com a membrana como regeneração tecidual guiada. A área de osso na sessão coronal com membrana foi 35,2% e sem membrana foi de 22,8%, depois de 9 meses de enxerto. ARTIZI *et al.* (2008) concluíram que a utilização da membrana

aumenta significativamente a quantidade de regeneração óssea dos defeitos de tamanho crítico na calvária de rato.

Células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho em contato direto com os biomateriais sugerem a tentativa de absorvê-los e foram observadas no presente trabalho, assim como reportado anteriormente (COSTA *et al.*, 2009a). Confirmando os achados de YASSUDA *et al.* (2012), a bioabsorção do material não foi afetada pela incorporação do magnésio, já que não houve alteração na densidade de volume do biomaterial (Figura 5.23). Estes dados estão em acordo com os resultados relatados por OGOSE *et al.* (2002), que avaliaram as características histológicas do  $\beta$ -TCP no fêmur humano e observaram células gigantes semelhantes à osteoclastos adjacentes às partículas de  $\beta$ -TCP.

ROY *et al.* (2012) não encontraram células semelhantes à osteoclastos em amostras de  $\beta$ -TCP dopada com Mg no 8º dia, indicando diminuição na diferenciação inicial de osteoclastos devido à adição do Mg. Depois de 21 dias de cultura, a formação de células semelhantes à osteoclastos foi evidente. Seus resultados indicaram que o substrato químico controlou a diferenciação de osteoclastos e a atividade de reabsorção, que pode ser usado no projeto de substitutos ósseos reabsorvíveis baseados em TCP, com propriedades de degradação controladas.

Assim, grânulos de  $\beta$ -TCMP parecem ser adequados para o preenchimento de defeitos ósseos e sua aplicação como enxerto ósseo poderia ser avaliado em estudos clínicos, como levantamento de seio maxilar e alvéolo dentário.

## 7. CONCLUSÕES

Os experimentos realizados neste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

1. A hidroxiapatita cálcio deficiente dopada com Mg (com a relação molar Mg/Ca = 0,15), foi sintetizada de forma que, após a sinterização em 1000°C, o material resultante foi fosfato tricálcico do tipo beta cristalino;
2. Houve reparo ósseo parcial nos grupos experimentais que utilizaram os biomateriais;
3. A biocompatibilidade dos materiais ( $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP) foi demonstrada pela aposição óssea em contato direto com os grânulos;
4. O osso neoformado aumentou nos períodos experimentais de seis meses nos grupos  $\beta$ -TCP + membrana ( $p < 0,05$ ) e  $\beta$ -TCMP + membrana ( $p < 0,001$ ), com o nível de neoformação óssea sendo 4 ou 5 vezes maior do que o encontrado no grupo coágulo;
5. O osso neoformado foi encontrado no centro do defeito ósseo nos grupos de  $\beta$ -TCP + membrana e  $\beta$ -TCMP + membrana, mas não nos grupos coágulo e apenas membrana;
6. Em contraste aos grupos com  $\beta$ -TCP (com ou sem membrana), os resultados relativos ao grupo  $\beta$ -TCMP + membrana sugerem haver substituição parcial dos grânulos por osso neoformado e coalescência de ilhas ósseas.

Com base nestas evidências foi possível concluir que, a implantação de grânulos de  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCMP no modelo de defeito crítico, mostrou que ambos os materiais são biocompatíveis e que sua associação com regeneração óssea guiada aumenta significativamente a formação óssea, alcançando até mesmo o centro do defeito.

## **8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Produzir o pó de hidroxiapatita cálcio deficiente sem magnésio, pois a adquirida comercialmente pela MERCK® apresentava magnésio em sua composição.
- Correlacionar o perfil das citocinas do metabolismo ósseo, presentes nos soros sanguíneos coletados dos animais utilizados, com os resultados obtidos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCORSI-MENDONÇA, T., ZAMBUZZI, W.F., BRAMANTE, C.M., *et al.*, 2011, “Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical-size calvarial defects”, *J Mater Sci: Mater Med*, v.22, pp.997-1004, doi:10.1007/s.10856-011-4278-7.

AMADEI, S. U., SILVEIRA, V. A. S, PEREIRA, A. C., *et al.*, 2006, “A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea”, *J Bras Patol Med Lab*, v. 42, n. 1, pp. 5-12.

AMERICAN ACADEMY OF ORTHOPAEDIC SURGEONS, 2010, “The evolving role of bone-graft substitutes”, 77<sup>th</sup> annual meeting, New Orleans, Louisiana, EUA.

ANDERSON, J.M, 2000, “Multinucleated giant cells”, *Curr Opin Hematol*, v.7, n. 1, pp. 40-47.

ANDERSON, J.M., 2001, “Biological responses to materials”, *Annu Rev Mater Res*, v. 31, pp. 81-110.

ANDERSON, J.M., RODRIGUEZ, A., CHANG, D.T., 2008, “Foreign body reaction to biomaterials”, *Semin. Immunol.*, v.23, n.3, pp.427-436,doi:10.1016/j.smim.2007.11.004.

ARTZI, Z., TAL, H., DAYAN, D., 2001, “Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets: 2. Histochemical observations at 9 months”, *J Periodontol*, v.72, n.2, pp.152-159, doi:10.1902/jop.2001.72.2.152.

ARTIZI, Z., KOZLOVSKY, A., NEMCOVSKY, C.E., *et al.*, 2008, “Histomorphometric evaluation of natural mineral combined with a synthetic cell-binding peptide (P-15) in critical-size defects in the rat calvaria”, *Int J Oral Maxillofac Implants*, v.23, n.6, pp.1063-1070.

ASAGIRI, M., TAKAYANAGI, H., 2007, “The molecular understanding of osteoclast differentiation”, *Bone*, v.40, n. 2, pp.251-264.

BANDYOPADHYAY, A., BERNARD, S., WEICHANG, X., *et al.*, 2006, “Calcium Phosphate-Based Resorbable Ceramics: Influence of MgO, ZnO, and SiO<sub>2</sub> Dopants”, *J. Am. Ceram. Soc.*, v. 89, n. 9, pp. 2675–2688.

BARRERE, F., BLITTERSWIJK, C. A., GROOT, K., 2006, “Bone regeneration molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics”, *Int. J. of Nanomedicine*, v.1, n. 3, pp. 317-332.

BERNABÉ, P.F., MELO, L.G., CINTRA, L.T., *et al.*, 2012, “Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae”, *Clin Oral Implants Res*, v.23, n. 3, pp. 384-388, doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02166.

BERNHARDT, A., THIEME, S., DOMASCHKE, H., *et al.*, 2010, “Crosstalk of osteoblast and osteoclast precursors on mineralized collagen – towards an in vitro model for bone remodeling”, *J Biomed Mater Res A*, v.95, n.3, pp.848-856.

BONEWALD, L. F., JOHNSON, M. L., 2008, “Osteocytes, mechanosensing and wnt signaling”, *Bone*, v. 42, n. 4, pp. 606-615.

BOSE, S., TARAFDER, S., BANERJEE, S.S., *et al.*, 2011, “Understanding *in vivo* response and mechanical property variation in MgO, SrO and SiO<sub>2</sub> doped  $\beta$ -TCP”, *Bone*, v.48, n.6, pp. 1282-1290, doi:10.1016/j.bone.2011.03.685.

BOSKEY, A.L., COLEMAN, R., 2010, “Aging and bone”, *J Dent Res*, v.89, n.12, pp.1333-1348, doi:10.1177/0022034510377791.

BOYNE, P. J., 1971, “Transplantation, implantation and grafts”, *Dent Clin North Am.*, v.15, n.2, pp. 433-543.

BRUZZANITI, A., BARON, R., 2006, “Molecular regulation of osteoclast activity”, *Rev Endocr Metab Disord.*, v,7, pp.123-139.

CAI, Y.L., ZHANG, J.J., ZHANG, S., *et al.*, 2010, “Osteoblastic cell response on fluoridated hydroxyapatite coatings: the effect of magnesium incorporation”, *Biomed. Mater.*, v. 5, pp. 1-7.

CALDERONI, D.R., GUIDI, M.C., KHARMANDAVAN, P., *et al.*, 2011, “Seven-year institutional experience in the surgical treatment of orbito-zygomatic fractures”, *J Craniomaxillofac Surg*, v.39, n.8, pp.593-599.

CHIARA, G., LETIZIA, F., LORENZO, F., *et al.*, 2012, “Nanostructured biomaterials for tissue engineered bone tissue reconstruction”, *Int J Mol Sci*, v.13, pp. 737-757, doi: 10.3390/ijms13010737.

CIANI, R. B., RAHAL., S. C, VOLPI, R. S *et al.*, 2006, “Mistura de proteínas morfogenéticas ósseas, hidroxiapatita, osso inorgânico e colágeno envolta por membrana de pericárdio no preenchimento de defeito ósseo segmentar em coelhos”, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 58, n. 1, pp. 59-67.

CONZ, M.B., GRANJEIRO, J.M., SOARES, G.D.A., 2005, “Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications as bone graft”, *J. Appl Oral. Sci.*, v. 13, n. 2, pp. 136-140.

CONZ, M.B., GRANJEIRO, J.M., SOARES, G.D.A., 2011, “Hydroxyapatite crystallinity does not affect the repair of critical size bone defects”, *J. Appl Oral. Sci.*, v. 19, n. 4, pp. 337-342.

COOPER, G.M., MOONEY, M.P., GOSAIN, A.K., *et al.*, 2010, “Testing the “critical-size” in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect (CSD)”, *Plast Reconstr Surg*, v.125, n.6, pp.1685-1692, doi:10.1097/PRS.0b013e3181cb63a3.

COSTA, N.M.F., 2008, *Avaliação da resposta tecidual a dois implantes de hidroxiapatita sintética durante o reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos*, Dissertação de M Sc, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

COSTA, N.M.F., MELO, B.R., BRITO, R.T., *et al.*, 2009a, “Quality and intensity of the tissue response to two synthetic granular hydroxyapatite implanted in critical defects of rat calvaria”, *Mater Res*, v.12, n.2, pp.245-251.

COSTA, N.M.F., MELO, B.R., BRITO, R.T., *et al.*, 2009b, “Techniques to study cellular response in critical size bone defect healing on rat calvaria treated with hydroxyapatite implants”, *Key Eng.*, v.398, n.8, pp.285-288.

DEBUSSCHER, F., AUNOBLE, S., ALSAWAD, Y., *et al.*, 2009, “Anterior cervical fusion with a bio-resorbable composite cage (beta TCP-PLLA): clinical and radiological results from a prospective study on 20 patients”, *J Craniomaxillofac Surg*, v.18, n.9, pp. 1314-1320, doi: 10.1007/s00586-009-1062-1.

DIMITRIOU, R., JONES, E., MCGONAGLE, D., *et al.*, 2011, “Bone regeneration: current concepts and future directions”, *BMC Medicine*, doi:10.1186/1741-7015-9-66.

DIMITRIOU, R., METALLOTAKIS, G.I., CALORI, G.M., *et al.*, 2012, “The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence”, *BMC Medicine*, doi:10.1186/1741-7015-10-81.

DOROZHKIN, S. V., 2007, “Calcium orthophosphates”, *J Mater Sci*, v. 42, pp. 1061-1095.

DOUNI, E., RINOTAS, V., MAKINO, E., *et al.*, 2012, “A RANKL G278R mutation causing osteopetrosis identifies a functional amino acid essential for trimer assembly in RANKL and TNF”, *Hum Mol Genet*, v.21, n.4, pp.784-798, doi:10.1093/hmg/ddr510.

ELSHAL, M.F., BERNAWI, A.E., AL-GHAMDY, M.A., *et al.*, 2012, “The association of bone mineral density and parathyroid hormone with serum magnesium in adult patients with sickle-cell anaemia”, *Arch Med Sci*, v.8, n.2, pp. 270-276, doi:10.5114/aoms.2012.28554.

FASSINA, L., SAINO, E., SBARRA, M.S., *et al.*, 2010, “*In vitro* electromagnetically stimulated SAOS-2 osteoblasts inside porous hydroxyapatite”, *J Biomed Mater Res A*, v.93, n.4, pp. 1272-1279, doi: 10.1002/jbm.a.32620.

FULMER, M. T., ISON, I. C., HANKERMAYER, C. R., *et al.*, 2002, “Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites”, *Biomaterials*, v. 23, n. 3, pp. 751-755.

GE, Z., BAGUENARD, S., LIM, L. Y, *et al.*, 2004, “Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes”, *Biomaterials*, v. 25, pp.1049-1058.

GENG, F., TAN, L.L., JIN, X.X., *et al.*, 2009, “The preparation, cytocompatibility and *in vitro* biodegradation study of pure beta-TCP on magnesium”, *J Mater Sci Mater Med*, v.20, n.5, pp.1149-1157.

GOMES, P.S., FERNANDES, M.H., 2011, “Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies”, *Lab Anim*, v.45, n.1, pp.14-24.

GRETZER, C., EMANUELSSON, L., LILJENSTEN, E., *et al.*, 2006, “The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials”, *J Biomater Polym*, v. 17, n. 6, pp. 669-687.

GUTH, K., CAMPION, C., BUCKLAND, T., *et al.*, 2011, “Effects of serum protein on ionic exchange between culture medium and microporous hydroxyapatite and silicate-substituted hydroxyapatite”, *J Mater Sci Mater Med*, v. 22, n. 10, pp. 2155-2164.

HENRIKSEN, K., BOLLERSLEV, J., EVERTS, V., *et al.*, 2011, “Osteoclast activity and subtypes as a function of physiology and pathology – implications for future treatments of osteoporosis”, *Endocr Rev*, v.32, n.1, pp.31-63, doi:10.1210/er.2010-0006.

HENRIKSEN, K., ANDREASSEN, K.V., THUDIUM, C.S., *et al.*, 2012, “A specific subtype of osteoclasts secretes factors inducing nodule formation by osteoblasts”, *Bone*, v.51, n.3, pp.353-361.

HUANG, C., DAS, A., BARKER, D., *et al.*, 2012, “Local delivery of FTY720 accelerates cranial allograft incorporation and bone formation”, *Cell Tissue Res*, v.347, n.3, pp.553-566, doi:10.1007/s00441-011-1217-3.

INOUE, M., LEGEROS, R.Z., INOUE, M., *et al.*, 2004, “*In vitro* response of osteoblast-like and odontoblast-like cells to unsubstituted and substituted apatites”, *Journal of Biomedical Materials Research A*, v.70, pp.585-593.

ISO 10993-9 (2001), Biological evaluation of medical devices. “Part 9: Degradation of materials related to biological testing”, International Organization for Standardization, Genebra, Suíça.

ISO 10993-14 (2001), Biological evaluation of medical devices. “Part 14: Identification and quantification of degradation products from ceramics”, International Organization for Standardization, Genebra, Suíça.

JIA, J., ZHOU, H., WEI, J., 2010, “Development of magnesium calcium phosphate biocement for bone regeneration”, *J R Soc Interface*, v. 7, pp. 1171-1180.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J., 2004, *Histologia Básica*. 10<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan.

KANNAN, S., GOETZ-NEUNHOEFFER, F., NEUBAUER, J., *et al.*, 2010, “Synthesis and structural characterization of strontium – and magnesium – co-substituted beta-tricalcium phosphate”, *Acta Biomater*, v.6, n.2, pp.571-576.

KATO, E., LEMLER, J., SAKURAI, K., *et al.*, 2012, “Biodegradation property of beta-tricalcium phosphate-collagen composite in accordance with bone formation: a comparative study with Bio-Oss Collagen® in a rat critical-size defect model”, *Clin Implant Dent Relat Res*, doi:10.1111/j.1708-8208.2012.00467.x.

KHALED, E.G., SALEH, M., HINDOCHA, S., *et al.*, 2011, “Tissue engineering for bone production – stem cells, gene therapy and scaffolds”, *Open Orthop J*, v.5, pp. 289-295, doi: 10.2174/1874325001105010289.

KOKUBO, T., TAKADAMA, H., 2006, “How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?”, *Biomaterials*, v.27, n.15, pp. 2907-2915.

KOSTOPOULOS, L., KARRING, T., 2000, “Regenerations of the sagittal suture by GTR and its impact on growth of the cranial vault”, *J. Craniofac. Surg.*, v.11, n.6, pp.553-561.

KRAMER, I., HALLEUX, C., KELLER, H., *et al.*, 2010, “Osteocyte wnt/ $\beta$ -catenin signaling is required for normal bone homeostasis”, *Mol Cell Biol*, v.30, n.12, pp.3071-3085, doi:10.1128/MCB.01428-09.

LANDI, E., LOGROSCINO, G., PROIETTI, L., *et al.*, 2008, “Biomimetic Mg-Substituted hydroxyapatite: from synthesis to *in vivo* behavior”, *J Mater Sci:Mater Med*, v.19, pp. 239-247.

LI, X., ITO, A., SOGO, Y., *et al.*, 2009, “Solubility of Mg-containing  $\beta$ -tricalcium phosphate at 25°C”, *Acta Biomater.*, v. 5, n.1, pp. 508-517.

LICHTE, P., PAPE, H.C., PUFER, T., *et al.*, 2011, “Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence”, *Injury*, v.42, n.6, pp. 569-573.

LINDHE, J., KARRING, T., LANG, N. P., 2005, *Tratado de periodontia clinica e implantologia oral.*, 4<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan.

LIPPUNER, K., 2012, “The future of osteoporosis treatment – a research update”, *Swiss Med Wkly*, 142, w13624, doi:10.4414/smw.2012.13624.

LIU, F., KOHLMEIER, S., WANG, C.Y., 2008, “Wnt Signaling and Skeletal Development”, *Cell Signal*, v. 20, n. 6 (Jun), pp. 999–1009.

LUTTIKHUIZEN, D.T., HARMSE, M.C., VAN LUYN, M.J., 2006, “Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction”, *Tissue Eng*, n. 12, v. 7, pp. 1955-1970.

MANDARIN-DE-LACERDA, C. A., 2003, "Stereological tools in biomedical research", *An Acad Bras Cienc*, v. 75, n. 4, pp. 469-486.

MARCHI, J., DANTAS, A.C.S., GREIL, P *et al.*, 2007," Influence of Mg-substitution on the physicochemical properties of calcium phosphate powders", *Mat Res Bulletin*, v.42, pp.1040-1050.

MARDAS, N., KOSTOPOULOS, L., KARRING, T., 2002, "Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralized bone matrix and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat". *J. Craniofac. Surg.*, v.13, n.3, pp.453-462.

MARINS, L.V., CESTARI, T.M., SOTTOVIA, A.D., *et al.*, 2004, "Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material", *J Appl Oral Sci*, v.12, n.1, pp. 62-69.

MATASSI, F., NISTRÌ, L., PAEZ, D.C., *et al.*, 2011 "New biomaterials for bone regeneration", *Clin Cases Miner Bone Metab*, v.8, n.1, pp. 21-24.

MEIJER, G. J., BRUIJN, J. D., KOOLE, R. *et al.*, 2007, "Cell-based bone tissue engineering", *PloS Med*, v. 4, n. 2 pp. 260-264.

MISCH, C.E., 2006, *Implantes dentários contemporâneos*, 2ª ed., São Paulo, Ed. Santos.

NEVE, A., CORRADO, A., CANTATORE, F.P., 2011, "Osteoblast physiology in normal and pathological conditions", *Cell Tissue Res*, v.343, n.2, pp.289-302, doi:10.1007/s00441-010-1086-1.

OGOSE, A., HOTTA, T., HATANO, H., *et al.*, 2002, "Histological examination of beta-tricalcium phosphate graft in human femur", *J Biome Mater Res*, v.63, n.5, pp.601-604.

PAGNI, G., PELLEGRINI, G., GIANNOBILE, W.V., *et al.*, 2012, “Postextraction alveolar ridge preservation: biological basis and treatments”, *Int J Dent*, doi: 10.1155/2012/151030.

PARK, S.Y, KIM, K.H., KOO, K.T., 2011, “The evaluation of the correlation between histomorphometric analysis and micro-computed tomography analysis in AdBMP-2 induced bone regeneration in rat calvarial defects”, *J Periodontal Implant Sci*, v.41, pp.218-226, doi:10.5051/jpis.2011.41.5.218.

PAULO, A.O., CASTRO-SILVA, I.I., OLIVEIRA, D.F., *et al.*, 2011, “Repair of critical-size defects with autogenous periosteum-derived cells combined with bovine anorganic apatite/collagen: an experimental study in rat calvaria”, *Braz Dent J*, v.22, n.4, pp.322-328.

PAZZAGLIA, U.E., CONGIU, T., RASPANTI, M., *et al.*, 2009, “Anatomy of the intracortical canal system – scanning electron microscopy study in rabbit femur”, *Clin Orthop Relat Res*, v.467, pp.2446-2454, doi:10.1007/s11999-009-0806-x.

PERELMAN-KARMON, M., KOZLOVSKY, A., LILOY, R., *et al.*, 2012, “Socket site preservation using bovine mineral with and without a bioresorbable collagen membrane”, *Int J Periodontics Restorative Dent*, v.32, n.4, pp.459-465.

ROKN, A.R., MOSLEMI, N., ESLAMI, B., *et al.*, 2012, “Histologic evaluation of bone healing following application of anorganic bovine bone and  $\beta$ -tricalcium phosphate in rabbit calvaria”, *J Dent (Tehran)*, v.9, n.1, pp.35-40.

ROY, M., BOSE, S., 2012, “Osteoclastogenesis and osteoclastic resorption of tricalcium phosphate: effect of strontium and magnesium doping”, *J Biomed Mater Res A*, v.100, n.9, pp. 2450-2461, doi:10.1002/jbm.a.34181.

RUDE, RK, SINGER F.R., GRUBER H.E., 2009, “Skeletal and hormonal effects of magnesium deficiency”, *J Am Coll Nutr*, v.28, n.2, pp. 131-141.

RYU, H.S., HONG, K.S., LEE, J.K., *et al.*, 2004, “Magnesia-doped HA/ $\beta$ -TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility”, *Biomaterials*, v.25, pp.393-401.

SADER, M. S., 2010, *Fosfato tricálcico substituído por magnésio e compósito magnésio – carbonato apatita – colágeno aniônico como potencial substituto ósseo*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SADER, M. S., LE GEROS, R. Z., SOARES, G.A., 2009, “Human osteoblasts adhesion and proliferation on magnesium substituted tri-calcium phosphate dense tablets”, *J Mater Sci Mater Med*, v.20; pp. 521-527.

SAKAE, T., OOKUBO, A., LEGEROS, R.Z., *et al.*, 2003, “Bone formation induced by several carbonate and fluoride containing apatite implanted in dog mandible”, *Key Engineer Materials*, v.240-242, pp.395-398.

SALGADO, P.C., SATHLER, P.C., CASTRO, H.C., *et al.*, 2011, “Bone remodeling, biomaterials and technological applications: revisiting basic concepts”, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, v.2, n.3, pp.318-328, doi:10.4236/jbmb.2011.23039.

SHEPHERD, J.H., SHEPHERD, D.V., BEST, S.M., 2012, “Substituted hydroxyapatites for bone repair”, *J Mater Sci Mater Med*, v.23, n.10, pp. 2335-2247.

SIMONET, W.S., LACEY, D. L., DUNSTAN, C. R. *et al.*, 1997, “Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density”, *Cell*, v.89, pp. 289-309.

SINGH, P.P., VAN DER KRAAN, A.G., XU, J., GILLESPIE, M.T., *et al.*, 2012, “Membrane-bound receptor activator of NFkB ligand (RANKL) activity displayed by osteoblasts in differentially regulated by osteolytic factors”, *Biochem Biophys Res Commun*, v. 422, n.1, pp.48-53.

SPICER, P.P., KRETLOW, J.D., YOUNG, S., *et al.*, 2012, “Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect”, *Nat Protoc*, v.7, n.10, doi:10.1038/nprot.2012.113.

STAL, S., TJELMELAND, K., HICKS, J., *et al.*, 2001, “Compartmentalized bone regeneration of cranial defects with biodegradable barriers: an animal model”, *J Craniofacial Surg*, v.12, n.1, pp. 41-47.

STEPHAN, S.J., THOLPADY, S.S., GROSS, B., 2010, “Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect”, *Laryngoscope*, v.120, n.5, pp.895-901, doi:10.1002/lary.20624.

SUBBAIAH, R., THOMAS, B., 2011, “Efficacy of a bioactive alloplast, in the treatment of human periodontal osseous defects – a clinical study”, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 16, n.2, pp. 239-244.

SUCHANEK, W.L, BYRAPPA, K, SHUK, P *et al.*, 2004, “Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical–hydrothermal method”. *Biomaterials*, v. 25, pp.4647–4657.

TAGA, M.L., GRANJEIRO, J.M., CESTARI, T.M., *et al.*, 2008, “Healing of critical-size cranial defects in guinea pigs using a bovine bone-derived resorbable membrane”, *Int J Oral Maxillofac Implants*, v.23, n.3, pp.427-436.

TARDEI, C., GRIGORE, F., PASUK, I., *et al.*, 2006, “The study of Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> substitution of β-tricalcium phosphate”, *J Optoelectron Adv M*, v.8, n.2, pp.568-571.

TERELLA, A., MARINER, P., BROWN, N., *et al.*, 2010, “Repair of a calvarial defect with biofactor and stem cell embedded poly (ethylene glycol) scaffold”, *Arch Facial Plast Surg*, v.12, n.3, pp.166-171, doi:10.1001/archfacial.2010.37.

TONELLI, P., DUVINA, M., BARBATO, L., *et al.*, 2011, “Bone regeneration in dentistry”, *Clin Cases Miner Bone Metab*, v.8, n.3, pp. 24-28.

TULJAPURKAR, S.R., McGUIRE, T.R., BRUSNAHAN, S.K., *et al.*, 2011, “Changes in human bone marrow fat content associated with changes in hematopoietic stem cell numbers and cytokine levels with aging”, *J Anat*, v.219, n.5, pp.574-581, doi:10.1111/j.1469-7580.2011.01423.x.

WALKER, C. G., DANGARIA, S., ITO, Y., *et al.*, 2010 “Osteopontin is required for unloading-induced osteoclast recruitment and modulation of RANKL expression during tooth drift-associated bone remodeling, but not for super-eruption”, *Bone*, v.47, n.6, pp.1020-1029, doi:10.1016/j.bone.2010.08.025.

WANG, S., KEMPEN, D.H.R., YASZEMSKI, M.J., *et al.*, 2009, “The roles of matrix polymer crystallinity and hydroxyapatite nanoparticles in modulating materials properties of photo-crosslinked composites and bone marrow stromal cell responses”, *Biomaterials*, v. 30, n.20, pp. 3359-3370, doi:10.1016/j.biomaterials.2009.03.015.

WOPENKA, B., PASTERIS, J.D., 2005, “A mineralogical perspective on the apatite in bone” *Materials Science and Engineering C*, v.25, pp.131-143.

XU, L., LV, K., ZHANG, W., *et al.*, 2012, “The healing of critical-size calvarial bone defects in rat with rhPDGF-BB, BMSCs, and  $\beta$ -TCP scaffolds”, *J Mater Sci Mater Med*, v.23, n.4, pp.1073-1084.

XU, Q., LU, H., ZHANG, J., *et al.*, 2010, “Tissue engineering scaffold material of porous nanohydroxyapatite/polyamide 66”, *Int J Nanomedicine*, v.5, pp.331-335.

XUE, W., DAHLQUISST, K., BANERJEE, A., *et al.*, 2008, “Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with An and Mg based dopants”, *J Mater Sci Mater Med*, v.19, n.7, pp. 2669-2677.

YANNAS, I.V., 2005, “Similarities and differences between induced organ regeneration in adults and early foetal regeneration”, *J. R. Soc. Interface*, v.2, pp. 403-417.

YAO, F., LEGEROS, J.P., LEGEROS, R.Z., 2009, “Simultaneous incorporation of carbonate and fluoride in synthetic apatites: Effect on crystallographic and physico-chemical properties”, *Acta Biomaterialia* v.5, pp.2169-2177.

YASSUDA, D.H., 2012, *Estudo do reparo ósseo em alvéolo dentário de ratos após implantação de fosfato tricálcico do tipo beta ( $\beta$ -TCP) e  $\beta$ -TCP contendo magnésio*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

YASSUDA, D.H., COSTA, N.M.F., TAVARES, D., *et al.*, 2012, “Study of bone repair in rat dental socket after implantation of porous granules of beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) and magnesium substituted beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCMP)”, *Key Eng*, v.493-494, pp.263-268.

YASSUDA D.H., COSTA, N.M.F., FERNANDES, G.O., *et al.*, aceito em outubro de 2012, “Magnesium incorporation into  $\beta$ -TCP reduced its *in vivo* resorption by decreasing parathormone production”, *J Biome Mater Res Part A*.

YUAN, H., FERNANDES, H. HABIBOVIC, P., *et al.*, 2010, “Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting”, *Proc Nati Acad Sci USA*, 107(31), pp. 13614-13619.

ZHANG, X., JIANG, F., GROTH, T., *et al.*, 2008, “Preparation, characterization and mechanical performance of dense beta-TCP ceramics with/without magnesium substitution”, *J Mater Sci Mater Med*, v.19, pp.3063-3070.

ZHAO, S. F., JIANG, Q. H., PEEL, S., *et al*, 2011, “Effects of magnesium – substituted nanohydroxyapatite coating on implant osseointegration”, *Clin Oral Implants Res*, v. 6, pp. 1-8.

ZHAO, W., WANG, J., ZHAI, W., *et al.*, 2005, “The self-setting properties and *in vitro* bioactivity of tricalcium silicate”, *Biomaterials*, v. 26, n. 31, pp. 6113-6121.

ZONG, C., XUE, D., YUAN, W., *et al.*, 2010, “Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds”, *Eur Cell Mater*, v. 1 n.20, pp:109-120.

ZYMAN, Z.Z., ROKHMISTROV, D.V., GLUSHKO, V.I., *et al.*, 2009, “Thermal impurity reactions and structural changes in slightly carbonated hydroxyapatite”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 20, pp.1389-1399.

## 10. APÊNDICE

### 10.1 - Aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais





Serviço Público Federal  
Universidade Federal Fluminense  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética no Uso de Animais

*C*ertificamos que o projeto nº 53, intitulado “ ESTUDO DO REPARO ÓSSEO EM CALVÁRIA DE RATOS APÓS IMPLANTAÇÃO DE GRÂNULOS DE  $\beta$ -FOSFATO TRICALCICO ( $\beta$ -TCP) E DE  $\beta$ -TCP CONTENDO MAGNÉSIO ( $\beta$ -TCMP)” sob a orientação da Prof. GLÓRIA DULCE DE ALMEIDA SOARES (pesquisador responsável) do Departamento ESCOLA POLITÉCNICA COPPE/UFRJ, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 14 de de Abril de 2011

Niterói, 15 de ABRIL de 2011 .

  
Presidente do C.E.P.A.

## 10.2 – Composição do fosfato de cálcio fabricado pela MERCK®



# Specification

---

1.02143.9025 Calcium phosphate dried suitable for use as excipient  
EMPROVE® exp Ph Eur, BP, E 341

---

	Spec. Values	
Assay Ca (complexometric)	35.0 - 40.0	%
Assay (as Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (calc. o. ignited subst.))	≥ 90.2	%
Identity	passes test	
Substances insoluble in hydrochloric acid	≤ 0.1	%
Carbonate (as CO <sub>2</sub> )	passes test	
Chloride (Cl)	≤ 0.1	%
Fluoride (F)	≤ 0.005	%
Sulphate (SO <sub>4</sub> )	≤ 0.5	%
Heavy metals (as Pb)	≤ 0.001	%
Al (Aluminium)	≤ 0.0150	%
As (Arsenic)	≤ 0.0001	%
Cd (Cadmium)	≤ 0.0001	%
Fe (Iron)	≤ 0.04	%
Hg (Mercury)	≤ 0.0001	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.3	%
Na (Sodium)	≤ 0.2	%
Pb (Lead)	≤ 0.0001	%
Si (Silicon)	≤ 0.05	%
Residual solvents (Ph. Eur./ICH)	excluded by production process	
Loss on ignition (800 °C)	≤ 8.0	%
Particle size (< 0.05 mm)	about 98 %	
Water	≤ 2.5	%

*Residues of metal catalysts or metal reagents acc. to EMEA/C HMP/SWP/4446/2008 are not likely to be present.*

Corresponds to Ph Eur, BP, E 341  
Conforms to the purity criteria on food additives according to the current European Commission Regulation.

Dr. Matthias Ohm  
responsible laboratory manager quality control

*This document has been produced electronically and is valid without a signature*

---

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany); +49 6151 72-0  
EMD Millipore Corporation - A division of Merck KGaA, Darmstadt, Germany  
290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Phone: (781) 533-6000  
SA-71021438000008008 V. 075 Date: 05.02.2013

Page 1 of 1