COPPE
Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia
UFRJ

ESTUDO DO REPARO ÓSSEO EM ALVÉOLO DENTÁRIO DE RATOS APÓS IMPLANTAÇÃO DE FOSFATO TRICÁLCICO DO TIPO BETA (β-TCP) E β-TCP CONTENDO MAGNÉSIO

Debora Helena Yassuda de Mattos

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
Agosto de 2012

ESTUDO DO REPARO ÓSSEO EM ALVÉOLO DENTÁRIO
DE RATOS APÓS IMPLANTAÇÃO DE FOSFATO TRICÁLCICO DO TIPO BETA
(β-TCP) E β-TCP CONTENDO MAGNÉSIO

Debora Helena Yassuda de Mattos

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA 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:

_____
Profª. Glória Dulce de Almeida Soares, D. Sc.

_____
Prof. José Mauro Granjeiro, D. Sc.

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

_____
Prof. Luiz Carlos Pereira, D. Sc.

_____
Prof. Guttemberg Gomes Alves, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
AGOSTO DE 2012

Yassuda de Mattos, Debora Helena

Estudo do reparo ósseo em alvéolo dentário de ratos após implantação de fosfato tricálcico do tipo beta (β-TCP) e β-TCP contendo magnésio/ Debora Helena Yassuda de Mattos. – Rio de Janeiro: UFRJ/ COPPE, 2012.

XV, 70 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, 2012.

Referências Bibliográficas: p. 58 - 64.

1. Biomateriais. 2. β-TCP. 3. β-TCMP. 4. Reparo ósseo. I. Soares, Glória Dulce de Almeida; Granjeiro, José Mauro. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título.

A Paola e Ligia, alegria maior da minha vida, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à profª. Glória Dulce de Almeida Soares pela orientação segura e serena, pela presença constante e tranquilizadora, dando a certeza de que estava ao meu lado, sempre que precisasse.

Ao prof. José Mauro Granjeiro pela confiança em mim depositada e pelo estímulo permanente. Sua paixão pela pesquisa é contagiante, foi o combustível para a realização deste trabalho.

À Neusa Motta de Freitas Costa, companheira de curso, de trabalho e de maratonas. Sem sua companhia teria sido muito mais difícil. Admiro imensamente sua força e determinação. Obrigada por nunca me deixar desanimar.

Ao Gustavo de Oliveira Fernandes pela ajuda imprescindível na fase cirúrgica dos experimentos. Mostrou-se um grande amigo, sempre presente, pronto para ajudar no que fosse necessário.

À Márcia Soares Sader pela orientação e paciência durante o preparo do biomaterial.

À profª. Adriana Therezinha Alves, por estar sempre disponível nas inúmeras vezes que precisei de sua ajuda para realizar a análise histológica.

Ao prof. Guttemberg Gomes Alves pela análise sorológica dos animais e pela ajuda preciosa no preparo do artigo científico.

À colega Maria Helena Santiago pela amizade e bom humor, mesmo nos momentos difíceis. Seu bom senso muito me ajudou nos momentos de decisão.

Às colegas Luciana Rougemont Squeff e Sania Ornellas pela amizade, apoio e palavras de incentivo nas horas difíceis.

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

ESTUDO DO REPARO ÓSSEO EM ALVÉOLO DENTÁRIO
DE RATOS APÓS IMPLANTAÇÃO DE FOSFATO TRICÁLCICO DO TIPO (β-TCP)
E β-TCP CONTENDO MAGNÉSIO

Debora Helena Yassuda de Mattos
Agosto / 2012

Orientadores: Glória Dulce de Almeida Soares
José Mauro Granjeiro

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

A enxertia de tecido ósseo é frequentemente necessária no tratamento de lesões ósseas extensas. O fosfato tricálcico tipo beta (β-TCP) tem sido amplamente estudado como alternativa aos implantes autógenos. Os objetivos deste estudo foram produzir grânulos de β-TCP e β-TCMP para o preenchimento de alvéolo dentário de 45 animais (*Rattus norvegicus*), avaliando o efeito do magnésio na reação inflamatória e reparo ósseo. Os animais foram divididos em: grupo I (coágulo, controle), grupo II (β-TCP) e grupo III (β-TCMP). Os sacrifícios ocorreram aos 7, 21 e 42 dias (n=5/grupo/período). Na análise histológica verificou-se a intensidade do infiltrado inflamatório e a neoformação óssea, e na análise histomorfométrica quantificou-se a área de osso neoformado, tecido conjuntivo e de biomaterial. Observou-se, na maioria dos animais, processo inflamatório difuso com presença de neutrófilos, linfócitos e macrófagos. β-TCP e β-TCMP tiveram resultados semelhantes em relação à área de tecido ósseo neoformado. Os grânulos de β-TCP sofreram reabsorção significativamente mais intensa que os grânulos de β-TCMP, aos 7 e 42 dias. Os níveis séricos do fator NF-κB ligand (RANK-L), osteprotegerina (OPG), osteocalcina (OC), osteopontina (ON) e paratormônio (PTH) foram determinados utilizando tecnologia luminex e painéis de imunoensaio. O grupo β-TCP apresentou o dobro da quantidade de RANK-L dos grupos β-TCMP e controle no 21^{o} dia ($p<0,05$). O nível de PTH no grupo β-TCP aumentou de zero no 7^{o} dia para 3pg/mL no dia 21 ($p<0,05$); no 42^{o} dia o nível plasmático de PTH foi mais que 2 vezes maior ($p<0,05$). Concluiu-se que a implantação do β-TCP estimulou a produção de PTH e RANK-L.

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

STUDY OF BONE REPAIR IN RAT DENTAL ALVEOLUS AFTER IMPLANTATION OF BETATRICALCIUMPHOSPHATE (β -TCP) AND MAGNESIUM-CONTAINING β -TCP

Debora Helena Yassuda de Mattos

August/2012

Advisors: Glória Dulce de Almeida Soares
José Mauro Granjeiro

Department: Metallurgic and Materials Engineering

Bone-grafting is frequently necessary to stimulate bone-healing. Beta-tricalcium phosphate (β-TCP) has been widely studied as a bone-substitute material. β-TCP and β -TCP doped with magnesium ions (β-TCMP) dense granules with diameters ranging from 250μm to 500μm were implanted into dental alveoli of 45 rats (*Rattus norvegicus*) and their effect on inflammatory response and bone repair were evaluated. The animals were divided in three groups: group I (control, no treatment), group II (β-TCP) and group III (β-TCMP); the sacrifices occurred at 7 , 21 and 42 days (n=5/group/period). Histological and histomorphometric analysis were performed to observe and measure connective tissue, bone neoformation and biomaterial areas. Most animals showed acute inflammatory response with neutrophil granulocytes, limphocytes and foreign body giant multinucleated cells associated to both biomaterials. Bone formation area was similar in β-TCP and β-TCMP groups. Resorption of β-TCP granules was significantly higher than magnesium-containing granules, at days 7 and 42. Plasmatic levels of nuclear factor- **κ** B ligand (RANK-L), osteoprotegerin (OPG), osteocalcin (OC), osteopontin (ON) and parathormone (PTH) were evaluated using luminex technology and multiplex immunoassay panels. β-TCP group presented two times the amount of RANK-L presented by β-TCMP and control groups at day 21($p<0.05$). PTH level in β-TCP group raised from zero at day 7 to 3pg/mL at day 21 ($p<0.05$); at 42nd day the amount of plasmatic PTH was more than 2 times higher ($p<0.05$). We concluded that β-TCP implantation stimulated PTH and RANK-L synthesis.

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO 01

II REVISÃO DA LITERATURA 03
II.1 Tecido ósseo 03
II.2 Remodelação e reparo ósseo 03
II.2.1 Osteoblastos 04
II.2.2 Osteoclastos 05
II.2.3 Osteócitos 07
II.3 Reguladores da remodelação óssea 07
II.3.1 RANK, RANK-L, Osteoprotegerina 08
II.3.2 Paratormônio e Vitamina D 09
II.3.3 Osteocalcina 10
II.3.4 Osteopontina 11
II.4 Enxertos ósseos 12
II.4.1 Autógeno 12
II.4.2 Alógeno 13
II.4.3 Sintético 13
II.5 Ortofosfatos de cálcio 13
II.5.1 Propriedades físico-químicas 15
II.5.1.1 Osteocondução e osteoindução 15
II.5.1.2 Dissolução e biorreabsorção 15
II.5.1.3 Bioatividade 16
II.5.2 Resposta do hospedeiro ao enxerto de ortofosfato de cálcio 17
II.5.2.1 Células inflamatórias 17
II.5.2.2 Resposta inflamatória 18
II.5.2.3 Formação do tecido ósseo 19
II.5.3 Fosfato tricálcico do tipo beta 19
II.5.3.1 Síntese do β-TCP 20
II.5.4 Fosfato tricálcico do tipo beta contendo magnésio 21

III OBJETIVOS 23

IV METODOLOGIA DA PESQUISA 24
IV.1 Material 24
IV.1.1 Pós de β-TCP e β-TCMP 24
IV.1.1.1 β-TCP 24
IV.1.2.2 Síntese do β-TCMP 24
IV.1.2 Obtenção de grânulos densos de β-TCP e de β-TCMP 25
IV.1.3 Calcinação 25
IV.1.4 Caracterização 26
IV.1.4.1 Difração de raio X (DRX) 26
IV.1.4.2 Análise no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 26
IV.1.5 Esterilização 26
IV.2 Estudo da biocompatibilidade 27
IV.2.1 Grupos experimentais 27
IV.2.1.1 Grupo I 27
IV.2.1.2 Grupo II 27
IV.2.1.3 Grupo III 27
IV.2.2 Procedimentos cirúrgicos 27
IV.2.3 Sacrifício e coleta das amostras 28
IV.2.4 Desmineralização e processamento histotécnico 29
IV.2.5 Análise histológica descritiva 29
IV.2.6 Histomorfometria 29
IV.2.6.1 Análise estatística 31
IV.2.7 Quantificação de RANK-L, osteoprotegerina, paratormônio, osteocalcina e osteopontina 31
IV.2.7.1 Análise estatística 32

V RESULTADOS E DISCUSSÃO 33
V.1 Caracterização 33
V.1.1 Difração de raio X 33
V.1.2 Análise no infravermelho por transformada de Fourier 34
V.2 Estudo da biocompatibilidade 36
V.2.1 Análise histológica descritiva 37
V.2.2 Histomorfometria 45
V.2.3 Quantificação do RANK-L, osteoprotegerina, osteocalcina, osteopontina e paratormônio 49
V.2.3.1 RANK-L 49

	V.2.3.2	Osteoprotegerina	50
	V.2.3.3	RANK-L / Osteoprotegerina	51
	V.2.3.4	Osteocalcina	51
	V.2.3.5	Osteopontina	52
	V.2.3.6	Paratormônio	53
VI	CONSIDERAÇÕES FINAIS		55
VII	CONCLUSÕES		58
VIII	SUGESTÕES FUTURAS		59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS			60
ANEXOS			67

LISTA DE FIGURAS

Figura II.1. O sistema de transporte iônico na borda pregueada apical e nas membranas basais laterais permite extrusão dos prótons via ATPase vacuolar da borda pregueada apical paralelamente à condutância do cloreto. A anidrase carbônica gera os prótons e as mitocôndrias geram ATP.....6

Figura II.2. Osteoclasto, osteoblasto, osteócito e várias moléculas estão envolvidos na remodelação óssea. RANK-L, expresso na superfície das células pré-osteoblásticas, liga-se ao RANK das células precursoras dos osteoclastos. OPG inviabiliza todo o sistema ao bloquear os efeitos do RANK-L.....8

Figura II.3. Diagrama esquemático dos eventos que ocorrem na interface entre a biocerâmica e o ambiente biológico circundante.....17

Figura IV.1. Síntese do pó de apatita cálcio deficiente contendo magnésio..... 25

Figura IV.2. Extração do incisivo superior direito e implantação do biomaterial.....28

Figura IV.3. (A) Maxila dissecada. (B) Hemimaxila direita, vista distolateral.....29

Figura IV.4. Montagem esquemática das fotomicrografias dos 6 campos do terço médio do alvéolo dental.....30

Figura V.1. Difratograma dos grânulos de β-TCP (JCPDS 09-0432) e de β-TCMP (JCPDS 13-0404).....34

Figura V.2. Espectro de FT-IR do β-TCP (pó) com e sem calcinação (verde).....35

Figura V.3. Espectro de FT-IR do β-TCMP (pó) com e sem calcinação (verde).....35

Figura V.4. Fotomicrografia do reparo tecidual (HE- hematoxilina-eosina). Grupo I apresentou, aos 7 dias, pequenas ilhas de osso neoformado (setas), dispersas em extensa área de tecido conjuntivo (TC).....37

Figura V.5. Fotomicrografia Grupo I (HE). Aos 21 dias, houve aumento da área de osso neoformado (ON) e redução da área de coágulo e tecido conjuntivo (TC).....38

Figura V.6. Fotomicrografia Grupo I (HE). Aos 42 dias houve predomínio das áreas de neoformação óssea (ON) sobre as áreas de tecido conjuntivo (TC).....38

Figura V.7. Fotomicrografia Grupo II (HE). Aos 7 dias, os grânulos de β-TCP (Bm) encontravam-se dispersos em área de infiltrado inflamatório difuso (IIn). Presença de pequenas áreas de osso neoformado (setas).....39

Figura V.8. Fotomicrografia Grupo II (HE). Em maior aumento (aumento 40x), presença de células polimorfonucleadas (setas) próximo a grânulo de biomaterial (Bm).....40

Figura V.9. Fotomicrografia Grupo II (HE). Aos 21 dias verificou-se redução das áreas de infiltrado inflamatório agudo (IIn) e aumento da quantidade de osso neoformado (ON) associado ao biomaterial (Bm).....40

Figura V.10. Fotomicrografia Grupo II, 21 dias (HE). Observou-se, próximo ao biomaterial (Bm), concentração de células arredondadas, fortemente coradas, sugestivas de osteoblastos (setas) (aumento 40x).....41

Figura V.11. Fotomicrografia Grupo II, 21 dias (HE). Observou-se incremento das áreas de osso neoformado, diminuição da superfície de biomaterial e persistência de pequenas ilhas de tecido inflamatório.....41

Figura V.12. Fotomicrografia (HE). No grupo III, aos 7 dias, observou-se áreas focais de infiltrado inflamatório agudo (IIn) e pequenas áreas de tecido ósseo neoformado (setas) em associação aos grânulos de β-TCMP (Bm).....42

Figura V.13. Fotomicrografia Grupo III, 7 dias (HE). Em maior aumento (aumento 100x), foi possível observar a presença de linfócitos (setas), adjacentes ao biomateral (Bm) e a um vaso sanguíneo (VS).....43

Figura V.14. Fotomicrografia Grupo III (HE). A área de neoformação óssea (setas) aumentou consideravelmente aos 21dias.....43

Figura V.15. Fotomicrografia Grupo III, 21 dias (HE). Adjacente a vaso sanguíneo (VS), observa-se osso neoformado (ON) e osteócitos (setas) no seu interior (aumento 100x).....44

Figura V.16. Fotomicrografia Grupo III (HE). Aos 42 dias observou-se osso neoformado (On) e fileira de osteoblastos (setas) adjacentes a grânulo de β-TCMP (Bm) (aumento 40x).....44

Figura V.17. Fotomicrografia Grupo III, 42 dias (HE). Coalescência do osso neoformado (ON) entre os grânulos de β-TCMP (Bm).....45

Figura V.18. Densidade de volume de tecido conjuntivo (mm^2) nos grupos coágulo, β-TCMP e β-TCP, aos 7, 21 e 42 dias.....46

Figura V.19 . Área de osso neoformado (mm^2) nos grupos coágulo, β-TCMP e β-TCP, aos 7, 21 e 42 dias.....47

Figura V.20. Área de biomaterial (mm^2) nos grupos β-TCMP e β-TCP, aos 7, 21 e 42 dias.....48

Figura V.21. Nível de RANK-L (A), osteoprotegerina (B), RANK-L/OPG (C), osteocalcina (D), osteopontina (E) e paratormônio (F) analisados aos 7, 21 e 42 dias nos grupos controle, β-TCP(TCP) e β-TCMP (MgTCP).....50

LISTA DE TABELAS

Tabela IV.1- Ciclo térmico para calcinação do pó e pastilhas de β-TCP e de β-TCMP.....26

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	fosfato de cálcio amorfo (*amorphous calcium phosphate)*
BMP	proteína morfogenética óssea (*bone morphogenetic protein*)
β-TCP	fosfato tricálcico do tipo beta
β-TCMP	fosfato tricálcico do tipo beta contendo magnésio
Ca	cálcio
CDHA	hidroxiapatita cálcio deficiente (*calcium-deficient hydroxyapatite*)
HA	hidroxiapatita
HE	hematoxilina-eosina
IGF-1	fator 1 de crescimento insulin-like (*insulin-like growth factor-1*)
Mg	magnésio
M-CSF	fator estimulador de colônia de macrófago (*macrophage colony-stimulating factor*)
OC	osteocalcina
OCP	fosfato octacálcico
ON	osteopontina
OPG	osteoprotegerina
PDGF	fator de crescimento plaquetário (*platelet-derived growth factor*)
PMN	leucócitos polimorfonucleados
PTH	paratormônio
RANK-L	NF-κB ligand
TCP	fosfato tricálcico (*tricalcium phosphate*)
TGF- β	fator beta transformador de crescimento (*transforming growth factor beta*)

I INTRODUÇÃO

A maioria das injúrias ósseas (fraturas), diferentemente dos demais tecidos, regeneram sem a formação de tecido cicatricial, possibilitando a restauração de todas as propriedades pré-existentes. Lesões ósseas extensas, entretanto, extrapolam a capacidade natural de regeneração e requerem a enxertia de tecido ósseo como forma de tratamento (DIMITRIOU *et al.*, 2011). Mais de 2,2 milhões de procedimentos anuais são realizados em todo o mundo com objetivo de reparar defeitos ósseos, seja na ortopedia, neurocirurgia ou odontologia (GIANNOUDIS *et al.*, 2005).

A enxertia é necessária para estimular a cicatrização óssea no tratamento de complicações esqueléticas, tais como falha no reparo de fraturas pós-traumáticas, no preenchimento de defeitos oriundos da remoção de tumores, ou quando o processo regenerativo está comprometido (necrose avascular, osteoporose), bem como no tratamento de diversos defeitos congênitos (GIANNOUDIS *et al.*, 2005, DIMITRIOU *et al.*, 2011).

O processo biológico envolvido na regeneração óssea na presença do enxerto requer 3 elementos críticos: potencial osteogênico para prover células formadoras de matriz óssea, fatores osteoindutivos capazes de promover diferenciação osteoblástica a partir das células osteoprogenitoras, e arcabouço osteocondutivo para facilitar a vascularização e servir de suporte para o crescimento do tecido ósseo (MIYAZAKI *et al.*, 2009).

O enxerto autógeno é considerado ideal por apresentar as 3 propriedades. As limitações, entretanto, existem em relação à morbidade do sítio doador (intervenção cirúrgica em local sadio) e à quantidade limitada de tecido disponível, além de aumento do tempo cirúrgico, maior tempo de internação, maior custo (GIANNOUDIS *et al.,* 2005, MIYAZAKI *et al.*, 2009, DIMITRIOU *et al.*, 2011).

O enxerto alógeno é obtido de cadáveres ou doadores vivos (DIMITRIOU *et al.*, 2011) e tem sido tradicionalmente empregado como substituto ao enxerto autógeno. Traz consigo, entretanto, a possibilidade de transmissão de doenças virais, tais como AIDS e hepatite. O processamento e esterilização do tecido alográfico

eliminam tal risco, mas trazem prejuízo à fase celular, comprometendo as propriedades osteogênicas, osteoindutoras e mecânicas do enxerto (GIANNOUDIS *et al.,* 2005, MIYAZAKI *et al.*, 2009). Além disso, os substratos alográficos apresentam custo elevado (requerem um banco de ossos) e difícil padronização devido à heterogeneidade da população doadora (CHAU, MOBBS, 2009).

Tais limitações tornam, portanto, os materiais sintéticos promissores como alternativa aos implantes autógenos e alógenos nas cirurgias de reparo ósseo. Dentre os materiais sintéticos, as cerâmicas compostas por ortofosfato de cálcio têm sido muito estudadas e produzidas com fins comerciais. Nos seres vivos, os ortofosfatos de cálcio ocorrem como os principais componentes inorgânicos dos ossos e dentes. Estruturalmente, apresentam-se geralmente sob a forma de hidroxiapatita não estequiométrica, contendo sódio, magnésio e carbonato. Os principais constituintes do osso humano são ortofosfato de cálcio (60% do peso total), colágeno (30%) e água (10%) (DOROZHKIN, 1997). A similaridade entre tecido ósseo e cerâmica propicia a interação química entre eles. Dentre as cerâmicas de ortofosfato de cálcio, o fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$, TCP), tem sido amplamente estudado (MARCHI *et al.*, 2007).

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 do IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*), conhecido como fator de crescimento do osteoblasto (SUCHANEK *et al.*, 2004).

Portanto, pode-se especular que os materiais à base de fosfato de cálcio com magnésio sejam biocompatíveis e apresentem propriedades biológicas adequadas quando utilizados como substitutos ósseos (SUCHANEK *et al.*, 2004).

II REVISÃO DA LITERATURA

II.1 Tecido ósseo

Os ossos servem como suporte estrutural (mecânico) para o corpo e como reserva de íons cálcio e fosfato, necessários para uma ampla variedade de funções metabólicas. Microscopicamente, o osso é composto por fibrilas de colágeno (80 a 100nm de espessura) mineralizadas (DOROZHKIN, EPPLE, 2002). Tais fibrilas consistem de uma fase inorgânica composta por fosfato de cálcio, uma fase colágena e água. Além disso, íons Na^{+}, Mg^{2+}, K^{+} e F^{-} também estão presentes em quantidades menores. Os ossos são classificados como "osso compacto" e "osso esponjoso" mais poroso (BANDYOPADHYAY *et al*., 2006). A combinação apatita/fibrilas de colágeno garante ao osso rigidez, resiliência e resistência à fratura (REN *et al*., 2010).

O processo de formação óssea começa pela ação dos osteoblastos, células que sintetizam e secretam a matriz colágena sob a forma de substância gelatinosa (osteóide), que é mineralizada em seguida pela deposição controlada de fosfato de cálcio. Os osteoblastos que permanecem aprisionados dentro da fase mineral transformam-se em osteócitos, que continuamente controlam a atividade de formação óssea. Do outro lado, outra classe de células, os osteoclastos, catabolisam o osso, destruindo-o. Este processo dinâmico de formação e destruição dos ossos possibilita seu crescimento durante o desenvolvimento do corpo, preservando sua forma e consistência e possibilitando a regeneração no caso de fratura (VALLET-REGI, GONZÁLEZ-CALBET, 2004). Portanto, ao contrário de outros tecidos mineralizados, os ossos são submetidos ao processo contínuo de remodelação: é reabsorvido pelos osteoclastos e sintetizado pelos osteoblastos (DOROZHKIN, EPPLE, 2002).

II.2 Remodelação e reparo ósseo

No osso cortical adulto, a deposicão óssea ocorre somente nos sítios de remodelação ou de reparo ósseo. Durante a remodelação, osso antigo é substituído por novo (JILKA, 2007). As células específicas responsáveis pela manutenção da massa óssea são os osteoblastos e osteoclastos (células que reabsorvem osso).

Além da função de formar osso, os osteoblastos controlam a diferenciação dos osteoclastos (LIU *et al*., 2008).

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 (ASAGIRI, TAKAYANAGI, 2007).

Reparo ósseo é um processo complexo resultante da interação de elementos celulares que são ativados e controlados por diversas citocinas pró-inflamatórias e proteínas sinalizadoras. O coágulo sanguíneo formado imediatamente após a injúria aos tecidos é fonte importante de moléculas sinalizadoras que acionam os macrófagos e outras células inflamatórias para o sítio a ser reparado. Os mediadores inflamatórios regulam a proliferação celular, diferenciação das células-tronco mesenquimais, quimiotaxia e angiogênese. As *bone lining cells* que recobrem o osso cortical são ativadas, assim como os pré-osteoblastos do periósteo, para diferenciarem-se em osteoblastos (DOROZHKIN, 2010).

II.2.1 Osteoblastos

Os osteoblastos derivam de células progenitoras mesenquimais da medula óssea ou dos pericitos. O processo de maturação passa pela diferenciação em pré-osteoblastos e osteoblastos produtores de matriz (HOEPPNER *et al.*, 2009, ERIKSEN, 2010).

A reprodução, diferenciação e sobrevivência dos progenitores osteoblásticos são controlados por fatores autócrinos/parácrinos locais, que incluem membros das famílias Wnt, Hedgehog e BMPs (*Bone Morphogenetic Protein*), assim como citocinas β -TGF (*Transforming Growth Factor*-β), IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*), FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*) e IL-6 (interleucina-6), além de fatores angiogênicos tais como endotelina, hormônios como o paratormônio (PTH) e agonistas da prostaglandinas (JILKA, 2007, HOEPPNER *et al.*, 2009, ERIKSEN, 2010). Muitos desses fatores de crescimento são depositados na matriz óssea pelos osteoblastos e são liberados sob sua forma ativa durante a reabsorção óssea osteoclástica (JILKA, 2007).

O osteoblasto completamente diferenciado é caracterizado pela co-expressão de fosfatase alcalina e colágeno tipo I, ambos importantes para a síntese da matriz óssea. Osteoblastos maduros também produzem reguladores da mineralização da matriz: osteocalcina, osteopontina, osteonectina, RANK-L (NF- κ B *ligand*), que é necessário para a diferenciação osteoclástica, assim como o receptor do PTH (PTHR1). Ao final do processo, os osteoblastos se transformam em osteócitos, células mecanosensíveis embebidas pela matriz mineralizada, ou em *lining cells*, que protegem a superfície óssea e são responsáveis pela iniciação da remodelação óssea (HOEPPNER *et al.*, 2009, ERIKSEN, 2010).

II.2.2 Osteoclastos

Osteoclastos são células multinucleadas originárias de monócitos/ macrófagos, sendo primariamente responsáveis pela degradação de osso mineralizado durante o desenvolvimento, remodelação e reparo ósseos (BLAIR, ZAIDI, 2006, BRUZZANITI, BARON, 2006, ASAGIRI, TAKAYANAGI, 2007).

Duas citocinas são essenciais e suficientes para induzir a diferenciação osteoclástica, regular função a função e sobrevivência dos osteoclastos: M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) e RANK-L. Ambas são secretadas pelas células mesenquimais da medula óssea e pelos osteoblastos (BRUZZANITI, BARON, 2006). Enquanto o M-CSF é a citocina essencial para a proliferação e sobrevivência das células precursoras dos osteoclastos, RANK-L é o fator que regula a diferenciação dos osteoclastos (figura II.1) (ASAGIRI, TAKAYANAGI, 2007). Os osteoblastos também secretam osteoprotegerina (OPG), que codifica um receptor solúvel para o RANK-L, prevenindo, portanto a diferenciação osteoclástica (LIU *et al.*, 2008).

A superfície óssea é recoberta pelas *bone lining cells*, que impedem o contato direto entre as células ósseas e integrinas ou outras moléculas de adesão moduladoras da atividade celular (ERIKSEN, 2010). A adesão dos osteoclastos à superfície óssea é sempre precedida, portanto, da saída das *lining cells*, seja no processo de remodelação ou de reparo.

Durante a reabsorção, os osteoclastos sofrem reorganização do citoesqueleto, resultando no estabelecimento de uma membrana apical distinta (na direção da superfície óssea) e um domínio membranoso basolateral (afastada da superfície

óssea). O domínio em contato com a superfície óssea, denominado borda pregueada, é a organela principal do osteoclasto, que contacta a matriz óssea (BRUZZANITI, BARON, 2006). A membrana plasmática basolateral do osteoclasto é rica em NaK+-ATPase (bomba sódio-potássio), que transporta protons providos pela enzima anidrase carbônica e acidifica o compartimento extracelular, dissolvendo o mineral (figura II.1). A cathepsina K é a proteinase ácida que dissolve o colágeno (BLAIR, ZAIDI, 2006).

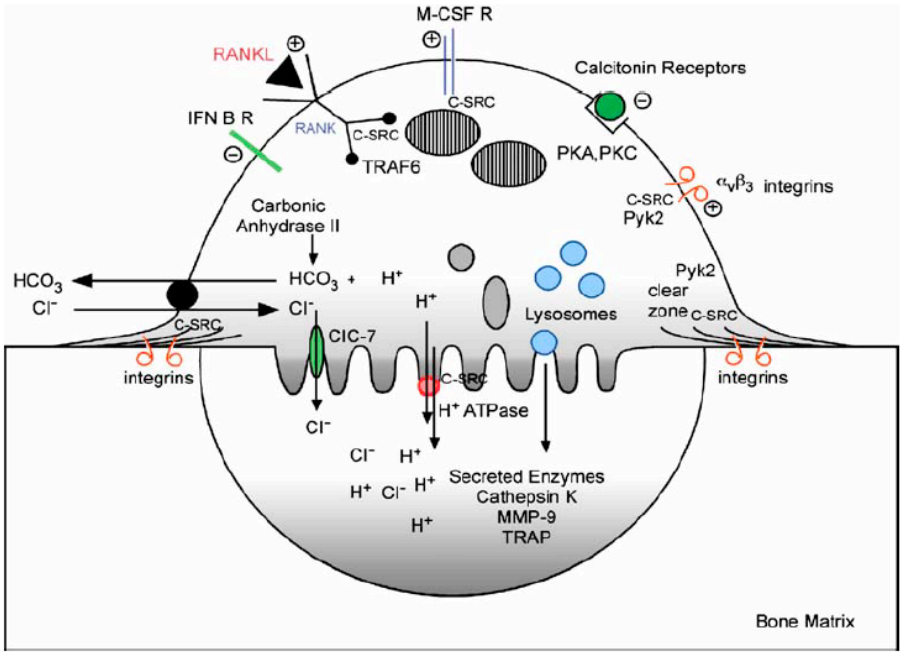


Figura II.1. O sistema de transporte iônico na borda pregueada apical e nas membranas basais laterais permite extrusão dos prótons via ATPase vacuolar da borda pregueada apical paralelamente à condutância do cloreto. A anidrase carbônica gera os prótons e as mitocôndrias geram ATP (BRUZZANITI, BARON, 2006).

O compartimento extracelular de reabsorção óssea equivale funcionalmente ao lisossoma, uma vez que é caracterizado pelo baixo pH e pela grande quantidade de enzimas lisossomiais que digerem a matriz óssea. Durante a reabsorção, os componentes orgânicos e inorgânicos são processados extracelularmente, após o que alguns produtos sofrem exocitose para dentro do osteoclasto e degradados por lisossomas secundários, enquanto parte dos produtos de degradação são transportados através da célula por transcitose e secretadas pela membrana basal (BRUZZANITI, BARON, 2006).

II.2.3 Osteócitos

Cerca de 90% de todas as células ósseas do esqueleto humano adulto são osteócitos, diferenciados das células da linhagem mesenquimal osteoblástica, residentes nas 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 e *bone lining cells* e, possivelmente, osteoclastos. 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, JOHNSON, 2008, KRAMER *et al.*, 2010).

Os osteócitos são células que respondem à tensão mecânica enviando sinais de reabsorção ou formação. Na ausência de estímulo mecânico, o osso é reabsorvido e na presença de estímulo mecânico, a massa óssea é mantida ou aumentada. Devido à 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 (BONEWALD, JOHNSON, 2008). O osteócito parece ser capaz de perceber e traduzir microdanos em remodelação, onde os sinais mecanossensitivos captados disparam a atividade dos osteoclastos e osteoblastos na superfície trabecular. Sinais a partir das *lining cells* indicando dano ou tensão mecânica podem ser transmitidos aos osteócitos e disparar o recrutamento de osteoclastos (ERIKSEN, 2010).

II.3 Reguladores da remodelação óssea

Os processos de remodelação e reparo ósseos envolvem coordenação na regulação dos osteoclastos e osteoblastos e são modulados por ampla variedade de hormônios e produtos secretados pelos osteoblastos, osteoclastos e osteócitos em resposta a microtraumas, estímulos mecânicos e biológicos (ERIKSEN, 2010). RANK-L, osteoprotegerina (OPG), osteocalcina (OC), osteopontina (ON),

paratormônio (PTH) e vitamina D são alguns desses produtos que modulam a atividade dos osteoblastos e osteoclastos.

II.3.1 RANK / RANK-L / Osteoprotegerina

OPG e seu ligante RANK-L são importantes reguladores do metabolismo ósseo. O receptor RANK é encontrado somente na linhagem de células osteoclásticas, isto é, nos precursores osteoclásticos e osteoclastos maduros. RANK-L, ligante natural do RANK, é expresso nos osteoblastos; ativa a diferenciação osteoclástica, eleva a atividade dos osteoclastos maduros e impede a apoptose dos osteoclastos, ligando-se ao receptor RANK. A OPG, igualmente expressa pelos osteoblastos, impede a ligação do RANK-L ao seu receptor RANK na superfície do osteoclasto (figura II.2). Por outro lado, sabe-se que a atividade da tríade OPG/RANK/RANKL é regulada por uma série de fatores osteotrópicos, incluindo estrogênio e paratormônio. A falta de estrogênio, como observada na menopausa, está associada a grande perda de massa de tecido ósseo. Foi demonstrado que estrogênio eleva a produção de OPG pelos osteoblastos (KHOSLA, 2001, SECK *et al.*, 2001, WALKER *et al.*, 2010).

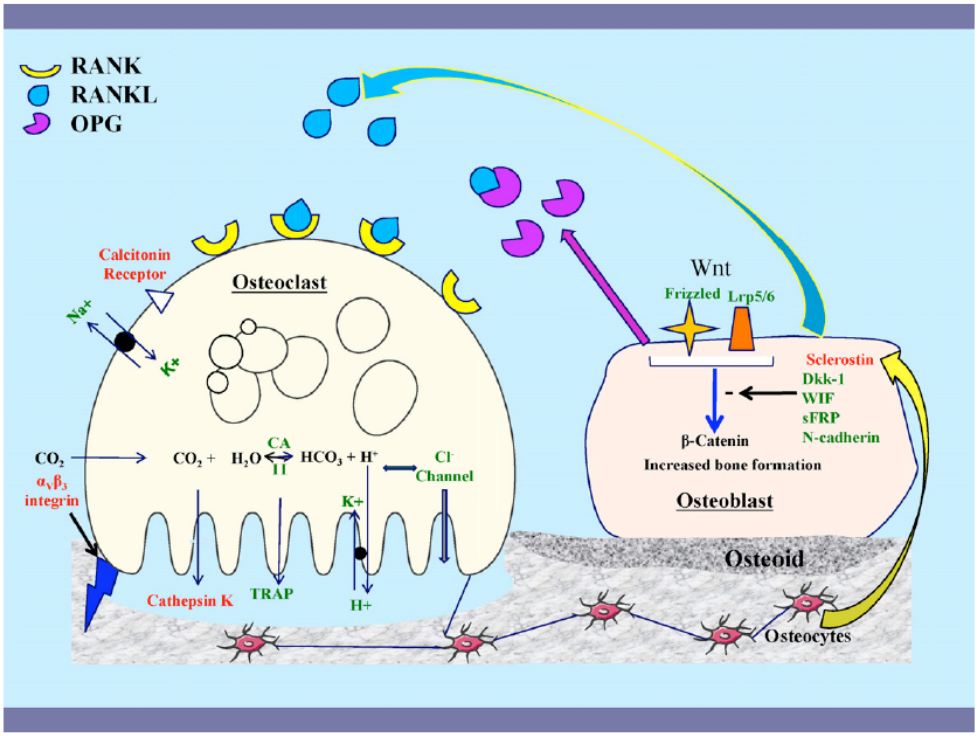


Figura II.2. Osteoclasto, osteoblasto, osteócito e várias moléculas estão envolvidos na remodelação óssea. RANK-L, expresso na superfície das células pré-osteoblásticas, liga-se ao RANK das células precursoras dos osteoclastos. OPG inviabiliza todo o sistema ao bloquear os efeitos do RANK-L (GALLAGHER, SAI, 2011).

II.3.2 Paratormônio e Vitamina D

O cálcio (Ca) desempenha papel-chave em muitos processos fisiológicos, incluindo a contração dos músculos esquelético, cardíaco e liso, coagulação sanguínea e transmissão dos impulsos nervosos, para citar apenas alguns. Somente 0,1% do cálcio corporal total está no líquido extracelular, e cerca de 1% está nas células, estando o restante armazenado nos ossos. Por conseguinte, os ossos atuam como grandes reservatórios, liberando cálcio quando sua concentração no líquido extracelular diminui e armazenando o excesso de cálcio (GUYTON, HALL, 2002).

A concentração extracelular dos íons cálcio é determinada pela interação da absorção de cálcio pelo intestino, excreção renal de cálcio e e captação e liberação de cálcio pelo osso, estando cada uma delas regulada pelo hormônio paratireóideo, vitamina D e calcitonina (GUYTON, HALL, 2002).

O paratormônio é uma proteína secretada pelas glândulas paratireóides em resposta a baixo nível sérico de cálcio. Nos rins, o PTH se liga ao receptor PTH1R, que por sua vez sinaliza aos rins para elevar a aumentar a absorção de cálcio e reduzir a rebsorção de fosfato. De maneira similar à vitamina D, o PTH se liga aos receptores PTH1R no osso para estimular a liberação de fatores osteoclastogênicos pelos osteoblastos (LANDRY *et al.*, 2011).

A vitamina D (também denominada colecalciferol) é formada na pele, como consequência da irradiação do 7-desidrocolesterol, substância normalmente encontrada na pele, pelos raios ultravioleta do sol. Os outros compostos de vitamina D que ingerimos nos alimentos são idênticos ao colecalciferol formado na pele, exceto pela substituição de um ou mais átomos que não afetam sua função (GUYTON, HALL, 2002).

Em condições fisiológicas, a concentração de cálcio no líquido extracelular é regulada com extrema precisão. Quando a concentração plasmática de cálcio está elevada, ocorre depressão do PTH e da formação de vitamina D. Por sua vez, a ausência da vitamina D diminui a absorção de cálcio pelo intestino, dos ossos e túbulos renais, com a consequente queda da concentração dos ions cálcio para o seu nível normal (GUYTON, HALL, 2002).

A relação entre a vitamina D e PTH é complexa. Níveis elevados de cálcio e

vitamina D inbem o PTH. Em resposta aos níveis de vitamina D e PTH, os osteoblastos depositam cálcio e fosfato nos ossos. Os osteoclastos, que não possuem receptores para PTH, reabsorvem osso em resposta a fatores liberados pelos osteoblastos. (LANDRY *et al.*, 2011).

O PTH exerce dois efeitos sobre o osso, determinando a absorção de cálcio e de fosfato. Um deles consiste em rápida fase que começa dentro de poucos minutos. Essa fase resulta da ativação das células ósseas já existentes (principalmente os osteócitos), que bombeiam o cálcio e fosfato do líquido ósseo canalicular para fora (GUYTON, HALL, 2002). Na segunda fase, mais lenta, o PTH estimula a proliferação e diferenciação de osteoclastos a partir dos progentitores hematopoiéticos circulantes, ao se ligar às proteínas receptoras de membrana dos osteoblastos para estimular a síntese de RANK-L e suprimir a produção da OPG (JILKA *et al.*, 2010).

II.3.3 Osteocalcina

Na última década, observações clínicas e estudos controlados demonstraram que a leptina, hormônio produzido pelo tecido adiposo regula o metabolismo ósseo. Esta relação entre gordura e osso, incialmente pensada ser unilateral, é considerada hoje bilateral ou recíproca após a descoberta do papel do osso no metabolismo da glicose no metabolismo da gordura. Esta relação entre os metabolismos do osso e da energia é mediada pela osteocalcina (KIM *et al.*, 2010).

A osteocalcina é a proteína não colagenosa mais abundante no osso. É sintetizada exclusivamente pelas células da linhagem osteoblástica: osteoblastos maduros e osteócitos (FERRON *et al.*, 2010, KIM *et al.*, 2010, WEI, DUCY, 2010). A maior parte da osteocalcina é encontrada na matriz mineralizada dos ossos associada aos cristais de hidroxiapatita (MOTYLA *et al.*, 2010, WEI, DUCY, 2010), mas pequenas quantidades circulam no sangue e os níveis séricos são considerados marcadores ósseos (MOTYLA *et al.*, 2010).

A osteocalcina presente no tecido ósseo é liberada para o meio circulante sob a forma não carboxilada e regula positivamente o metabolismo da glicose por meio do aumento da sensibilidade e produção de insulina pelo pâncreas, além da proliferação e função mitocondrial (elevação do gasto de energia), resultando em

redução da massa gorda (KIM *et al.*, 2010, MOTYLA *et al.*, 2010, WEI, DUCY, 2010).

II.3.4 Osteopontina

A osteopontina é uma proteína multifuncional, e embora altamente expressa no osso pelos osteoblastos e osteoclastos (DERNHARDT, GUO, 1993, MAZALI *et al.*, 2002, ALFORD, HANKENSON, 2006), é também expressa por vários outros tipos de células, incluindo condrócitos (MALAVAL *et al.*, 2008), macrófagos, células endoteliais e do músculo liso (MAZALI *et al.*, 2002). A osteopontina está envolvida, portanto, em diversos processos biológicos em órgãos e tecidos múltiplos, incluindo biomineralização, inflamação, recrutamento de leucócitos e sobrevivência celular (MAZALI *et al.*, 2002).

Acredita-se que a osteopontina possa inibir a mineralização do tecido osteóide bloqueando fisicamente o crescimento do cristal de hidroxiapatita (DERNHARDT, GUO, 1993, ALFORD, HANKENSON, 2006, MALAVAL *et al.*, 2008). De acordo com MAZALI *et al.* (2002), somente a osteopontina produzida pelos osteoclastos teria esta capacidade.

Os efeitos mais conhecidos da osteopontina são sobre os osteoclastos e *turnover* ósseo. A osteopontina viabiliza a reabsorção óssea pelos osteoclastos na medida em que a ligação ON-integrina αvβ3 é necessária para a aderência do osteoclasto à superfície óssea (DERNHARDT, GUO, 1993, ALFORD, HANKENSON, 2006). WALKER *et al.* (2010) sugere que a osteopontina regula a atividade osteoclástica, expressão de RANK-L e reabsorção óssea em osso livre de *stress* mecânico. Algumas evidências sugerem, no entanto, que a osteopontina também modula o fenótipo dos osteoblastos. *In vitro*, a osteopontina estimula a migração das células tronco mesenquimais, induz a expressão da osteocalcina, atividade da fosfatase alcalina e deposição mineral (ALFORD, HANKENSON, 2006).

A osteopontina tem também papel importante durante inflamação aguda e crônica, onde pode ser expressa pela células epiteliais, endoteliais ou do músculo liso, bem como pelos macrófagos e células-T, participando do recrutamento e na retenção dos macrófagos e células-T para os sítios de inflamação (MAZALI *et al.*, 2002).

II.4 Enxertos ósseos

Os ossos compõem um importante órgão que suporta o corpo, protege os órgãos internos, além de ser reserva de íons, principalmente cálcio e fósforo. Injúrias ao tecido ósseo, seja por doença ou acidentes, resultam em diminuição da qualidade de vida do indivíduo afetado. Os ossos possuem grande capacidade de regeneração, quando tais injúrias são pequenas. Entretanto quando a injúria é mais extensa, o defeito ósseo deve ser preenchido por material (enxerto) que permita o crescimento de novo osso (e não de tecido fibroso) (DOROZHKIN e EPPLE, 2002, BANDYOPADHYAY *et al.*, 2006, KAMITAKAHARA *et al*., 2008).

II.4.1 Autógeno

O enxerto autógeno é definido como substituto ósseo obtido de outros sítios anatômicos no mesmo indivíduo. É o tipo de enxerto mais utilizado na reconstrução óssea, considerado o substituto ideal (o "padrão ouro") (KAMITAKAHARA *et al*., 2008).

As células osteoprogenitoras presentes no enxerto autógeno possuem potencial para proliferar e diferenciar em osteoblastos. Tais células, portanto, representam o perfil osteogênico do enxerto. A osteogênese é, por conseguinte, a formação direta de tecido ósseo pelos osteoblastos e seus precursores. O único material que apresenta verdadeira capacidade osteogênica é o enxerto autógeno (GIANNOUDIS *et al*., 2005).

A crista ilíaca é o sítio doador mais frequentemente escolhido pela facilidade de acesso e por fornecer tecido de qualidade em boa quantidade. A obtenção de osso autólogo a partir da crista ilíaca, pode, no entanto, trazer algumas complicações: aumento do tempo cirúrgico e consequentemente dos custos, dor pós-operatória, formação de hematomas, perda de sangue, injúria de tecido nervoso, formação de hérnia, infecção, injúria arterial, fratura, instabilidade pélvica, defeitos cosméticos, dor crônica no sítio doador (ILAN , LADD, 2003, GIANNOUDIS *et al*., 2005). Tais complicações evidenciam, portanto, a necessidade de desenvolvimento de material sintético que substitua adequadamente o enxerto autógeno (DOROZHKIN e EPPLE, 2002).

II.4.2 Alógeno

É definido como substituto ósseo obtido de outro indivíduo da mesma espécie. Há também alguns problemas relacionados à utilização dos enxertos alógenos, tais como obtenção do material em quantidade limitada, transmissão de doenças, infecção (KAMITAKAHARA *et al.*, 2008). Ainda assim, é a segunda opção do cirurgião. O processamento do tecido alógeno diminui tal risco, mas pode comprometer significativamente as propriedades biológicas e mecânicas presentes no tecido ósseo original. O processamento e esterilização (congelamento, liofilização, radiação) praticamente eliminam a possibilidade de transmissão de doenças virais ou bacterianas. Porém eliminam a fase celular, comprometendo o processo de incorporação do enxerto, bem como a resistência mecânica. Os enxertos liofilizados são mais seguros no que diz respeito à transmissão de doenças, apresentam porém menor capacidade osteoindutiva (estímulo para formação óssea dado por citocinas e fatores de crescimento, presentes no enxerto) e menor resistência mecânica quando comparados aos enxertos congelados (GIANNOUDIS *et al.*, 2005).

II.4.3 Sintético

Muita atenção tem sido dada à síntese de diversos substratos que possam substituir os enxertos autógenos e alógenos (VALLET-REGI e GONZÁLLES-CALBET, 2004). O enxerto sintético deve ter as seguintes características: osteocondução (capacidade de prover um arcabouço para a neoformação óssea), osteoindução (capacidade de estimular a conversão fenotípica das células tronco mesenquimais indiferenciadas em células osteoprogenitoras), biocompatibilidade, fácil utilização, baixo custo, além de ser biorreabsorvível e estruturalmente similar ao osso (GIANNOUDIS *et al*., 2005). As principais vantagens dos materiais sintéticos são, de acordo com KAMITAKAHARA *et al*. (2008): obtenção em quantidade ilimitada e ausência de vírus ou bactérias transmissoras de doenças ou infecções.

II.5 Ortofosfato de cálcio

Os fosfatos de cálcio são os constituintes inorgânicos mais importantes do tecidos duros. Sob a forma de hidroxiapatita carbonatada, estão presentes nos ossos,

dentes e tendões. Conferem estabilidade e rigidez a tais órgãos. Estruturalmente apresentam-se sob a forma de nanocristais de hidroxiapatita não estequiométrica, contendo sódio, magnésio e carbonato (DOROZHKIN, 2010), além de outros íons em baixos teores. É fácil, portanto, compreender porque as cerâmicas à base de fosfato de cálcio são amplamente utilizadas como substitutos ósseos (DOROZHKIN, 2001, KAMITAKAHARA *et al*., 2008). As cerâmicas são materiais sintéticos promissores como alternativa aos implantes autógenos e alógenos nas cirurgias de substituição óssea. Tais materiais possuem elevada capacidade de integração com o tecido ósseo devido à similaridade com composição química do osso (MARCHI *et al*., 2007).

Assim sendo, podem ser biorreabsorvíveis, atóxicos, biocompatíveis, não são considerados material estranho pelo organismo e, mais importante, exibem comportamento bioativo e se integram aos tecidos durante a remodelação do osso sadio. Este processo leva a uma íntima união fisicoquímica entre os implantes e o osso, denominada osteointegração. Além disso, sabe-se que os ortofosfatos de cálcio são osteocondutivos (servem de arcabouço para a neoformação óssea) e suportam a adesão e proliferação de osteoblastos (DOROZHKIN, 2010).

Sob a forma de pó, grânulos, densos ou porosos, ou como recobrimento de implantes metálicos, o fosfato de cálcio possui diversas aplicações médicas tais como reposição artificial dos ossos dos quadris, joelho, dentes, tendões e ligamentos, assim como atuar na reparação da doença periodontal, reconstrução maxilofacial e preenchimento de defeitos ósseos decorrentes da remoção de tumores (ENDERLE *et al*., 2005, DOROZHKIN, 2010).

A maior limitação no uso dos ortofosfatos de cálcio são suas propriedades mecânicas: são frágeis e com baixa resistência à fadiga. A baixa resistência mecânica é mais evidente nas biocerâmicas altamente porosas (poros maiores que 100μm são necessários para vascularização e colonização celular). Portanto, para aplicação médica, os ortofosfatos de cálcio são utilizados primariamente como preenchimento ou revestimento, não podendo ser utilizados para reparo de defeitos ósseos de grandes dimensões (DOROZHKIN, 2010).

II.5.1 Propriedades físico-químicas

II.5.1.1 Osteocondução e osteoindução

Osteocondução diz respeito à facilitação e orientação de vasos sanguíneos e fornecimento de suporte apropriado para a proliferação e adesão celular e deposição de tecido ósseo. Portanto, no processo de osteocondução, a matriz proteica e a fase mineral do enxerto ósseo provêm um arcabouço para a neoformação óssea (ILAN , LADD, 2003, GIANNOUDIS *et al*., 2005).

Os materiais com capacidade de osteoindução, por outro lado, estimulam células tronco mesenquimais indiferenciadas para conversão fenotípica em células osteoprogenitoras. As proteínas morfogenéticas, fatores de crescimento e citocinas possuem tal capacidade (LEGEROS *et al*., 2003). Entretanto, diversos estudos tem demonstrado a propriedade osteoindutiva de determinados tipos de biocerâmica de ortofosfato de cálcio. Foi observado neoformação óssea em arcabouço poroso de fosfato tricálcico do tipo beta (β-TCP) implantado em músculo de cão (DOROZHKIN, 2010). A indução óssea pelos ortofosfatos de cálcio foi observada no interior dos poros ou das concavidades dos implantes, nivelando a superfície. LEGEROS *et al*. (2003), no entanto, não acreditam que esta observação possa ser consequência de propriedade osteoindutiva inerente ao β-TCP, mas sim consequência de geometria crítica que permite a concentração de BMPs endógenas em quantidade suficiente para induzir osteoindutividade (DOROZHKIN, 2010).

II.5.1.2 Dissolução e biorreabsorção

Logo após a implantação, o processo de cicatrização é iniciada por alteração dos biofluidos circundantes e adsorção de biomoléculas. Em seguida, diversos tipos de células alcançam a superfície da biocerâmica e a camada adsorvida dita como será a resposta celular. Tem início a degradação da cerâmica. Este processo pode acontecer tanto por dissolução fisicoquímica com a possibilidade de mudança de fase ou por atividade celular (denominada biorreabsorção), bem como por combinação dos dois processos (DOROZHKIN, 2010).

Dissolução é um processo fisicoquímico que é controlado por alguns fatores, tais como solubilidade da matriz do implante, razão área superficial/volume, acidez local,

temperatura. A taxa de dissolução é inversamente proporcional à razão cálcio/fósforo, pureza de fase, tamanho dos cristais, porosidade e área superficial. Transformação de fase pode acontecer com β-TCP devido à instabilidade em ambientes aquosos sob condições fisiológicas (DOROZHKIN, 2010).

Biorreabsorção é um processo biológico mediado por células (osteoclastos e macrófagos). Os osteoclastos aderem firmemente ao implante e dissolvem os ortofosfatos de cálcio secretando a enzima anidrase carbônica ou outro ácido baixando o pH para 4 ou 5. As partículas de ortofosfato de cálcio podem ser fagocitadas pelos osteoclastos, isto é, são incorporadas pelo citoplasma e então dissolvidas por ácido e/ou processo enzimático (DOROZHKIN, 2010).

O processo de reabsorção do fosfato de cálcio sintético é bem diferente do osso natural, principalmente devido à diferença de textura. Os cristais do osso mineral são nanométricos e possuem área superficial elevada. Eles cresceram numa matriz orgânica e a ligação entre eles é fraca. Como resultado, a reabsorção do osso mineral pelos osteoclastos é bem homogênea. O fosfato de cálcio sintético, pelo contrário, apresenta área superficial baixa e ligação forte entre os cristais (BANDHYOPADHYAY *et al*., 2006).

II.5.1.3 Bioatividade

Os materiais bioativos interagem quimicamente com os tecidos circundantes. O fenômeno da bioatividade é determinada por fatores químicos (fases cristalinas e estrutura atômica do biomaterial) e físicos (rugosidade superficial e porosidade). Um material bioativo sofrerá ligeira dissolução mas promoverá a deposição de uma camada de apatita biológica antes de contactar diretamente com os tecidos a nível atômico, o que resulta numa ligação química direta com o osso. Tal implante provê boa estabilização para os materiais sujeitos à carga mecânica. A figura II.3 representa o fenômeno que ocorre na superfície da hidroxiapatita (HA) e do TCP após implantação: (1) início da solubilização da superfície do biomaterial; (2) prosseguimento do processo de solubilização; (3) equilíbrio entre o meio circundante fisiológico e a superfície do biomaterial; (4) adsorção de proteínas e outros compostos orgânicos; (5) adesão celular; (6) proliferação celular; (7) início da formação óssea; (8) osso neoformado (DOROZHKIN, 2010).

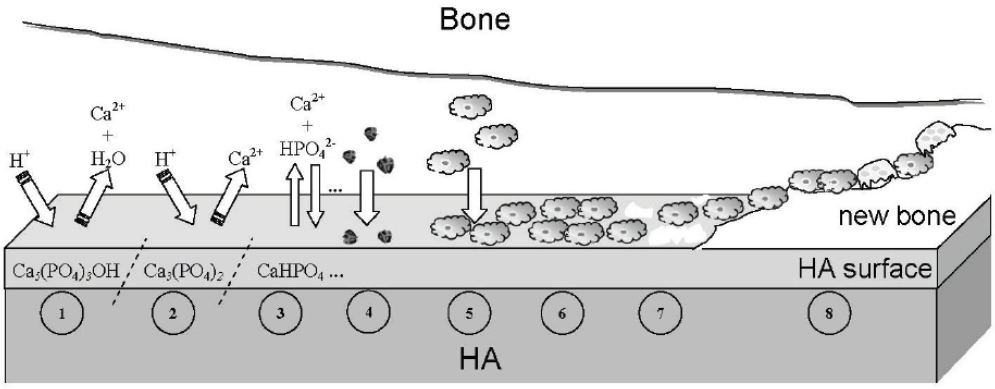


Figura II.3. Diagrama esquemático dos eventos que ocorrem na interface entre a biocerâmica e o ambiente biológico circundante. Mais detalhes no texto (DOROZHKIN, 2010).

II.5.2 Resposta do hospedeiro ao enxerto de ortofosfato de cálcio

Embora sejam considerados atóxicos, os enxertos sintéticos biocerâmicos provocam, no organismo onde são implantados, reação inflamatória do tipo corpo estranho (DOROZHKIN, 2010). A imunidade inata, um dos componentes do sistema de defesa imunológico, é a responsável por tal resposta, caracterizada pelo englobamento e digestão do biomaterial por células inflamatórias especializadas. Estas células estão disponíveis para ação imediata sobre o material sem requerer exposição prévia (JANEWAY *et al*., 2007).

II.5.2.1 Células inflamatórias

Os granulócitos são um grupo especial de células brancas do sangue. Recebem essa denominação por possuírem grânulos densamente coráveis em seu citoplasma, sendo muitas vezes referidos como leucócitos polimorfonucleados (PMN), devido à forma de seus núcleos, cujos grânulos proeminentes lhes conferem um padrão de coloração característico. Há 3 tipos de granulócitos: eosinófilos, basófilos e neutrófilos. Os neutrófilos, que apresentam a capacidade da fagocitose, são os elementos celulares mais numerosos e importantes da resposta imune inata (JANEWAY *et al*., 2007).

Os macrófagos estão amplamente distribuídos nos tecidos, onde desempenham papel crucial na imunidade inata. Tais células são a forma madura dos monócitos,

que circulam no sangue e se diferenciam continuamente em macrófagos, após migrarem para os tecidos. Assim como os neutrófilos, são fagocíticos (JANEWAY *et al*., 2007). Os macrófagos aderidos à superfície do biomaterial se fundem, originando as células gigantes do tipo corpo estranho (ANDERSON *et al*., 2007).

Os mastócitos, cujo precursor circulante não está ainda bem definido, também se diferenciam ao chegar aos tecidos. Eles se localizam principalmente junto aos pequenos vasos sanguíneos e liberam substâncias que afetam a permeabilidade vascular (JANEWAY *et al*., 2007).

As células dendríticas são especializadas na captura do antígeno e na sua exposição para o reconhecimento pelos linfócitos. Quando maduras, migram do sangue para residir nos tecidos. As respostas adaptativas dependem dos linfócitos, células que produzem os anticorpos, proporcionando imunidade duradoura após exposição ao agente externo (JANEWAY *et al*., 2007).

Todos os elementos celulares do sangue, incluindo as células vermelhas que transportam oxigênio, as plaquetas que deflagram a coagulação sanguínea nos tecidos lesados e as células brancas do sistema imune, derivam das mesmas células – as células-tronco hematopoiéticas da medula óssea (JANEWAY *et al*., 2007).

II.5.2.2 Resposta inflamatória

A reação do hospedeiro à implantação do biomaterial inclui injúria, interação sangue-material, formação da matriz provisória, inflamação aguda, inflamação crônica, formação de tecido de granulação, reação de corpo estranho e fibrose / desenvolvimento de cápsula fibrosa (ANDERSON *et al*., 2007).

Imediatamente após a implantação, o biomaterial adquire uma camada de proteínas (albumina, fibrinogênio, gama globulina, entre outras), antes mesmo de interagir com células do hospedeiro. A seguir, o material implantado é envolvido por uma matriz provisória, resultante das interações entre o sangue, biomaterial e proteínas adsorvidas à superfície do biomaterial. As plaquetas sanguíneas, que formam o trombo, ativando o sistema de coagulação, liberam citocinas (TGFβ, PDGF, fator plaquetário, leucotriene) que atraem os macrófagos para o local do implante. Além disso, a degranulação dos mastócitos e liberação da histamina também recrutam os

neutrófilos e macrófagos para o local (ANDERSON *et al*., 2007). Os neutrófilos e macrófagos caracterizam a resposta inflamatória aguda, que tem duração aproximada de uma semana. O processo evolui para a inflamação crônica, de curta duração, restrito ao local do implante, identificado pela presença de células mononucleadas - monócitos e linfócitos, além das células gigantes do tipo corpo estranho sobre a superfície do biomaterial Nesta fase tem início a fibrogênese (efetuada pelos fibroblastos) e angiogênese, com formação de tecido fibroso ao redor do biomaterial (ANDERSON *et al*., 2007). A migração dos fibroblastos é reconhecida como responsável pela contração do tecido de cicatrização, ao redor do quinto dia de reparo. A fibrina, produto da reação entre trombina e fibrinogênio, presentes no coágulo, é liberada no local e tem a capacidade de aderir à superfície do biomaterial. A migração das células osteogênicas ao local do implante se dá ao longo da rede de fibrina. Portanto, a habilidade do material em reter a fibrina durante a contração do tecido cictricial é crítica em determinar se as células migrantes atingirão seu destino. As características da superfície do material implantado têm papel importantíssimo na retenção da fibrina (DAVIES, 2003).

II.5.2.3 Formação de tecido ósseo

Quando as células osteogênicas alcançam a superfície do biomaterial, tem início a formação da matriz óssea. Os osteoblastos secretam matriz orgânica não-colagênica que provê núcleos de mineralização pelo fosfato de cálcio. DAVIES (2003) identificou a presença de 2 proteínas não colagenosas, osteopontina e sialoproteína óssea nesta fase orgânica. A nucleação do fosfato de cálcio é seguida pelo crescimento do cristal e formação das fibras de colágeno. Finalmente ocorre a mineralização do compartimento colágeno (DAVIES, 2003).

II.5.3 Fosfato tricálcico do tipo beta

A hidroxiapatita de cálcio pura ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) (HA) apresenta razão Ca/P estequiométrica de 1,67. O fosfato tricálcico (TCP) ou whitlockita, $Ca_3(PO_4)_2$, é caracterizado por razão Ca/P de 1,5 (LEGEROS *et al.*, 2003).

Embora as cerâmicas de hidroxiapatita sinterizada sejam amplamente utilizadas pela sua osteocondutividade, sua bioreabsorbilidade é tão baixa que a HA permanece no organismo por um longo período após a implantação. Em contraste,

as cerâmicas de fosfato tricálcico (*tricalcium phosphate,* TCP) são reabsorvíveis e, durante a regeneração óssea, são completamente substituídas pelo tecido ósseo. Portanto, muita atenção tem sido dada às cerâmicas de TCP ou a misturas HA-TCP em diversas razões, como material de arcabouço para suporte da regeneração óssea (GIANNOUDIS *et al*., 2005, KAMITAKAHARA *et al.*, 2008).

II.5.3.1 Síntese do β-TCP

A hidroxiapatita cálcio-deficiente (CDHA – *calcium-deficient hydroxyapatite*) pode ser facilmente preparada pela adição simultânea de soluções contendo íons cálcio a temperaturas e pH adequados. Durante este período, OCP (fosfato octacálcico) ou ACP (fosfato de cálcio amorfo) inicialmente precipitados (dependendo do pH) se transformam em CDHA. Com aquecimento acima de 700^{o}C, CDHA seco com razão Ca/P = 1,5 converterá em β-TCP e e aquele com 1,5 < Ca/P < 1,67 converterá em mistura de HA e β-TCP (DOROZHKIN e EPPLE, 2002).

TCP existe em 4 estruturas cristalinas. A fase β-TCP, com densidade de 3,07g/cm^3, é estável até 1125^{o}C. Aquecendo a temperaturas mais elevadas, passa para a fase alfa, cuja densidade é de 2,86g/cm^3 e estável até 1430^{o}C. Ocorre uma expansão volumétrica de 7,24%. As outras formas cristalinas, α' (super alfa), é estável acima de 1430^{o}C e a forma γ, de alta pressão, são difíceis de serem obtidas devido à meta-estabilidade. A alta reatividade e, consequentemente a alta taxa de dissolução do α-TCP *in vitro* e *in vivo*, limita sua aplicação biomédica. Por outro lado, a baixa taxa de dissolução do β-TCP – ainda assim superior a da HA, associada às características de estabilidade química e resistência mecânica, preenchem os requisitos como material substitutivo ósseo reabsorvível (MARCHI *et al*., 2007, ZHANG *et al*., 2008).

Cerâmicas densas de β-TCP são de difícil preparo. TCP não pode ser precipitado em solução aquosa pois é instável em água, transformando-se em HA. É usualmente obtido através de síntese de apatita cálcio-deficiente e subsequente calcinação entre 700^{o}C e 800^{o}C para formar a forma alotrópica β-TCP, com perda de água (SADER *et a*l., 2009). Acima da temperatura de transição, a transformação de beta em α-TCP causa expansão do material durante o processo de sinterização e cria micro-trincas na cerâmica, o que impede a densificação da cerâmica (ZHANG *et al*., 2008).

II.5.4 Fosfato tricálcico do tipo β contendo magnésio

Além dos íons cálcio e fosfato, o osso também contém Na^{1+}, Mg^{2+}, K^{+}, CO_3^{2-}, F^{-}, Cl^{-} e traços de Zn^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Pb^{2+} e Sr^{2+}. Os cristais medem entre 25nm de profundidade, 40-120nm de largura e 0.16-1mm de comprimento, compostos por fases de HA, CaO e β-TCP. Os elementos traço desempenham papel importante na performance do osso humano (BANDHYOPADHYAY *et al*., 2006).

As substituições iônicas modificam a estrutura da superfície e a carga elétrica da HA, alterando o comportamento químico e biológico do TCP (VALLET-REGI e GONZÁLES-CALBET, 2004, MARCHI *et al*., 2007). Estudos com substituições iônicas nas cerâmicas de fosfato de cálcio são, portanto, de grande importância. O preparo de TCP sintético com magnésio (Mg) é de grande interesse para o desenvolvimento de substitutos ósseos artificiais, que são caracterizados pela alta reaborção, podendo atuar simultaneamente como fonte de Mg (LANDI *et al*., 2008, LI *et al*., 2008).

Cinquenta a sessenta e cinco por cento do magnésio total está no tecido ósseo e somente 1% está no fluido extracelular (LI *et al*., 2008). Magnésio exerce papel fundamental como co-fator de mais de 300 reações enzimáticas envolvendo metabolismo energético e síntese de ácidos nucléicos. Está também envolvido em processos tais como: ligação de hormônios e seus receptores, regulação da contração muscular, atividade neuronal, controle do tônus vascular, excitabilidade cardíaca. Na maioria destas atividades o magnésio atua como antagonista fisiológico de cálcio (FAWCETT *et al*., 1999).

A deficiência de Mg reduz significativamente o paratormônio e os níveis de vitamina D, inibe a proliferação celular como resultado da inibição da síntese protéica, de RNA e DNA (LI *et al*., 2008), afetando adversamente todos os estágios do metabolismo ósseo, paralisando o crescimento ósseo, reduzindo a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, causando osteopenia e fragilidade óssea (KIM *et al*., 2003, SADER *et al*., 2009).

Decréscimo do conteúdo de Mg nos ossos e elevada cristalinidade foram encontrados e associados a estado de osteoporose senil. Tais efeitos adversos associados à deficiência de Mg poderiam inviabilizar o crescimento e mineralização óssea, reduzindo a qualidade do osso (resistência mecânica e densidade

diminuídas), bem como aumentar a fragilidade óssea. A deficiência de Mg tem sido sugerida como risco potencial ao desenvolvimento da osteoporose. A terapia com Mg tem sido relatada como indutora do aumento da massa óssea de mulheres com osteoporose pós-menopausa (LI *et al*., 2008; REN *et al*., 2010).

Portanto, 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 *et al.*, 2004).

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 *et al.*, 2006). A adição de Mg afeta a estabilidade da rede, diminuindo os parâmetros da rede e consequentemente do tamanho do cristal; estabiliza a fase beta, pois eleva a temperatura de transformação da fase alfa para valores acima de 1500^{o}C (MARCHI *et al*., 2007, SADER *et al*., 2008, ZHANG *et al.*, 2008). A presença do Mg inibe o crescimento do grão durante a sinterização (MARCHI *et al*., 2007); também aumenta a densidade e resistência à dissolução (RYU *et al.*, 2004, LEE *et al.*, 2008).

Sabe-se que a regeneração óssea depende de diversos fatores tais como porosidade, composição, solubilidade e presença de determinados elementos que, liberados durante a reabsorção do material cerâmico, facilita a regeneração óssea carreada pelos osteoblastos. Portanto, pequenas quantidades de magnésio estimulam a ação desses osteoblastos e consequentemente, a neoformação óssea (VALLET-REGI e GONZÁLES-CALBET, 2004). A tendência atual é, portanto, obter cerâmicas de fosfato de cálcio parcialmente substituída. O objetivo é aumentar a bioatividade da HA e obter comportamento *in vivo* mais similar ao osso mineral, quando comparado aos materiais sintéticos sem Mg (MARCHI et al., 2007).

Tem sido sugerido que o magnésio estimula diretamente a proliferação osteoblástica, com efeito comparável ao do IGF-1, conhecido como fator de crescimento do osteoblasto (SUCHANEK *et al.*, 2004). De fato, SADER e colaboradores (2009) observaram maior proliferação e adesão de osteoblastos humanos na presença de pastilhas de TCP contendo magnésio quando comparados a pastilhas de TCP puro.

III OBJETIVOS

- Produzir e caracterizar fosfato tricálcico do tipo beta parcialmente substituído por magnésio (β-TCMP);

- Produzir e caracterizar grânulos densos (com tamanho entre 250μm e 500μm) de β-TCP comercial (Merck), utilizando-os como material de referência para comparação dos resultados obtidos com o β-TCMP;

- Avaliar a reação inflamatória e reparo tecidual após implantação dos grânulos de β-TCP e de β-TCMP em alvéolo dentário de ratos;

- Comparar a bioreabsorbilidade dos materiais após a enxertia;

- Quantificar os níveis de RANK-L, OPG, OC, ON e PTH do sangue dos animais após implantação dos grânulos de β-TCP e de β-TCMP.

IV METODOLOGIA DA PESQUISA

IV.1 Material

O material utilizado foi β-TCP e β-TCMP (razão molar Ca/Mg = 0,15) sob a forma de grânulos densos, ambos com granulometria entre 250μm e 500μm.

IV.1.1 Pós de β-TCP e β-TCMP

IV.1.1.1 β-TCP

Foi utilizado o pó de Beta Fosfato Tricálcico da marca MERK (Darmstadt - Germany, ref. n^{o}. 1021439026, lote K92901043, data de fabricação 11/11/2008, data sheet do fabricante 1.02143.9026).

IV.1.1.2 Síntese do β-TCMP

O pó de apatita cálcio-deficiente com relação Ca/Mg de 0,15 foi obtido pelo método úmido, a partir de 9,6316g de $Ca(OH)_2$ (MERK, Darmstadt, Germany); 3,5022g de $MgCl_2.6H_2O$; 19,18ml de H_3PO_4 (figura IV.1). A reação entre o hidróxido de cálcio $Ca(OH)_2$, solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) e o cloreto de magnésio hexahidratado ($MgCl_2.6H_2O$) ocorreu com auxílio de bomba peristáltica, em pH 9 e temperatura de 38^{o}C por 3 horas. A mistura permaneceu por 3 horas adicionais no agitador e 12 horas *overnight* com controle do pH. O material foi então filtrado, lavado até a neutralização do pH e levado à estufa a 40ºC para secagem.

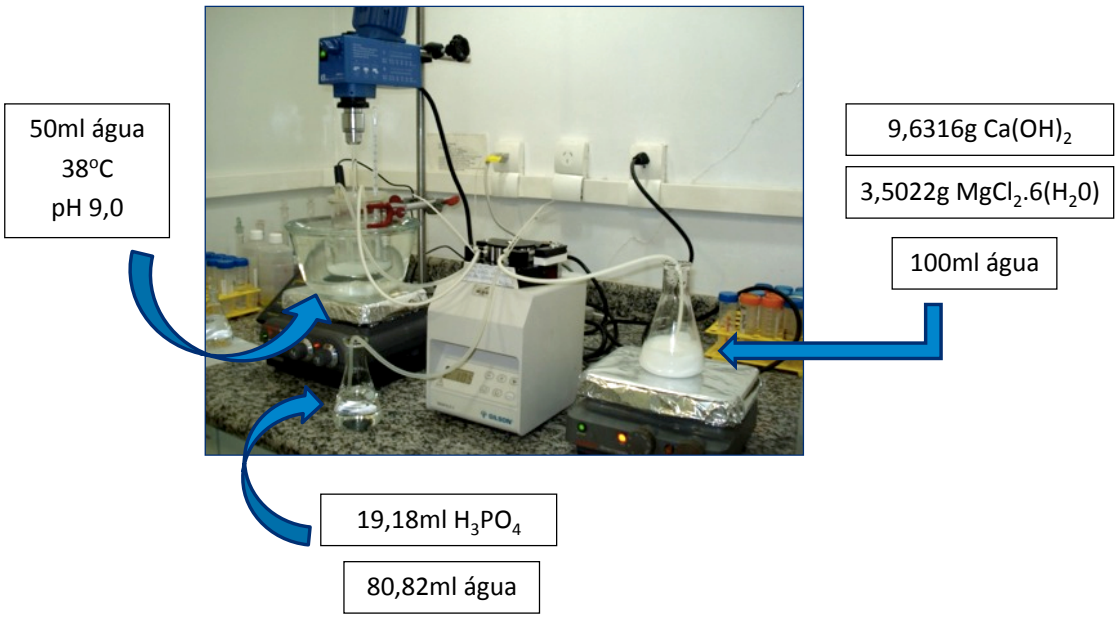


Figura IV.1. Síntese do pó de apatita cálcio deficiente contendo magnésio.

IV.1.2 Obtenção de grânulos densos de β-TCP e de β-TCMP

Os pós foram desaglomerados e passados em peneiras de 125 μm. Os grânulos densos foram obtidos a partir de pastilhas, após prensagem uniaxial a frio (prensa CARVER), com auxílio de matriz metálica de 13mm de diâmetro, sob pressão compressiva de 216 MPa. As pastilhas de β-TCP e de β-TCMP foram calcinadas como descrito no item IV.1.3, trituradas e passadas em peneiras de 250μm e de 500μm.

IV.1.3 Calcinação

O pó e as pastilhas de β-TCP e de β-TCMP foram calcinados em forno tipo mufla (Quimis), de acordo com o ciclo térmico apresentado na Tabela IV.1.

Tabela IV.1- Ciclo térmico para calcinação do pó e pastilhas de β-TCP e de β-TCMP.

Etapas	*Temperatura*	*Tempo*
1	Até 1000º C	6 horas
2	1000º C	4 horas
3	Até 30°C	6 horas

IV.1.4 Caracterização

IV.1.4.1 Difração de raio X (DRX)

A difração de raios X [CuKα (30 KV, 15mA); 2θ:3°-70°, SHIMADZU-XRD 6000] foi efetuada para avaliar a cristalinidade e composição das fases presentes nas amostras.

IV.1.4.2 Análise no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho foi realizada para identificar os modos de vibração molecular nos respectivos comprimentos de onda, característicos de cada grupamento químico presente. A análise FTIR (Perkin Elmer, Spectrum 100) foi realizada em pastilhas contendo brometo de potássio e comprimento de onda entre 500 e 5.000 cm^{-1}

IV.1.5 Esterilização

O biomaterial foi esterilizado em autoclave (Vitale 12 - Cristófoli) sob pressão de 150kPa (1,5 kgf/cm^2), temperatura de 130°C, por 12 minutos, previamente à implantação cirúrgica.

IV.2 Estudo da biocompatibilidade

O experimento obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA, protocolo nº 00114/09) da Universidade Federal Fluminense em 3 de setembro de 2009 (anexo 1).

IV.2.1 Grupos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com peso médio de 250g, mantidos em gaiolas, com ração e água sem restrições, no Núcleo de Animais de Laboratório (NAL) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

IV.2.1.1 Grupo I (controle)

Composto por 15 animais que não receberam biomaterial. Cinco animais foram sacrificados após 7 dias; cinco animais foram sacrificados após 21 dias e 5 animais após 42 dias.

IV.2.1.2 Grupo II

Composto por 15 animais que receberam enxerto de grânulos densos de β-TCP. Cinco animais foram sacrificados após 7 dias; cinco animais foram sacrificados após 21 dias e 5 animais após 42 dias.

IV.2.1.3 Grupo III

Composto por 15 animais que receberam enxerto de grânulos densos de β-TCMP. Cinco animais foram sacrificados após 7 dias; cinco animais foram sacrificados após 21 dias e 5 animais após 42 dias.

IV.2.2 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de 75mg/kg de Ketamina (cloridrato de cetamina, Veltbrands, Brasil) e 1,5ml/kg de Rompun (xilazina, Veltbrands, Brasil). Em seguida, o sulco gengival do dente incisivo central superior direito foi incisado com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15 (Safit®);

descoladores mucoperiostais foram utilizados para dissecar a mucosa gengival assim como instrumentais adequados para provocar luxação e extração do elemento dentário. Após a extração, o alvéolo dental foi preenchido com biomaterial (βTCP ou βTCMP) (figura IV.2). O grupo controle não recebeu biomaterial; desta forma o alvéolo foi preenchido pelo coágulo sanguíneo. Ao término dos procedimentos cirúrgicos, o periósteo e a mucosa gengival foram reposicionados para sutura com fio de nylon 5.0 (Ethicon®, Johnson & Johnson) para proteger o leito cirúrgico e anti-sepsia local com clorexidina 0,12% foi efetuada para evitar contaminação secundária.

Figura IV.2. Extração do incisivo superior direito e implantação do biomaterial.

IV.2.3 Sacrifício e coleta das amostras

Os animais foram anestesiados de acordo com o protocolo já descrito. Foi feita incisão no tórax dos animais. Após secção do osso esterno, o sacrifício foi realizado por meio de punção cardíaca com seringa e agulha 0,70mmx30mm, nos tempos previamente estabelecidos (7, 21 ou 42 dias). O sangue coletado foi transferido para tubos plasticos tipo Falcon. Aguardou-se a coagulação sanguínea (30 minutos) à temperatura ambiente (25^{o}C). Os tubos foram então centrifugados a 1000 xg a 25^{o}C por 10 minutos sem freio. O sobrenadante (soro) foi coletado em criotubo e armazenado em freezer -80^{o}C.

As maxilas foram dissecadas (figura IV.3A), seccionadas (figura IV.3B) ao longo da sutura mediana e acondicionadas em formol a 10% tamponado.

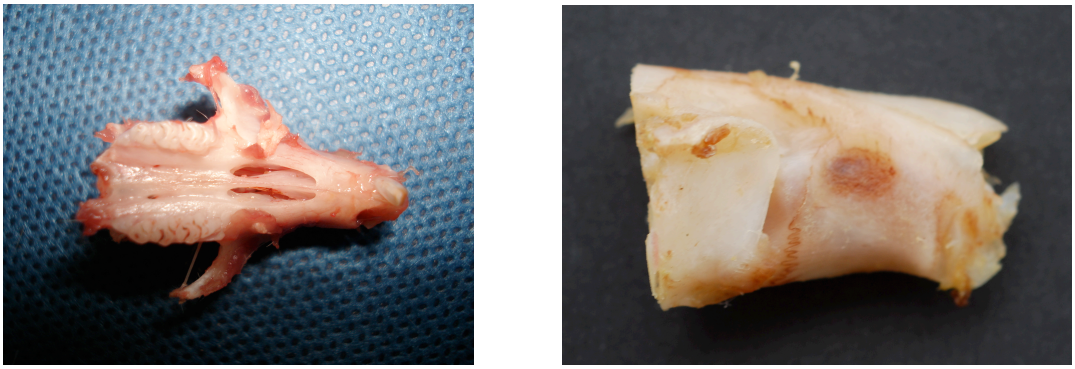


Figura IV.3. (A) Maxila dissecada. (B) Hemimaxila direita, vista distolateral.

IV.2.4 Desmineralização e processamento histotécnico

As hemimaxilas foram imersas na solução desmineralizadora Alkimia por 48 horas. A seguir foram lavadas em água corrente, banhadas em álcool com concentrações de 70%, 80% e 100% sucessivamente, e xilol. Em seguida foram incluídas e parafina e levadas ao micrótomo para obtenção de cortes de 5µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE).

IV.2.5 Análise histológica descritiva

As fotomicrografias dos cortes histológicos corados com HE foram obtidas num microscópio LEICA DM5000B, com aumento de 100x. Foram feitas seis tomadas fotográficas do terço médio do alvéolo dental. Na análise microscópica (microscopia óptica de transmissão), identificou-se as seguintes células inflamatórias: polimorfonucleares, mastócitos, células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho e macrófagos; foi também observada a presença de biomaterial e de infiltrado inflamatório, bem como a formação de tecido fibroso ou neoformação óssea.

IV.2.6 Histomorfometria

Foram fotografados seis campos (objetiva de 10x) do terço médio do alvéolo dental de cada animal, totalizando 270 imagens. O terço médio alveolar foi selecionado como sítio para a análise histológica por estar equidistante dos terços cervical e apical. O terço cervical está exposto à cavidade bucal e mais susceptível às

influências externas (trauma e infecção). O processo de reparo da ferida cirúrgica tem início na parede alveolar apical, de onde migram as células que formarão a matriz óssea. O terço médio fornece, por conseguinte, um panorama mais genuíno do processo de regeneração.

A figura IV.4 esquematiza a metodologia utilizada para a localização dos campos a serem fotografados sem que houvesse a superposição dos mesmos. A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio do programa Image Pro Plus® (Media Cybernetics, L. P., Silver Spring, MD). Uma grade de 200 pontos foi sobreposta às imagens para quantificar manualmente a densidade de volume de tecido conjuntivo, osso neoformado e biomaterial, sendo os resultados expressos em área (mm²), assim como realizado por COSTA (2008).

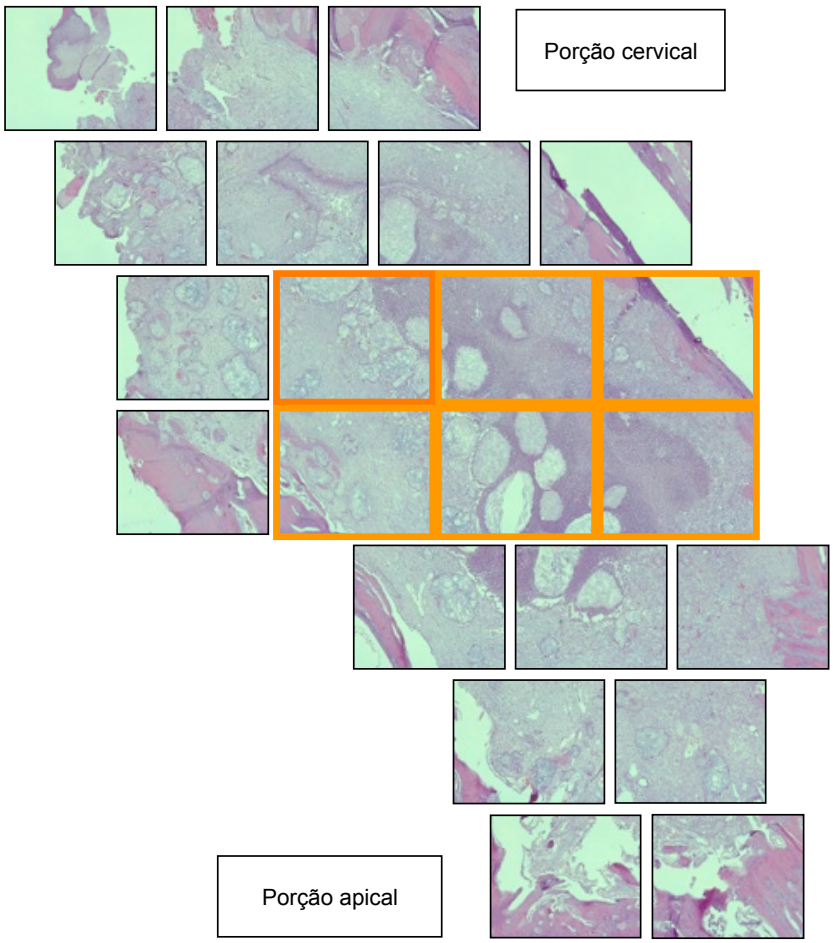


Figura IV.4. Montagem esquemática das fotomicrografias dos 6 campos do terço médio do alvéolo dental.

IV.2.6.1 Análise estatística

A análise estatística dos escores foi realizada por meio de teste de comparação das médias dentro dos grupos com o mesmo tratamento (grupos I, II e III) e dos grupos com o mesmo tempo (7, 21 ou 42 dias). As médias e desvios padrão obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA com pós-teste de Tukey ($p<0,05$). Nos grupos com o mesmo período de tratamento (7, 21 ou 42 dias) os dados foram submetidos ao teste *t* pareado. As diferenças foram consideradas significantes quando $p<0,05$. Foram utilizados os programas GraphPad InStat versão 3.01 para Windows 95, 1998, GraphPad Software, San Diego California EUA,(www.graphpad.com) e GraphPad Prism versão 4.00 para Windows, 2003, GraphPadSoftware, San Diego California EUA, (www.graphpad.com).

IV.2.7 Quantificação do RANK-L, osteoprotegerina, osteocalcina, osteopontina e paratormônio

Os níveis séricos de RANK-L, OPG, ON, OC e PTH foram avaliados por imunoensaio a partir de *kits* baseados na tecnologia xMAP (Milliplex MAP kit, Millipore, EUA) em sistema de luminometria de fluxo Luminex 200 (Luminexcorp, EUA). As concentrações das citocinas foram expressas em pg/mL.

As amostras de soro foram retiradas do freezer -80°C e, após descongelamento, transferidas, no volume de 25 microlitros, a diferentes poços de placas de 96 poços com fundo de filtro (Millipore, EUA). As placas foram completadas com as soluções-padrão (de concentrações conhecidas, produzidas a partir de diluições seriadas) de RANKL e OPG; OC, ON e PTH e com um branco, composto por PBS. As micropérolas anti-RANKL, anti-OPG; anti-OC, anti-ON ou anti-PTH foram dispersas em ultrassom até sua completa dispersão e adicionadas, a um volume de 25 microlitros a cada poço, junto a 25 microlitros de tampão de ensaio, como fornecido nos *kits* Milliplex MAP. As amostras foram mantidas neste meio reacional por 18 horas, a 4°C, em agitação constante, com auxílio de um agitador de microplacas. Ao término do tempo de incubação, o meio reacional foi removido por filtração a vácuo (a partir do filtro presente no fundo da placa de 96 poços) e cada poço lavado 3 vezes com 200 microlitros de uma solução de lavagem fornecida no *kit*. Em seguida, 50 microlitros de solução contendo os anticorpos de detecção foram adicionados a cada poço, sendo incubados por 1 hora temperatura ambiente, para permitir a

complexação com o analito, formando o “sanduíche” do imunoensaio. Finalmente, 50 microlitros da solução contendo o complexo estreptavidina-ficoeritrina foram adicionados aos poços, e incubados mais uma vez em constante agitação à temperatura ambiente por 30 minutos. O meio foi removido mais uma vez por filtração a vácuo seguida de 3 novas lavagens com 200 microlitros de tampão de lavagem. Ao término desta etapa, as micropérolas foram ressuspensas em 100 microlitros de *sheath fluid* (fluido que transporta as microesferas por dentro do aparelho de detecção), sob agitação por 5 minutos. As placas foram levadas ao sistema Luminex 200 e a intensidade de fluorescência das microesferas e dos anticorpos de detecção marcados com ficoeritrina foi detectada em todos os poços. Os resultados foram analisados através do software xPONENT v. 3.0 (Luminexcorp, EUA).

IV.2.7.1 Análise estatística

Aos dados obtidos a partir das dosagens dos analitos, para os diferentes grupos experimentais, foi aplicada uma análise não-paramétrica (Kruskal-Wallis), considerando-se um nível de significância alfa = 0,05. As diferenças entre os grupos experimentais foram avaliadas através de um pós-teste de Dunn. A análise foi realizada com o auxílio do software InStat (GraphPad Software Inc., EUA).

V RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 Caracterização

V.1.1 Difração de raio X

Existem atualmente no mercado mundial diversos substitutos ósseos à base de fosfatos de cálcio (hidroxiapatita, fosfato tricálcico, vidro bioativo), cujas características objetivam tentar substituir o enxerto de osso autógeno, atual padrão ouro no que se refere ao reparo ósseo. A apatita é chamada cálcio-deficiente quando a razão entre Ca/P for inferior ao valor de 1,67, valor de referência para a hidroxiapatita estequiométrica. Esta deficiência em cálcio depende das condições de síntese do material, como o pH ou temperatura da reação. O fosfato tricálcico existe em duas fórmulas alotrópicas, β-TCP que é a forma em baixa temperatura e α-TCP que é a forma encontrada em alta temperatura, 1125ºC (DOROZHKIN, 1997). Neste estudo, o material alcançou a temperatura máxima de 1000ºC, sendo portanto β-TCP, o que pode ser observado na Figura V.1, cujos difratogramas mostram a obtenção de fosfato betatricálcico cristalino após calcinação a 1000^{o}C. Com a introdução do magnésio há uma pequena modificação nos picos do difratograma que passa a corresponder à ficha JPDS 13-0404, chamado de beta-fosfato tricálcico dopado com magnésio (β-TCMP). O β-TCP é instável em água, não se precipitando em condições aquosas normais (KWON *et al*., 2003). No entanto, pode ser obtido pelo tratamento térmico da hidroxiapatita cálcio deficiente na faixa entre 700 a 800ºC (LEGEROS *et al.*, 2003; KANNAN *et al.*, 2009). Para sintetizar β-TCP em meio aquoso, normalmente o magnésio é incorporado à estrutura, resultando no β-TCMP (KWON *et al*., 2003; LEGEROS *et al.*, 2003). Neste estudo, o pó de apatita cálcio-deficiente com relação Mg/Ca de 0,15 foi obtido pelo método úmido. A reação entre o hidróxido de cálcio $Ca(OH)_2$, solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) e o cloreto de magnésio hexahidratado ($MgCl_2.6H_2O$) ocorreu em pH=9 e temperatura de 38^{o}C por 3 horas. O plasma sanguíneo humano contém Mg^{2+} na quantidade de 1,5 mM, apontando para uma natural formação de β-TCMP em seu meio. No dente, a dentina possui estrutura diferente do esmalte, sendo mais porosa. Mesmo que ela possua um alto teor de material orgânico, também contém elevados teores de F^{-} e Mg^{2+} (OKAZAKI, 1992). A deficiência de magnésio causa adversidades aos estágios do metabolismo esquelético, causando parada do crescimento ósseo, decréscimo das atividades osteoblásticas e osteoclásticas. Desta forma, a incorporação do magnésio

à estrutura da apatita é de grande interesse para o desenvolvimento de uma estrutura óssea artificial (OKAZAKI, 1991; KIM *et al*., 2003).

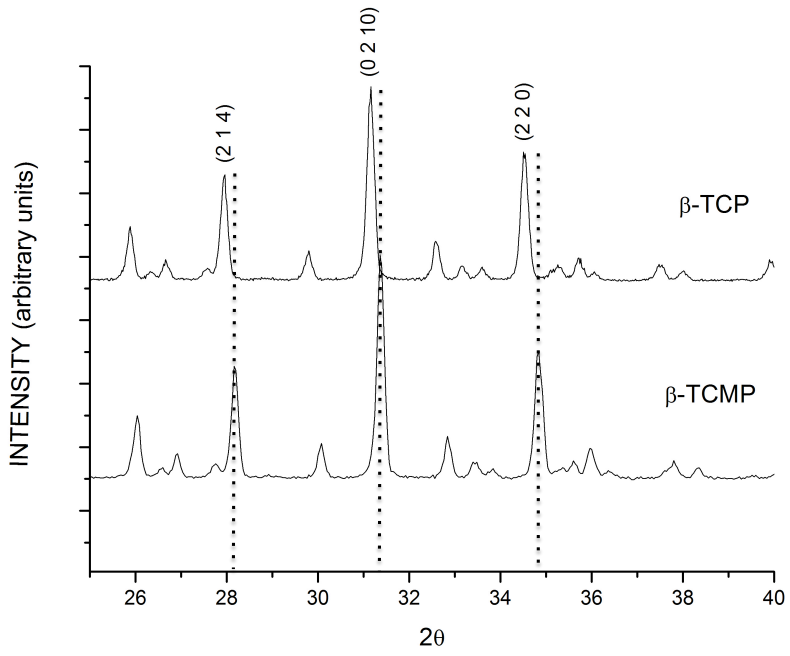


Figura V.1. Difratograma dos grânulos de β-TCP (JCPDS 09-0432) e de β-TCMP (JCPDS 13-0404).

V.1.2 Análise no infravermelho por transformada de Fourier

Os espectros de FT-IR mostrados nas figuras V.2 e V.3 apresentam bandas de água (3640 e 1639 cm^{-1}) atribuídas ao método de síntese de precipitação em meio aquoso. A banda (874 cm^{-1}) correspondente à absorção de hidrogenofosfato (HPO_4^{-2}) é característica de uma apatita cálcio deficiente, assim como a banda OH^- (3570 cm^{-1}). O processo de calcinação resulta no desaparecimento destas bandas e na redução das bandas de água. As bandas de fosfato (PO_4^{-3}) em 1035, 603 e 564 cm^{-1} são características dos materiais. As bandas de carbonato (CO_3^{-2}), em 1400-1450 cm^{-1}, somente foram identificadas nas amostras verdes. Estas podem ser atribuídas ao processo de síntese, que não foi realizado sob atmosfera inerte. (SADER, 2009).

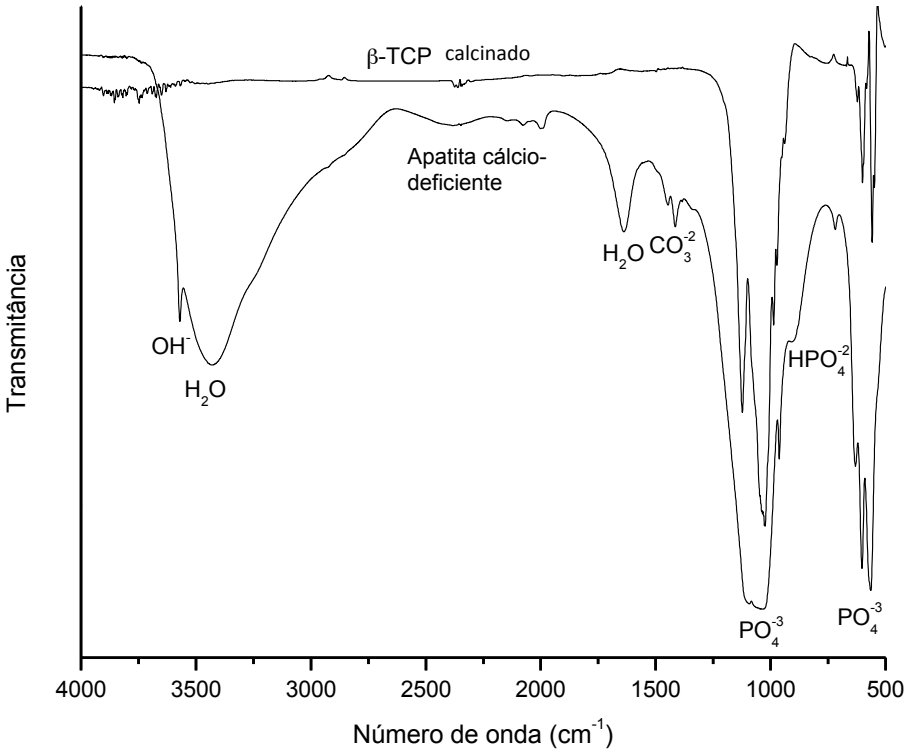


Figura V.2. Espectro de FT-IR do β-TCP (pó) com e sem calcinação (verde).

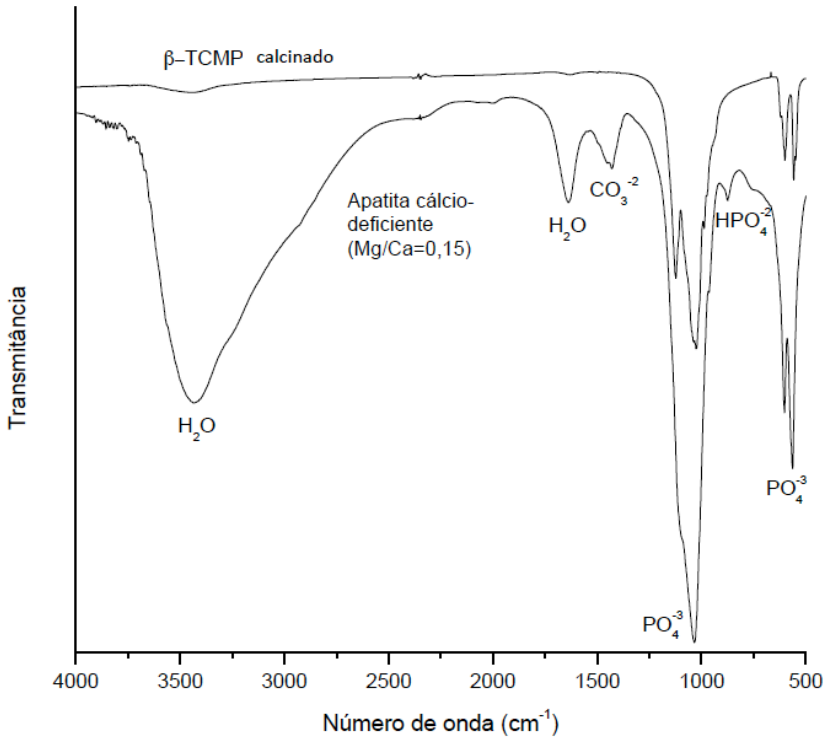


Figura V.3. Espectro de FT-IR do β-TCMP (pó) com e sem calcinação (verde).

V.2 Estudo da biocompatibilidade

Para o desenvolvimento de novos materiais, é necessária a compreensão da resposta do hospedeiro, *in vivo*. Os fosfatos tricálcicos reagem quimicamente com o ambiente em que foram implantados e, idealmente, não deveriam provocar reações indesejáveis. Em geral, os organismos vivos tratam os implantes artificiais como material biotóxico, biocompatível (ou biotolerante), bioinerte (ou bioestável), bioativo ou bioreabsorvível. Todos os tipos de implante (biocerâmicas de porosidade e estrutura variáveis, pó ou grânulos) são atóxicos mas também induzem reação inflamatória ou reação do tipo corpo estranho (DOROZHKIN, 2010).

O modelo animal empregado neste trabalho caracterizou-se pela extração do incisivo do rato e pelo preenchimento do alvéolo com o biomaterial. O processo de reparo em feridas de extração dental tem início logo após após o ato cirúrgico com o preenchimento do alvéolo pelo coágulo sanguíneo. A seguir ocorre a proliferação de vasos sanguíneos e invasão de fibroblastos, que sintetizam substância fundamental amorfa e fibras colágenas. O processo de reparo tem início a partir do fundo do alvéolo e das paredes alvolares, onde as células osteoprogenitoras diferenciam-se nos osteoblastos. Os osteoblastos sintetizam a matriz orgânica que será posteriormente mineralizada. Em alvéolo de incisivo de rato, a ferida é reparada totalmente por tecido ósseo (regeneração) ao redor de 28 dias após o ato cirúrgico (VERONESE *et al*., 2005). Esta cronologia do processo de regeneração alveolar pode ser influenciada por inúmeros fatores locais, dentre eles a presença dos grânulos de β-TCP e de β-TCMP.

A resposta biológica aos fosfatos de cálcio implantados segue a reação em cascata semelhante à regeneração de uma fratura. Tal cascata inclui formação de hematoma, inflamação, neovascularização, reabsorção osteoclástica e neoformação óssea (DOROZHKIN, 2010).

O modelo animal utilizado permitiu, portanto, a análise da intensidade da reação inflamatória induzida pelo biomaterial e sua influência sobre o processo de regeneração.

V.2.1 Análise histológica descritiva

O grupo I (controle) apresentou no período de 7 dias pequenas ilhas de osso neoformado, dispersas em extensa área de tecido conjuntivo (figura V.4). A osteogênese intensificou-se aos 21 dias como pode ser observado pela extensa área de osso neoformado em oposição à diminuição da área de coágulo e tecido conjuntivo (figura V.5). Aos 42 dias havia predomínio das áreas de neoformação óssea sobre as áreas de tecido conjuntivo (figura V.6).

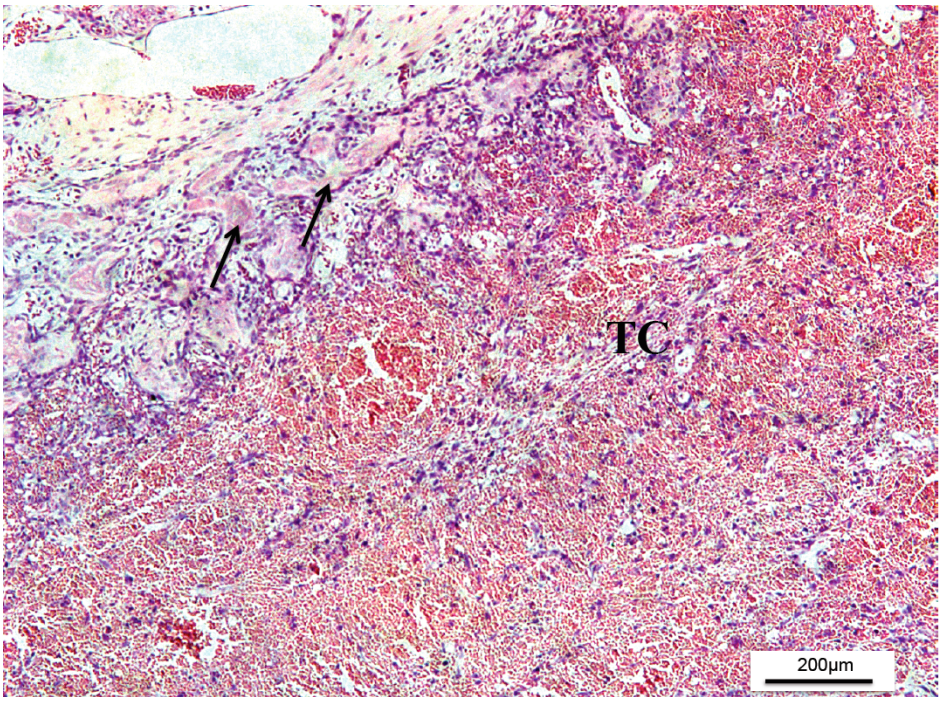


Figura V.4. Fotomicrografia do reparo tecidual (HE- hematoxilina-eosina). Grupo I apresentou, aos 7dias, pequenas ilhas de osso neoformado (setas), dispersas em extensa área de tecido conjuntivo (TC).

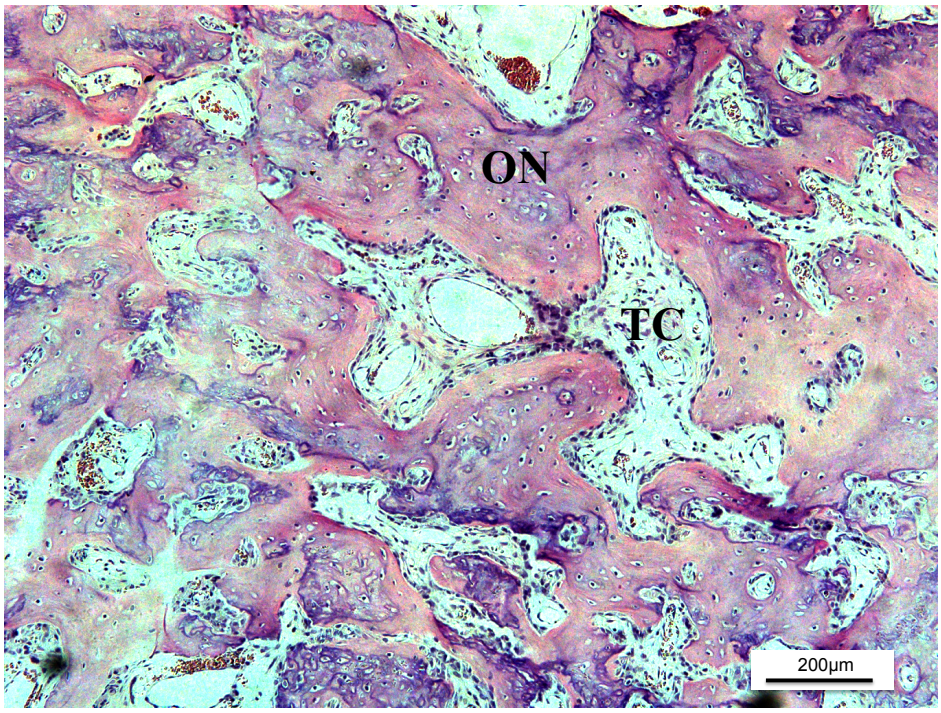


Figura V.5. Fotomicrografia Grupo I (HE). Aos 21 dias, houve aumento da área de osso neoformado (ON) e redução da área de coágulo e tecido conjuntivo (TC).

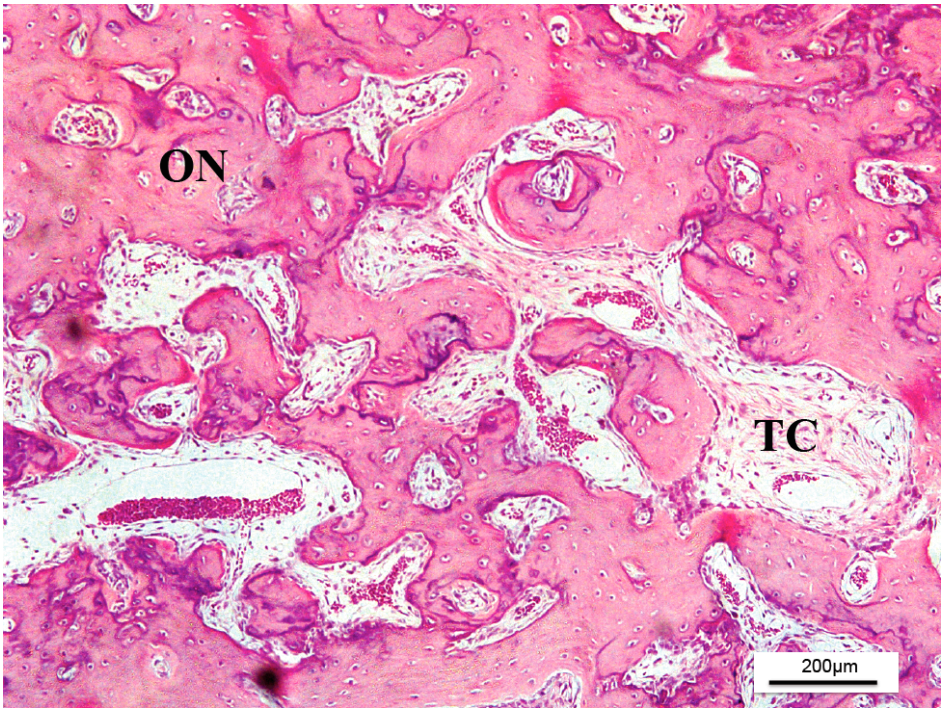


Figura V.6. Fotomicrografia Grupo I (HE). Aos 42 dias houve predomínio das áreas de neoformação óssea (ON) sobre as áreas de tecido conjuntivo (TC).

Os grânulos de β-TCP (Grupo II) encontravam-se, aos 7 dias, dispersos em área de infiltrado inflamatório difuso (figura V.7) contendo células polimorfonucleadas (figura V.8). Foi possível observar, no entanto, regiões de neoformação óssea. Aos 21 dias verificou-se redução das áreas de infiltrado inflamatório agudo e aumento da quantidade de osso neoformado associado ao biomaterial (figura V.9). Observou-se, próximo ao biomaterial, concentração de células arredondadas, fortemente coradas, sugestivas de osteoblastos (figura V.10). Após 42 dias constatou-se incremento das áreas de osso neoformado, diminuição da superfície de biomaterial e persistência de pequenas ilhas de tecido inflamatório (figura V.11).

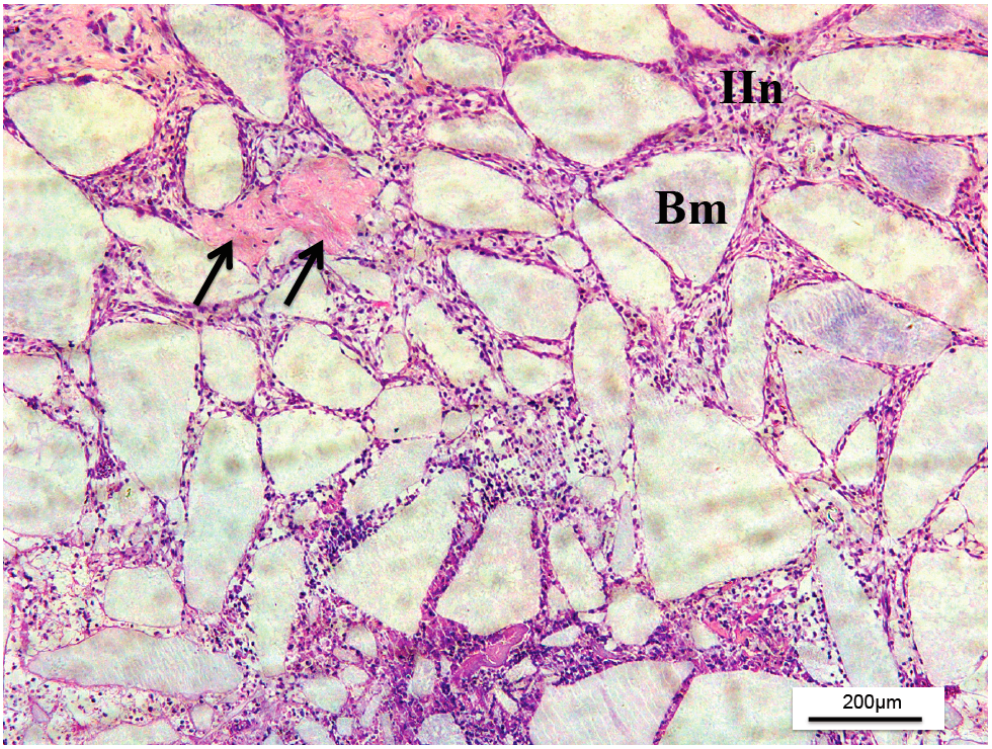


Figura V.7. Fotomicrografia Grupo II (HE). Aos 7 dias, os grânulos de β-TCP (Bm) encontravam-se dispersos em área de infiltrado inflamatório difuso (IIn). Presença de pequenas áreas de osso neoformado (setas).

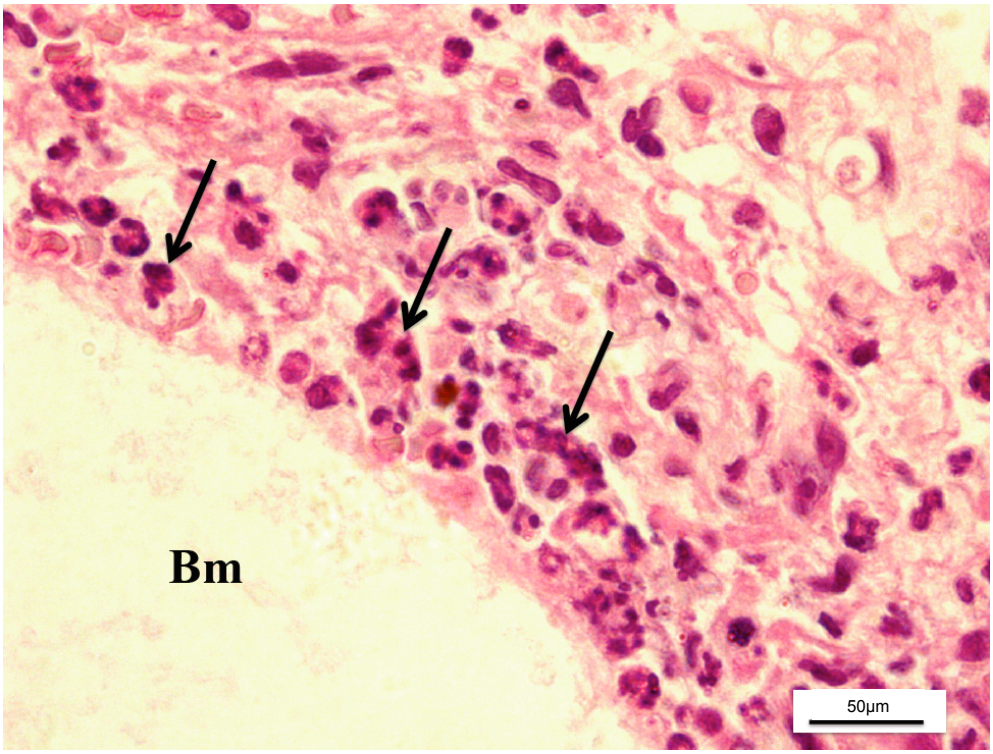


Figura V.8. Fotomicrografia Grupo II (HE). Em maior aumento (aumento 40x), presença de células polimorfonucleadas (setas) próximo a grânulo de biomaterial (Bm).

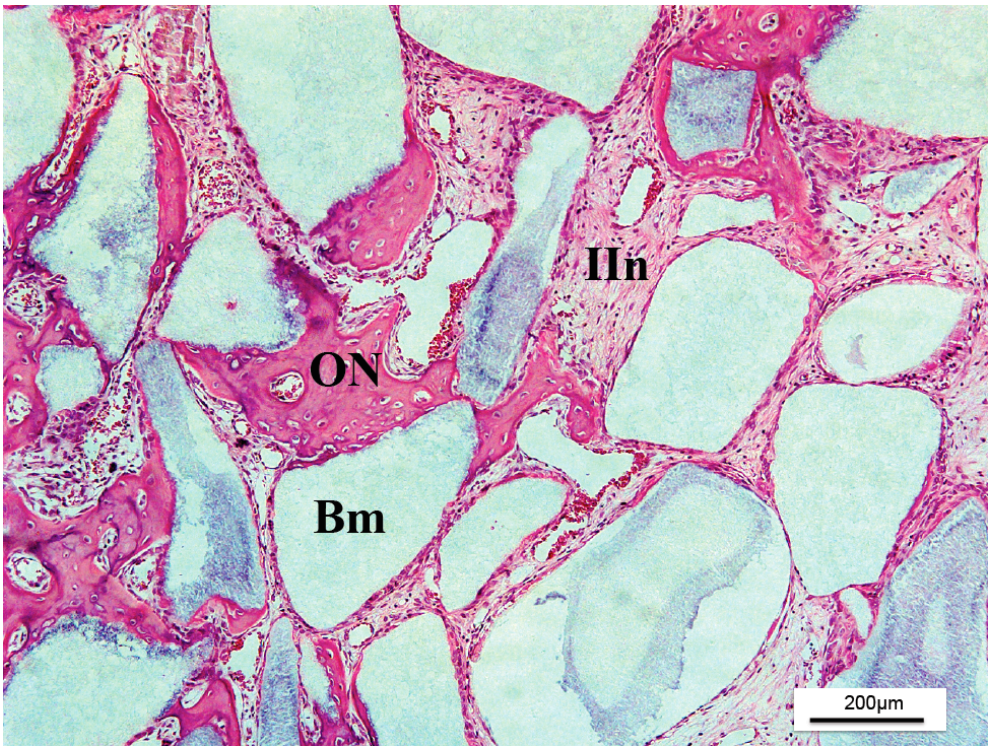


Figura V.9. Fotomicrografia Grupo II (HE). Aos 21 dias verificou-se redução das áreas de infiltrado inflamatório agudo (IIn) e aumento da quantidade de osso neoformado (ON) associado ao biomaterial (Bm).

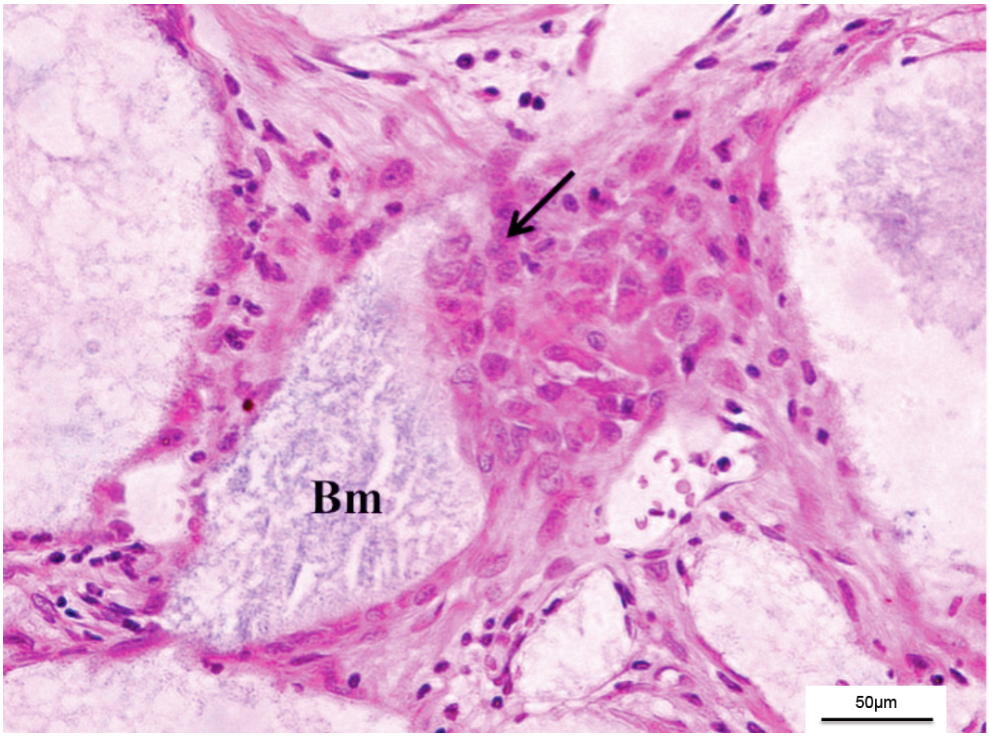


Figura V.10. Fotomicrografia Grupo II, 21 dias (HE). Observou-se, próximo ao biomaterial (Bm), concentração de células arredondadas, fortemente coradas, sugestivas de osteoblastos (setas) (aumento 40x).

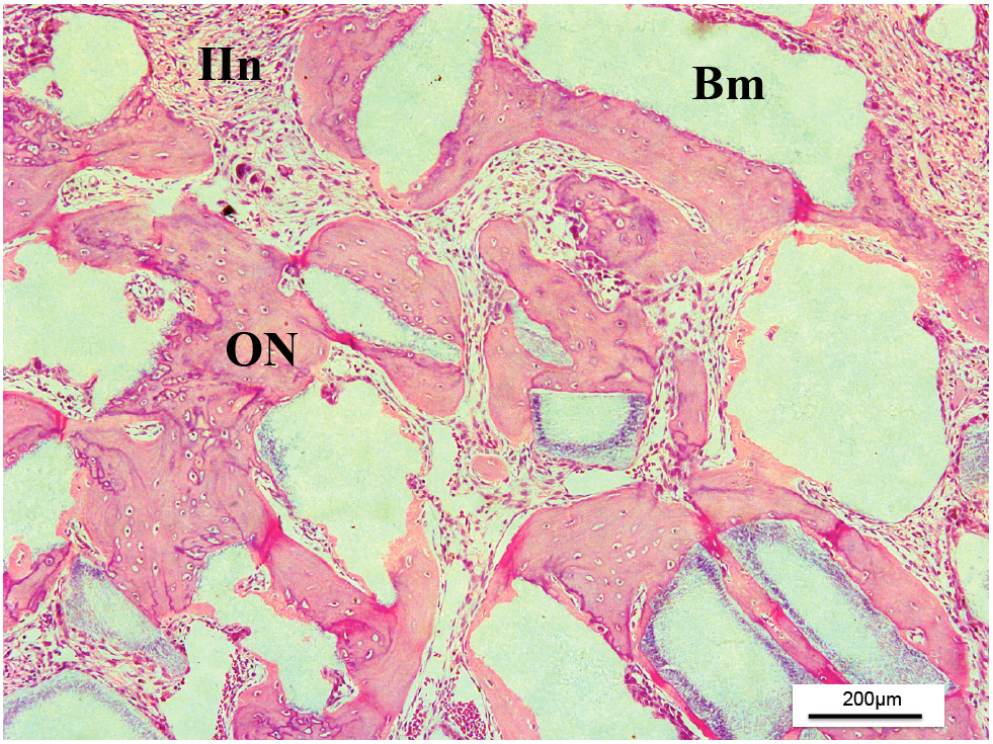


Figura V.11. Fotomicrografia Grupo II, 42 dias (HE). Observou-se incremento das áreas de osso neoformado, diminuição da superfície de biomaterial e persistência de pequenas ilhas de tecido inflamatório.

No grupo III, aos 7 dias, foi possível observar áreas focais de infiltrado inflamatório agudo e pequenas áreas de tecido ósseo neoformado em associação aos grânulos de β-TCMP (figura V.12). Em maior aumento, foi possível observar a presença de linfócitos, células características de infiltrado inflamatório crônico (figura V.13), A área de neoformação óssea aumentou consideravelmente aos 21 dias, ao mesmo tempo em que houve redução da reação inflamatória (figura V.14). Adjacente a vaso sanguíneo, foi possível identificar área de osso neoformado ao redor de osteócitos (figura V.15). Após 42 dias eram ainda menores as áreas de infiltrado inflamatório. Observou-se osteoblastos e área de neoformação óssea e próximo ao biomaterial (figura V.16); coalescência das trabéculas ósseas nos espaços entre os grânulos de β-TCMP (figura V.17).

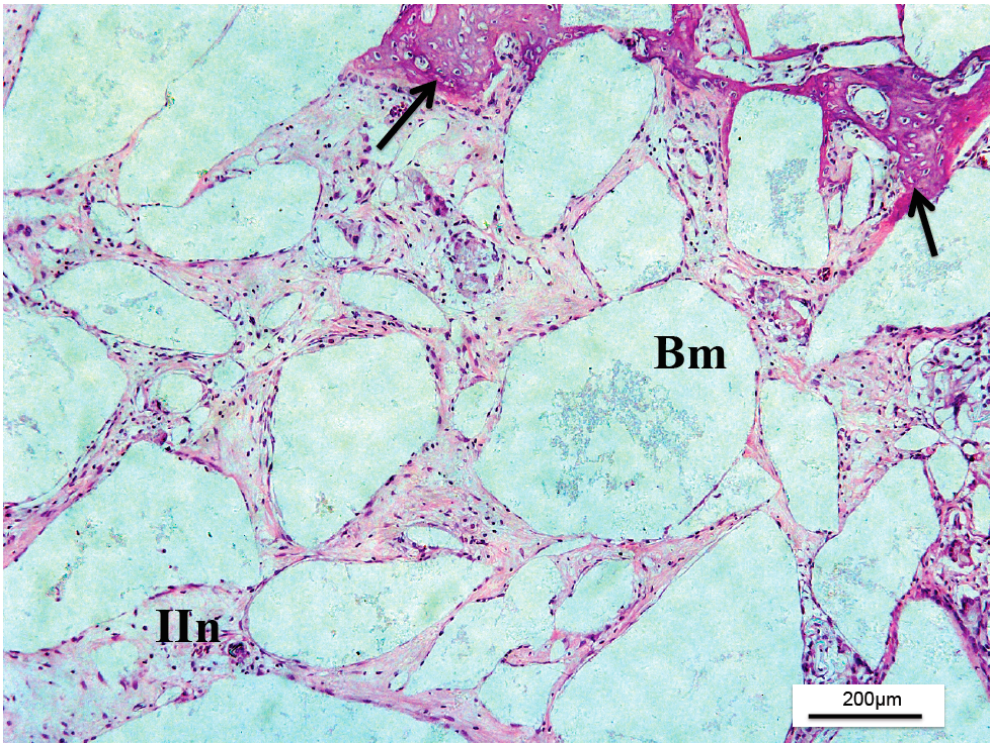


Figura V.12. Fotomicrografia (HE). No grupo III, aos 7 dias, observou-se áreas focais de infiltrado inflamatório agudo (IIn) e pequenas áreas de tecido ósseo neoformado (setas) em associação aos grânulos de β-TCMP (Bm).

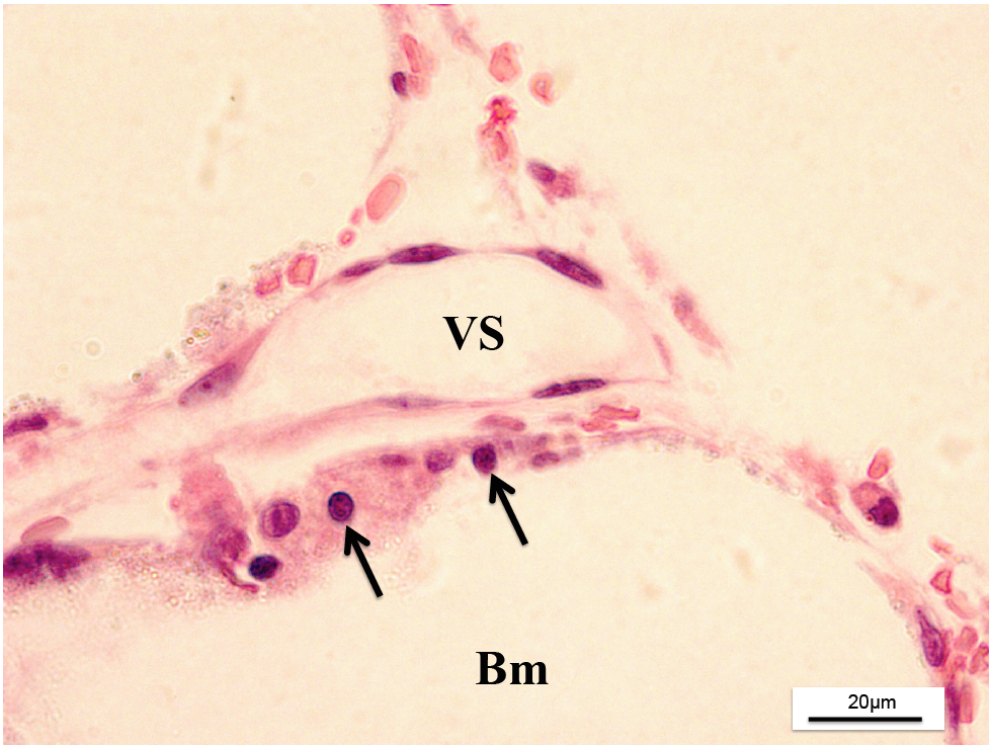


Figura V.13. Fotomicrografia Grupo III, 7 dias (HE). Em maior aumento (aumento 100x), foi possível observar a presença de linfócitos (setas), adjacentes ao biomateral (Bm) e a um vaso sanguíneo (VS).

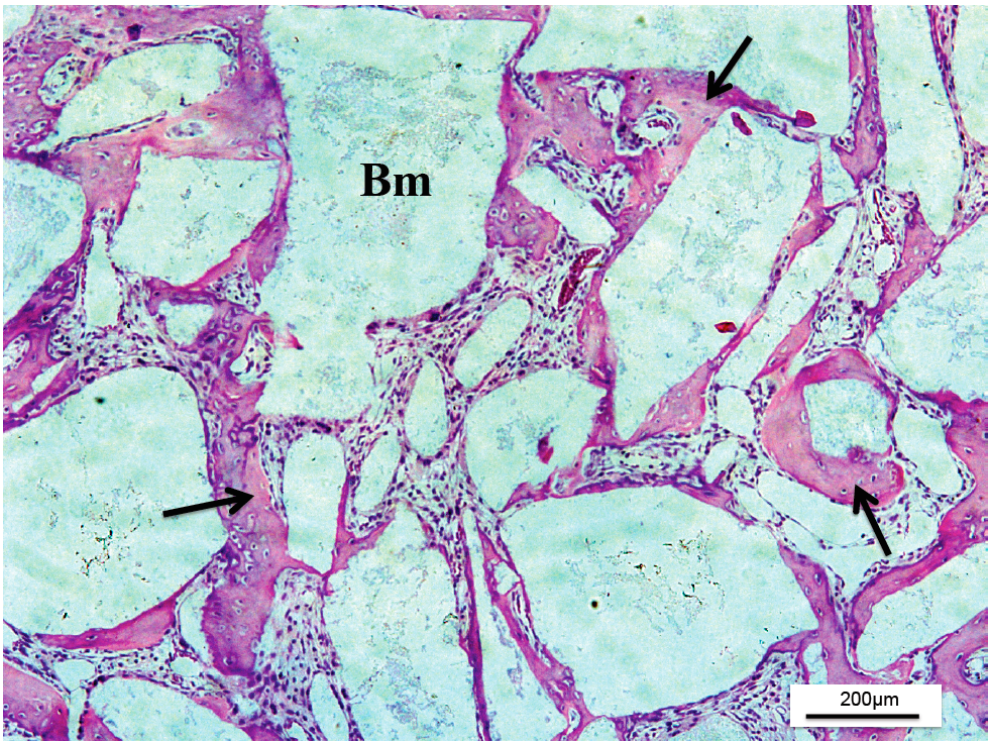


Figura V.14. Fotomicrografia Grupo III (HE). A área de neoformação óssea (setas) aumentou consideravelmente aos 21dias.

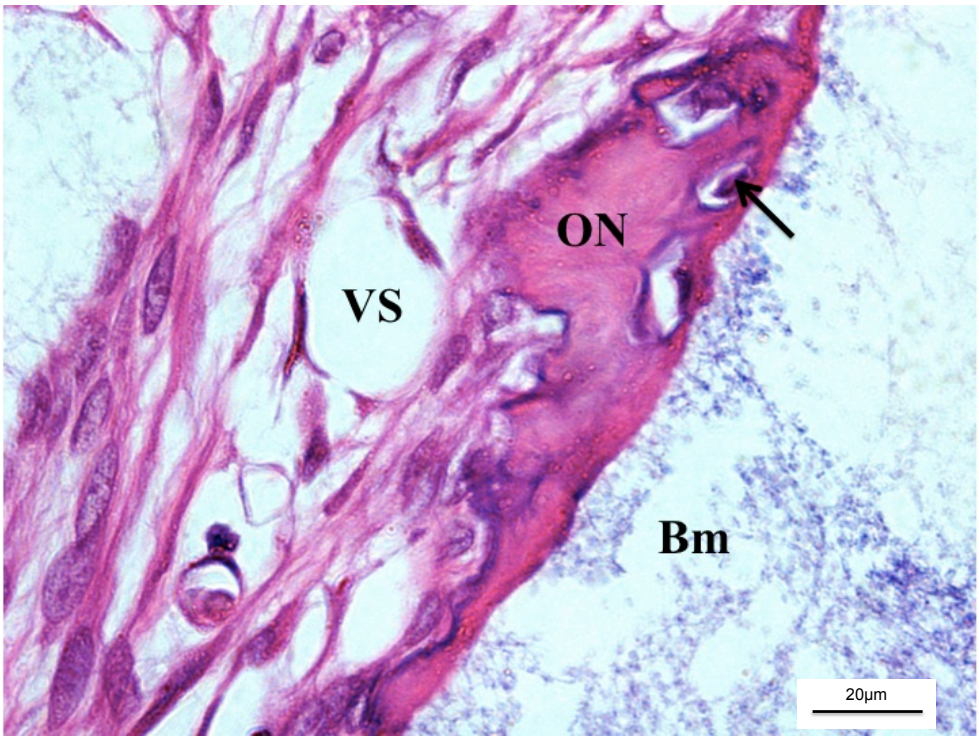


Figura V.15. Fotomicrografia Grupo III, 21 dias (HE). Adjacente a vaso sanguíneo (VS), observa-se osso neoformado (ON) e osteócitos (setas) no seu interior (aumento 100x).

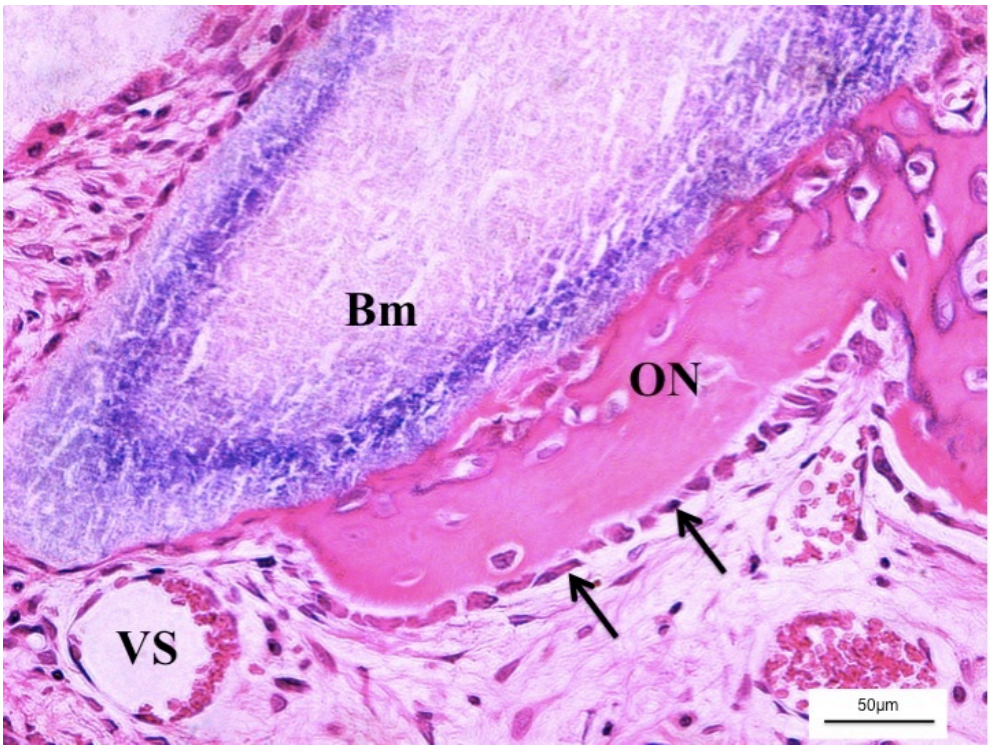


Figura V.16. Fotomicrografia Grupo III (HE). Aos 42 dias observou-se osso neoformado (On) e fileira de osteoblastos (setas) adjacentes a grânulo de β-TCMP (Bm) (aumento 40x).

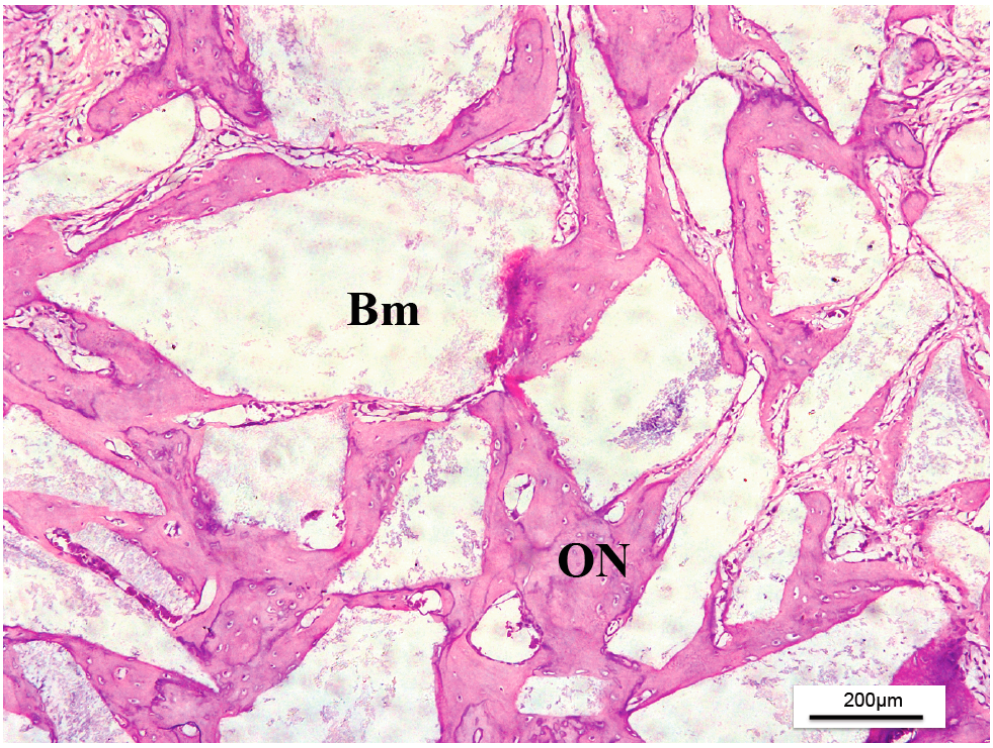


Figura V.17. Fotomicrografia Grupo III, 42 dias (HE). Coalescência do osso neoformado (ON) entre os grânulos de β-TCMP (Bm).

V.2.2 Histomorfometria

O desenvolvimento de novos materiais necessita de profundo conhecimento das respostas biológicas ao material implantado. Uma vez que o material é intruzido no organismo, ocorre uma sequência de eventos nos tecidos circunjacentes que inicia com a migração das células inflamatórias (neutrófilos polimorfonucleados, macrófagos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho), continua com a formação de tecido conjuntivo de granulação, e termina com a neoformação óssea (ANDERSON *et al.*, 2007).

No presente trabalho, a avaliação de tecido conjuntivo incluiu a quantificação de vasos sanguíneos, fibroblastos e células inflamatórias (figura V.18). No grupo I (coágulo), houve redução da área de tecido conjuntivo ao longo dos três períodos experimentais, sendo significativa entre 7 e 21 dias e entre 7 e 42 dias ($p<0,001$). Concomitantemente, observou-se aumento da área osso neoformado (figura V.19), que foi depositado em substituição ao tecido conjuntivo. Aos 7 dias, a quantidade de

tecido conjuntivo no grupo controle foi maior que o observado nos grupos β-TCP e β-TCMP (p<0,001). Tal observação deve-se ao preenchimento dos alvéolos dentários pelos biomateriais nestes dois grupos. A área de tecido conjuntivo no grupo II (β-TCP) aumentou significativamente entre os períodos 7 e 21 dias (p<0,05) e entre 7 e 42 dias (p<0,01) (figura V.18). No grupo III (β-TCMP) as diferenças entre as áreas de tecido conjuntivo ao longo do experimento não foram significantes (figura V.18).

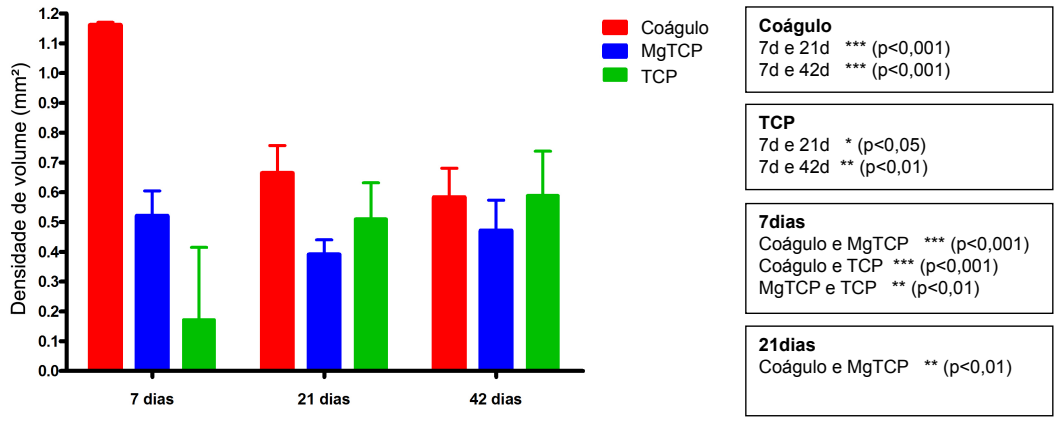


Figura V.18. Densidade de volume de tecido conjuntivo (mm^2) nos grupos coágulo (controle), β-TCMP (MgTCP) e β-TCP (TCP), aos 7, 21 e 42 dias.

No dia 7 encontrou-se diferença (p<0,001) entre as áreas de tecido conjuntivo dos grupos β-TCMP e β-TCP. Tal fato pode estar relacionado com a maior quantidade de osso neoformado observado no grupo β-TCP que no grupo β-TCMP no mesmo período, embora tal diferença não tenha sido significativa (figura V.19).

A figura V.19 mostra a área de osso neoformado nos 3 grupos experimentais aos 7, 21 e 42 dias. A área de neoformação óssea aumentou significativamente entre 7 e 21 dias (p<0,001) e entre 7 e 42 dias (p<0,001) no grupo coágulo. No grupo II (β-TCP) houve aumento significativo entre os dias 7 e 42 (p<0,01) e entre os dias 21 e 42 (p<0,01). No terceiro grupo experimental (β-TCMP) o aumento significativo ocorreu entre os 7 e 21 (p<0,01) dias e entre os 7 e 42 dias (p<0,05). Aos 21 dias a área de osso neoformado foi maior para o grupo β-TCMP que para o grupo β-TCP, embora sem diferença significativa. Aos 42 dias observou-se situação inversa, onde o grupo β-TCP apresentou maior área de neoformação óssea que o grupo β-TCMP.

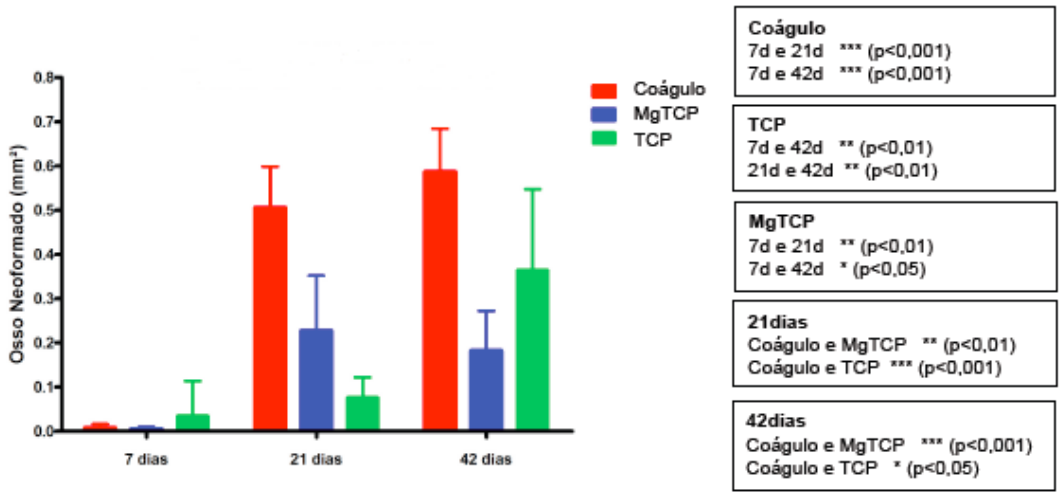


Figura V.19 . Área de osso neoformado (mm^2) nos grupos coágulo (controle), β-TCMP (MgTCP) e β-TCP (TCP), aos 7, 21 e 42 dias.

TAVARES (2012) avaliou a variação da concentração de cálcio, fósforo e magnésio em função do tempo de imersão de pastilhas de β-TCP e de β-TMCP em meios de cultura não completo e completo (adição de soro fetal bovino) em condição estática. Observou que entre 7 e 21 dias houve precipitação de cálcio e de fosfato sobre a pastilha de β-TCP, enquanto que para o β-TCMP ocorreu, inversamente, liberação de cálcio, e menor precipitação de fosfato. A liberação de magnésio das pastilhas de β-TCMP foi crescente no período estudado.

A liberação do magnésio, além da maior liberação de Ca, pelas pastilhas de β-TCMP pode favorecer sua bioatividade, conceito recentemente associado à disponibilidade de íons no meio favorecendo a deposição óssea por osteoblastos na região do implante (GUTH *et al.*, 2011). SADER *et al.* (2009) e CAI *et al.* (2010) observaram que a presença de íons Mg em pastilhas de β-TCP e de fluorapatita, respectivamente, induziu maior adesão de osteoblastos em comparação a pastilhas sem Mg. Acredita-se que o Mg contribui para a adesão celular sobre a superfície do biomaterial ao atuar sobre as integrinas existentes na membrana celular. Os íons Mg^{2+} fazem a conexão entre as células e a superfície do material, acelerando a adesão, proliferação e diferenciação celular e, consequentemente, a formação óssea (CAI *et al.*, 2010).

Neste estudo, portanto, o Mg presente nos grânulos de TCP pode ter contribuído para elevar a adesão celular, explicando a maior área de osso observada aos 21 dias no grupo β-TCMP. Entre os dias 21 e 42 o processo de dissolução superficial pode ter contribuído para a saída do Mg (além do cálcio e do fosfato), gerando mudanças nas características físico-químicas do material que deixariam de otimizar a adesividade das células osteoprogenitoras, explicando a área menor de osso neoformado observada aos 42 dias, em comparação ao grupo β-TCP.

Na figura V.20 observa-se redução da área do biomaterial β-TCMP ao longo dos 7, 21 e 42 dias. O mesmo ocorreu com o biomaterial β-TCP, sendo que a diminuição foi significativa entre os dias 21 e 42 ($p<0,05$). Tal resultado é compatível com o observado na figura V.19, onde a área de osso neoformado no grupo β-TCP foi significativamentre maior aos 42 dias, uma vez que o biomaterial é substituído por tecido ósseo.

Sabe-se que a redução da área do biomaterial enxertado resulta dos processos de dissolução e de fagocitose pelas células inflamatórias (macrófagos e células gigantes) e osteoclastos.

Os grânulos de β-TCP sofreram maior reabsorção que os grânulos de β-TCMP, tanto aos 7 ($p<0,05$) como aos 42 dias ($p<0,001$), indicando que a incorporação do magnésio pode ter influenciado a reabsorção do biomaterial.

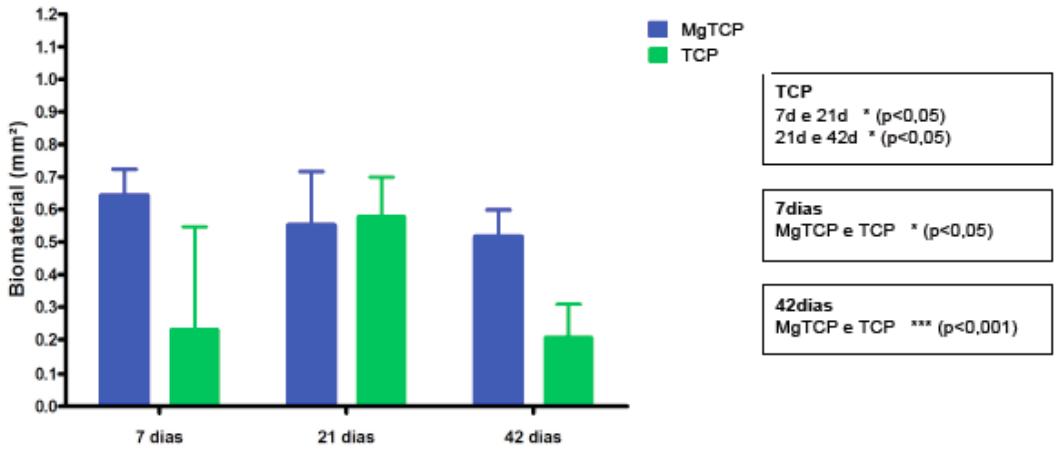


Figura V.20. Área de biomaterial (mm^2) nos grupos MgTCP (β-TCMP) e TCP (β-TCP), aos 7, 21 e 42 dias.

A adesão dos macrófagos e células gigantes multinucleadas à superfície do implante é mediada pela camada proteica adquirida previamente. Portanto, a interação entre as proteínas adsorvidas e os receptores das células inflamatórias constitui o principal sistema de reconhecimento dos enxertos sintéticos. ANDERSON *et al.* (2007) demonstraram que a composição química da superfície exerce influência sobre o comportamento dos macrófagos (adesão, secreção de citocinas, fusão, apoptose).

A incorporação do magnésio também pode ter modificado as propriedades físicas do material. Estudos recentes (TAVARES, 2012) comprovaram maior solubilidade de pastilhas de β-TCP quando comparadas a pastilhas de β-TCMP.

V.2.3 Quantificação do RANK-L, OPG, OC, ON e PTH

V.2.3.1 RANK-L

O nível plasmático de RANK-L (figura V.21A) aos 7 dias foi menor no grupo que recebeu enxerto de β-TCMP, quando comparado aos níveis detectados nos grupos β -TCP e controle, podendo indicar menor atividade osteoclástica naquele grupo. Aos 21 dias o grupo β-TCP apresentou o dobro da quantidade de RANK-L que os grupos β-TCMP e controle ($p<0,05$), significando possivelmente maior número de osteoclastos participantes do processo de reabsorção, o que é corroborado pelas observações feitas na histomorfometria, onde a área do β-TCP foi menor que a do β-TCMP para o mesmo período (figura V.20). No 42^{o} dia, o teor de RANK-L detectado foi semelhante nos 3 grupos.

No grupo controle os níveis de RANK-L mantiveram-se estáveis nos 3 tempos estudados, mostrando que na ausência do biomaterial, não há necessidade de atividade osteoclástica intensa. No grupo β-TCMP verificou-se aumento gradativo da quantidade de RANK-L circulante ao longo dos períodos de tempo analisados. O estudo indicou, portanto, comportamento distinto do RANK-L para cada um dos grupos observados.

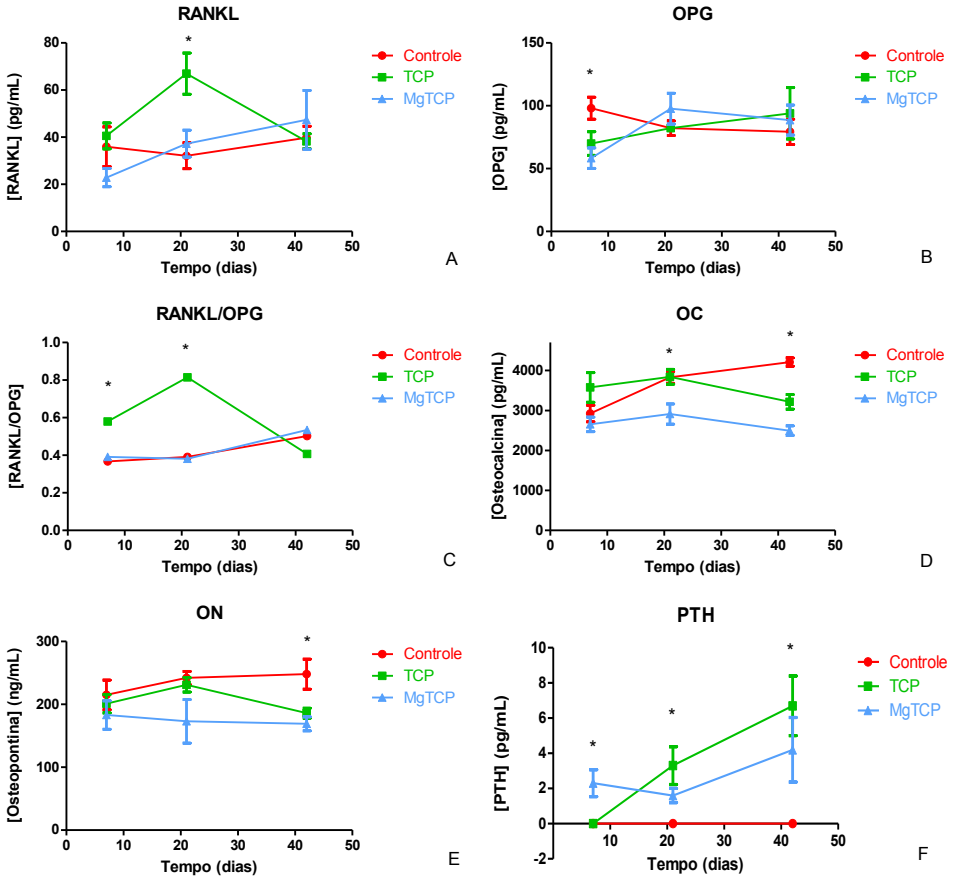


Figura V.21. Nível de RANK-L (A), osteoprotegerina (B), RANK-L/OPG (C), osteocalcina (D), osteopontina (E) e paratormônio (F) analisados aos 7, 21 e 42 dias nos grupos controle, β-TCP(TCP) e β-TCMP (MgTCP).

V.2.3.2 Osteoprotegerina

Aos 7 dias foi detectada quantidade maior de OPG (figura V.21B) no grupo controle ($p<0,05$) em comparação aos grupos β-TCP e β-TCMP. A maior disponibilidade de OPG no grupo controle para fazer ligação com os receptores de membrana RANK das células da linhagem osteoclástica, impedindo a diferenciação dos osteoclastos, pode ter contribuído para menor processo de reabsorção, o que significa dizer que houve maior atividade osteoclástica nos grupos experimentais no período observado. No dia 21, os grupos controle e β-TCP mostraram níveis semelhantes de OPG, ligeiramente menores que os apresentados pelo grupo β-TCMP. O cenário foi similar no 42º dia, onde os níveis da OPG foram parecidos nos grupos experimentais e ligeiramente maiores que o do grupo controle.

No grupo controle o teor plasmático de OPG decresceu ao longo dos períodos observados. No grupo β-TCP o comportamento da OPG foi inverso, ou seja, houve

aumento gradativo. No grupo β-TCMP houve aumento da quantidade de OPG detectada no 21º dia, mas sem significância estatística.

V.2.3.3 RANK-L /OPG

A figura V.8C mostra a razão RANK-L / OPG. É possível observar que no grupo controle a relação RANK-L / OPG apresentou ligeira elevação ao longo dos tempos cirúrgicos em razão da redução dos níveis da OPG (figura V.21B). A curva correspondente ao grupo β-TCMP foi idêntica à do grupo controle. Houve redução do nível da OPG (figura V.21B) associada ao aumento da quantidade de RANK-L (figura V.21A). A atividade osteoclástica possivelmente aumentou suave e gradativamente ao longo do período estudado, de maneira similar, nos grupos controle e β-TCMP. O grupo β-TCP, no entanto, a relação RANK-L / OPG foi maior aos 7 e 21 dias ($p<0,05$) quando comparada aos grupos controle e β-TCMP, devido ao maior teor de RANK-L (figura V.21A). Neste período houve, portanto, maior ativação osteoclástica, resultando em maior reabsorção do biomaterial, principalmente no 7º dia de experimento (figura V.20). No 42º dia, houve redução drástica da razão RANK-L / OPG devido ao aumento dos níveis da OPG e diminuição do RANK-L.

V.2.3.4 Osteocalcina

No dia 7, o nível de osteocalcina circulante (figura V.21D) foi maior no grupo β-TCP que nos grupos controle e β-TCMP, podendo significar que atividade maior dos osteoclastos naquele grupo possibilitou a liberação da OC para a circulação sanguínea, o que é condizente com os níveis maiores de RANK-L (gráfico V.21A) e de RANK-L / OPG (figura V.21C) verificados no grupo β-TCP no mesmo período experimental. No 21º dia, os índices de OC foram maiores nos grupos β-TCP e controle, em comparação ao grupo β-TCMP ($p<0,05$). Tal resultado é corroborado pelo maior teor de RANK-L no grupo β-TCP aos 21 dias (figura V.21A). Aos 42 dias a taxa sanguínea de OC foi maior no grupo controle quando comparada aos demais grupos ($p<0,05$). Esta observação não pode ser correlacionada aos níveis de RANK-L e OPG, que foram semelhantes para os 3 grupos neste tempo experimental.

O grupo controle mostrou aumento significativo da quantidade de OC ao aos 21 e 42 dias, em concordância com a redução dos níveis da OPG e aumento da relação RANK-L / OPG.

Tal observação é condizente com a intensa neoformação óssea verificada na análise histológica, significando que os osteoblastos, além de elaborar a matriz óssea, também produziram a osteocalcina. Ainda, o aumento expressivo da produção de osteocalcina pode ter correlação com o nível elevado de osteopontina observado aos 42 dias no grupo controle (figura V.21E). Sabe-se que a osteopotina esti mula a produção de osteocalcina pelos osteoblastos (ALFORD, HANKENSON, 2006).

No grupo β-TCP houve aumento discreto da OC entre os dias 7 e 21. No dia 42 observou-se queda da taxa de OC. Os resultados estão de acordo com os obtidos para RANK-L e RANK-L / OPG, que indicam a intensidade da atividade dos osteoclastos nos períodos analisados. O nível de OC no soro dos animais que tiveram β-TCMP enxertados e seus alvéolos dentários manteve-se relativamente estável nos períodos estudados. Esta constatação condiz com a razão RANK-L / OPG constante (figura V.21C) nas 3 fase do experimento.

V.2.3.5 Osteopontina

O nível sérico da ON (figura V.21E) aos 7 dias foi similar nos 3 grupos. A ON detectada pode ter sido liberada da matriz óssea mineralizada, após processo de reabsorção mediada pelos osteoclastos. Neste sentido, os níveis séricos semelhantes da ON observados aos 7 dias nos 3 grupos não apresentaram correlação bem estabelecida com os índices de RANK-L / OPG (gráfico V.21C), que foi maior para o grupo β-TCP. Por outro lado, sabe-se que a ON está presente na inflamação aguda e crônica, onde pode ser expressa pelas células endoteliais, macrófagos e células-T (MAZALI *et al.*, 2002). Assim, pode-se especular que aos 7 dias, as células inflamatórias também contribuíram para estabelecer o nível final da ON no sangue. No 21^{o} dia, a quantidade de ON circulante foi semelhante nos grupos controle e β-TCP e maior que no grupo β-TCMP. Houve correlação entre o nível maior de ON e de RANK-L / OPG (gráfico V.21C) no grupo β-TCP. No grupo controle, a quantidade mais elevada de ON pode ter tido colaboração das células endoteliais, macrófagos e células-T. No dia 42, o grupo controle mostrou maior nível de ON que os demais grupos ($p<0,05$). Tal constatação não está em sintonia com o teor de RANK-L / OPG (gráfico V.21C), que foi semelhante para os 3 grupos no dia 42. Aqui, novamente, a ON quantificada pode ter sido originária principalmente das células envolvidas no processo inflamatório.

Os níveis de ON, de maneira geral, foram mais elevados no grupo controle, tanto aos 7, 21, como aos 42 dias. No grupo β-TCP, a quantidade de ON mostrou ligeira elevação no 21º dia. O nível da ON no grupo β-TCMP reduziu suave e gradualmente dos 7 aos 42 dias, o que pode ser explicado pelo nível igualmente crescente da RANK-L e/ou pela redução da intensidade da reação inflamatória.

V.2.3.6 Paratormônio

No dia 7, não foi possível detectar PTH nas amostras de sangue dos animais dos grupos controle e β-TCP, diferentemente do grupo β-TCMP, que apresentou quantidade elevada de PTH ($p<0,05$) (figura V.21F). No 21º dia, o teor plasmático do PTH aumentou no grupo β-TCP, ficando maior que os grupos controle ($p<0,05$) e β-TCMP. No dia 42 o nível de PTH no grupo β-TCP elevou quase 3 vezes mais, onde a diferença para o grupo controle foi igualmente significante ($p<0,05$).

O PTH não foi detectado nas amostras de sangue dos animais do grupo controle, em nenhum dos 3 tempos cirúrgicos. Pode-se especular que o nível sérico de cálcio destes animais estivesse normal ou aumentado, caso contrário haveria PTH circulante determinando a reabsorção óssea para elevar o teor de cálcio no sangue. Isso provavelmente deve-se ao fato de estarem normais os níveis de cálcio sanguíneos. A ausência de PTH poderia explicar a manutenção dos baixos níveis de RANK-L observada ao longo do experimento no grupo controle. No grupo β-TCMP o PTH estava presente em quantidades variáveis nos 3 momentos analisados, porém as diferenças não tiveram significância estatística. O grupo β-TCP, no entanto, apresentou resultado altamente significativo, pois o nível do PTH detectado saiu do zero no dia 7, passou para 3pg/mL no dia 21 e mais que dobrou no 42º dia, com diferença estatisticamente significante ($p<0,05$) para o grupo controle nos 2 últimos tempos do experimento. O biomaterial implantado no alvéolo dos animais, ao sofrer processo de biorreabsorção, de alguma forma contribuiu para estimular a produção do PTH. O efeito catabólico do PTH é explicado por sua habilidade em promover a diferenciação de osteoclastos a partir dos progenitores hematopoiéticos circulantes. Este efeito é mediado por efeito estimulatório do hormônio sobre a síntese o RANK-L pelos osteoblastos, que sabidamente possuem receptores para o PTH (MA *et al.*, 2001, JILKA *et al.*, 2010).

Se no grupo β-TCP, no 21º dia de experimento havia elevada quantidade de PTH circulante, este PTH conectou-se aos receptores de membrana dos osteoblastos,

que elevaram a produção de RANK-L (figura V.21A). O RANK-L, então, ligou-se aos receptores dos pré-osteoclastos, que diferenciaram-se em osteoclastos. Possivelmente estes osteoclastos contribuíram para a maior reabsorção dos grânulos do material observada aos 42 dias (figura V.20). Ao considerar-se que o biomaterial reabsorvido é substituído por osso neoformado, a maior área de formação óssea observada no grupo II aos 42 dias (figura V.19) também está em concordância com tais observações.

VI CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo animal utilizado neste estudo consistiu da extração do incisivo de ratos Wistar e preenchimento do alvéolo com os grânulos de β-TCP e de β-TCMP. Sabe-se que o alvéolo dentário se caracteriza por ser uma ferida que sofre regeneração espontânea, ou seja, é completamente preenchido por tecido ósseo por volta do 28º dia (VERONESE *et al*., 2005). Tal modelo permitiu, portanto, observar o efeito de material estranho (biomaterial), num período de tempo curto - 42 dias (mas ainda assim maior que os 28 dias necessários para a regeneração fisiológica), sobre a cicatrização. Por este motivo, os resultados histomorfométricos observados no grupo controle (que não recebeu nenhum tipo de biomaterial) no que diz respeito à densidade de volume de tecido conjuntivo, infiltrado inflamatório e osso neoformado foram sempre melhores que os verificados nos grupos experimentais.

Um dos objetivos da presente pesquisa foi avaliar a degradação do β-TCP e do β-TCMP, que resulta dos processos de dissolução fisicoquímica e de reabsorção pelos macrófagos, células gigantes e osteoclastos. Neste sentido, o tempo de observação experimental (42 dias) não foi suficiente para acompanhar integralmente o resultado de tais processos. A luminometria de fluxo identificou níveis elevados de paratormônio e RANK-L nas amostras de sangue dos animais que receberam grânulos de β-TCP, aos 21 e 42 dias. Novamente, o tempo pode não ter sido suficiente para que houvesse a diferenciação dos osteoclastos estimulada pelos níveis aumentados de paratormônio e de RANK-L.

Um modelo animal alternativo ao aqui utilizado é o defeito crítico em calvária de rato. O defeito crítico é definido como o defeito ósseo de menor tamanho que não regenera espontaneamente e em ratos corresponde a um defeito de 8mm de diâmetro. Este modelo possibilita, portanto, abordagem diferente, visto que tem sido utilizado para testar a capacidade osteogênica dos mais diversos materiais (COOPER et al., 2010). O maior tempo de observação exigido por este modelo permitiria acompanhar melhor o processo de degradação dos grânulos de β-TCP e de β-TCMP

O fosfato tricálcico do tipo beta, por ser mais solúvel que a hidroxiapatita, é uma opção interessante de biomaterial por ser degradado dentro do defeito ósseo

simultaneamente à neoformação óssea, ou seja, o defeito é regenerado completamente por material biológico. Por esse motivo o β-TCP é indicado para a implantação em áreas livre de tensão mecânica, tais como preenchimento de defeitos ósseos.

O β-TCP comercial é, na verdade, uma apatita cálcio deficiente, pois apresenta razão Ca/P 1,5 , menor que a razão estequiométrica de 1,67 da hidroxiapatita de cálcio pura ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). Devido ao caráter não estequiométrico, as apatitas cálcio deficientes sempre contem outros íons. O conteúdo depende da composição química das soluções utilizadas para o preparo. Neste trabalho adicionou-se cloreto de magnésio hexahidratado ($MgCl_2.6H_2O$) ao hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) e ácido fosfórico (H_3PO_4), obtendo-se, assim βTCMP onde íons cálcio foram substituídos pelos íons magnésio.

O magnésio pode ser incorporado na fase sólida da HA, o que foi demonstrado claramente pela difração de raio X. BERTONI *et al.* (1998), com base nos valores das constantes da rede e o conteúdo relativo de Mg na fase sólida, sugeriram que somente parte do Mg substitui o cálcio, o remanescente é adsorvido na superfície do cristal. Sabendo que o Mg incorporado na estrutura do cristal gera contração e estabilização da rede, pode-se teorizar que o Mg adsorvido à superfície desprende-se muito mais facil e rapidamente para o meio que o Mg no interior da rede.

Os íons Mg^{2+} incorporados, por possuirem raio atômico menor que o do cálcio, geram alterações estruturais no cristal da apatita, que sofre redução nos parâmetros de rede. As modificações ocorrem a nível da célula unitária e podem ser analisadas sob dois aspectos. Por um lado, a contração da rede estabiliza a fase do TCP, deixando-a menos solúvel que o β-TCP. De fato, os grânulos de β-TCP implantados no alvéolo dos ratos sofreram comprovadamente maior dissolução que os de β-TCMP, aos 7 e 42 dias de experimento. Por outro lado, o Mg introduz defeitos na estrutura apatítica que podem favorecer a degradação do material e saída de íons Ca^{2+} e $(PO_4)^{2-}$, além do próprio Mg^{2+}. Assim, pode-se especular que no grupo experimental III, os grânulos de β-TCMP liberaram maior quantidade de íons cálcio, magnésio e fosfato, mesmo tendo sofrido menor dissolução. O processo de solubilização do biomaterial, no entanto, não é contínuo, ocorre também a precipitação de íons (cálcio e fosfato, principalmente) até que haja equilíbrio entre o meio circundante fisiológico e a superfície do biomaterial.

Os produtos resultantes da dissolução e biorreabsorção dos grânulos de β-TCP e de β-TCMP são estranhos ao hospedeiro e estimulam resposta inflamatória. Embora a remodelação óssea seja um evento localizado, a biologia óssea contribui grandemente para a fisiologia do organismo como um todo (KARSENTY, FERRON, 2012). Portanto, além da indução do aumento da produção do PTH pelos grânulos de TCP e seu efeito localizado sobre a reabsorção do material, é importante enfatizar seus possíveis efeitos sistêmicos. Na osteoporose pós-menopausa, por exemplo, a deficiência do estrogênio leva a aumento contínuo dos níveis séricos do PTH que, ao estimular a síntese de RANK-L, aumenta a reabsorção óssea. A implantação de β-TCP e de β-TCMP em pacientes osteoporóticos deve, portanto, ser criteriosamente avaliada.

VII CONCLUSÕES

- A difração de raios X e espectometria no infravermelho por transformada de Fourier confirmaram a obtenção de β-TCMP a partir da rota escolhida.

- Análise histológica revelou, nos animais dos grupos experimentais, neoformação óssea precedida de processo inflamatório difuso, indicando que β-TCP e β-TCMP são biocompatíveis e osteocondutores.

- Os grânulos de β-TCP sofreram reabsorção ao longo do período experimental.

- O β-TCP induziu aumento significatico do paratormônio circulante, que possivelmente foi o responsável pelo aumento do nível de RANK-L.

VIII SUGESTÕES FUTURAS

- Avaliar morfometricamente a presença de osteoclastos, macrófagos e células gigantes do tipo corpo estranho nas áreas de enxertia do biomaterial, correlacionando com os níveis séricos de PTH e RANK-L.

- Avaliar o efeito do aumento do PTH circulante sobre o esqueleto de animais que receberam enxerto de β-TCP e de β-TCMP.

- Avaliar em animais osteoporóticos o efeito do aumento do nível sérico do PTH decorrente da implantação de β-TCP e de β-TCMP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFORD, A.I., HANKENSON, K.D., 2006, “Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration”, Bone, v. 38, pp. 749–757

ANDERSON, J.M., RODRIGUEZ, A., CHAN, D.T., 2007, “Foreign body reaction to biomaterials”, Semin Immunol, v. 20, n. 2, pp. 86-100.

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

BANDYOPADHYAY, A., SHELDON, B., WEICHANG, X., SUSMITA, B., 2006, “Calcium Phosphate-Based Resorbable Ceramics: Influence of MgO, ZnO, and SiO2 Dopants”. J. Am. Ceram. Soc., v. 89, n. 9, pp. 2675–2688.

BERTONI, E., BIGI, A., COJAZZI, G., GANDOLFI, M., PANZAVOLTA, S., ROVERI, N., 1998, “Nanocristals of magnesium and fluoride substituted hydroxyapatite”, J Inorg Biochem, v. 72, n. 1-2, pp. 29-35.

BLAIR, H.C., ZAIDI, M., 2006, “Osteoclastic differentiation and function regulated by old and new pathways”, Rev Endocr Metab Disord, v. 7, pp. 23-32.

BONEWALD, L.F., JOHNSON, M., 2008, “Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling”, Bone, v. 42, n. 4 (April), pp. 606–615.

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., VENKATRAMAN, S.S., ZENG, X.T., DU, H.J., MONDAL, D., 2010, “Osteoblastic cell response on fluoridated hydroxyapatite coatings: the effect of magnesium incorporation”, Biomed Mater, doi:10.1088/1748-6041/5/5/054114.

CHAU, A.M., MOBBS, R.J., 2009, “Bone graft substitutes in anterior cervical discectomy and fusion”, Eur Spine, v. 18, pp. 449-464, doi: 10.1007/s00586-008-0878-4.

CHAZONO, M., TANAKA, T., KITASATO, S., KIKUCHI, T., MARUMO, K., 2008, “Electron microscopic study on bone formation and bioresorption after implantation of b-tricalcium phosphate in rabbit models”, J Orthop Sci, v. 13, pp. 550–555 /DOI 10.1007/s00776-008-1271-1.

COOPER, G.M., MOONEY, M.P., GOSAIN, A.K., CAMPBELL, P.G., LOSEE, J.E., HUARD, J. 2010, “Testing the critical-size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect”, Plast Reconstr Surg, v. 125, n. 6, pp. 1685-1692.

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

DAVIES, J.E., 2003, “Understanding Peri-implant Endosseous Healing”, J Dental Education, v. 67, n. 8, pp. 932-949.

DENHARDT, D.T., GUO, X., 1993, “Osteopontin: a protein with diverse functions”, The FASEB Journal, v. 7, (Dec), pp. 1475-1482.

DIMITRIOU, R., JONES, E., MCGONAGLE, D., GIANNOUDIS, P.V., 2011, “Bone regeneration: current concepts and future directions”, BMC Medicine, http://www.biomedcentral.com/1741-7015/9/66.

DOROZHKIN, S.V., 1997, “Calcium orthophosphates”, J Mat Sci, v.42, pp.1061-1095.

DOROZHKIN, S.V., EPPLE, M., 2002, “Biological and medical significance of calcium phosphates”, Angew Chem Int Ed, v. 41, p. 3130-3146.

DOROZHKIN, S.V., 2010, “Calcium orthophosphates as bioceramics: state of the art”, J Funct Biomater, v. 1, p. 22-107.

ENDERLE, E.F., GÖETZ-NEUNHOEFFER, F., GÖBBELS, M., MÜLLER, F.A., GREIL, P., 2005, “Influence of magnesium doping on the phase transformation temperature of B-TCP ceramics examined by Rietveld refinement”, Biomaterials, v. 26, p. 3379-3384.

ERIKSEN, E.F., 2010, “Cellular mechanisms of bone remodeling”, Rev Endocr Metab Disord, v. 11, pp. 219–227.

FAWCET, W.J., HEXBY, E.J., MALE, D.A., 1999, “Magnesium, physiology and pharmacology”, British J Anaesthesiology, v. 83, n.2, pp. 302-320.

FERRON, M., WEI, J., YOSHIZAWA, T., DELFATORE, A., DEPINHO, R.A., TETI, A., DUCY, P., KARSENTY, G., 2010, “Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism”, Cell, v. 142, n. 2 (July), pp. 296-308.

GALLAGHER, J.C., SAI, A.J., 2010, “Molecular Biology of Bone Remodeling: Implication for new therapeutics targets for Osteoporosis”, Maturitas, v. 65, n. 4 (April), pp. 301-307.

GIANNOUDIS, P.V., DINOPOULOS, H., TSIRIDIS, E., 2005, “Bone substitutes: an update”, Injury, Int J Care Injured, v. 36S, pp. S20-S27.

GUTH, K. 2011, “Effects of serum protein on ionic exchange between culture medium and microporous hydroxyapatite and silicate-substituted hydroxyapatite”, J Mat Sci Mat Med, v. 22, n. 10, pp. 2156-2164.

GUYTON, A.C., HALL, J.E., 2002, *Tratado de Fisiologia Médica*. 10 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

HOEPPNER, L.H., SECRETO, F.J., WESTENDOF, J.J., 2009, “Wnt Signaling as a Therapeutic Target for Bone Diseases”, Expert Opin Ther Targets, v. 13, n. 4 (April), pp. 485–496.

ILAN, I.I., LADD, A.L., 2003, “ Bone graft substitutes”, Operative Techiniques in Plastic and Reconstr Surg, v. 9, n. 4, p. 151-160.

JANEWAY, C.A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHICK, M.J., 2007, *Imunobiologia – O sistema imune na saúde e na doença*, 6 ed. São Paulo, Artmed.

JILKA, R.L., 2007, "Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH", Bone, v. 40, n. 6 (Jun), pp. 1434–1446.

JILKA, R.L., O'BRIEN, C.A., BARTELL, S.M., WEINSTEIN, R.S., MANOLAGAS, S.C., 2010, "Continuous Elevation of PTH Increases the Number of Osteoblasts via Both Osteoclast-Dependent and -Independent Mechanisms", Journal of Bone and Mineral Research, v. 25, n. 11 (Nov), pp 2427–2437.

KAMITAKAHARA, M., OHTSUKI, C., MIYAZAKI, T., 2008, "Review paper: behaviour of ceramic biomaterials from tricalcium phosphate in physiological condition", J Biomater Appl, v. 23, n. 3, p. 197-212.

KANNAN, S., GÖETZ-NEUNHOEFFER, F., NEUBAUER, J., REBELO A.H.S., VALÉRIO, P., FERREIRA, J.M.F., 2008, "Rietveld structure and *in vitro* analysis on the influence os magnesium in biphasic (hydroxyapatite and β-tricalcium phosphate) mixtures", J Biomed Materials Res Part B: Appl Biomat, v. 90B, p. 404-411.

KARSENTY, G., FERRON, M. 2012, "The contribution of bone to whole-organism physiology", Nature, v. 18, n. 481, pp. 314-320.

KHOSLA, S., 2001, " Minireview: The OPG/RANKL/RANK System", Endocrinology, v. 142, n. 12 (Dec), pp. 5050–5055.

KIM, S.R., LEE, J.H., KIM, Y.T., RIU D.H., JUNG, S.J., LEE, Y.J., CHUNG, S.C., KIM, Y.H., 2003, "Synthesis of Si, Mg substituted htdroxyapatites and their sintering behaviours", Biomaterials, v. 24, n. 8 (April), p. 1389-1398.

KIM, Y.S., PAIK, I.Y., RHIE, Y.J., SUH, S.H., 2010, "Integrative Physiology: Defined Novel Metabolic Roles of Osteocalcin", J Korean Med Sci, v. 25, pp. 985-991.

KRAMER, I., HALLEUX, C., KELLER, H., PEGURRI, M., GOOI, J.H., WEBER, P.B., FENG, J.Q., BONEWALD, L.F., KNEISEL, M., 2010, "Osteocyte Wnt/B-Catenin Signaling Is Required for Normal Bone Homeostasis", Molecular and Cellular Biology, (June), p. 3071–3085.

KWON, Y.H., KWON, O.W., KIM, H.I., KIM, K.H., 2003, “Nd: YAG ablation and acis resistance of enamel”, Dent Mater J, v. 22, pp. 404-411.

LANDI, E., LOGROSCINO, G., PROIETTI, L., TAMPIERI, A., SANDRI, M., SPRIO, S., 2008, “Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour”, J Mater Sci: Mater Med, v. 19, p. 239-247.

LANDRY, C.S., RUPPE, M.D., GRUBBS, E.G., 2011, “Vitamin D receptors and Parathyroid Glands”, Endocrine Practice, v. 17 (Suppl 11), (March/April), pp. 63-68.

LEE, D., SFEIR, C., KUMTA, P.N., 2008, “Novel in situ synthesis and characterization of nanostructured magnesium substituted β-tricalciumphosphate (β-TCMP)”, Mater Sci Eng, doi:10.1016/j.msec.2008.05.017

LEGEROS, R.Z., LIN, S., ROHANIZADEH, R., MIJARES, D., LEGEROS, J.P., 2003, “Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications”, J Mater Sci Mater Med, v. 14, n. 3, pp. 201-209.

LI, X., ITO, A., SOGO, Y., WANG, X., LEGEROS, R.Z., 2008, “Solubility of Mg-containing b-tricalcium phosphate at 25^{o}C”, Acta Biomaterialia, doi: 10.1016/j.actbio.2008.06.010

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

MA, Y.A., CAIN, R.L., HALLADAY, D.L., YANG, X., ZENG, Q., MILES, R.R., CHANDRASEKHAR, S., MARTIN, T.J., ONYIA, J.E., 2001, “Catabolic Effects of Continuous Human PTH in Vivo Is Associated with Sustained Stimulation of RANKL and Inhibition of Osteoprotegerin and Gene-Associated Bone Formation”, Endocrinology v. 142, pp. 4047–4054.

MALAVAL, L., WADE-GUEYE, N.M., BOUDIFFA, M., FEI, J., ZIRNGIBL, R., CHEN, F., LAROCHE, N., ROUX, J.P., BURT-PICHAT, B., DUBOEF, F., BOIVIN, G., JURDIC, P., LAFAGE-PROUST, M.H., AMEDEE, J., VICO, L., ROSSANT, J., AUBIN, J.E., 2008, “Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and

osteoclastogenesis", J Exp Med, v. 205, n.5, pp. 1145-1153.

MARCHI, J., DANTAS, A.C.S., GREIL, P., BRESSIANI, J.C., BRESSIANI, A.H., MÜLLER, F.A., 2007, "Influence of Mg-substitution on the physicochemical properties of calcium phosphate powders". Mat Res Bulletin, v.42, p.1040-1050.

MAZALI, M., KIPARI, T., OPHASCHAROENSUK, V., WESSON, J.A., JOHNSON, R., HUGHES, J., 2002, "Osteopontin: a molecule for all seasons",Q J Med, v. 95, pp. 3-13.

MIYAZAKI, M., TSUMURA, H., WANG, J., ALANAY, A., 2009, "An update on bone substitutes for spinal fusion", Eur Spine, v. 18, pp. 783-799, doi: 10.1007/s00586-008-0878-4.

MOTYLA, K.J., MCBEA, LR., SCHWARTZ, A.V., 2010, "Bone and Glucose Metabolism: A Two-Way Street", Arch Biochem Biophys, v. 503, n. 1 (Nov), pp. 2–10.

OKAZAKI, M., LEGEROS, R.Z., 1992, "Crystallographic and chemical properties of Mg-containing apatites before and after suspension in solutions", Magnes Res, v. 5, pp. 103-108.

REN, F., LENG, Y., XIN, R., GE, X., 2010, "Synthesis, characterization and ab initio stimulation of magnesium-substituted hydroxyapatite", Acta Biomaterialia, v. 6, p. 2787-2796.

RYU, H.S., HONG, K.S., LEE, J.K., KIM, D.J., LEE, J.H., CHANG, B.S., LEE, D., LEE, C.K., CHUNG, S.S., 2004, "Magnesia-doped HA/b-TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility". Biomaterials, v.25, p.393-401.

SADER, M., LEGEROS, R.Z., SOARES, G.A., 2009, "Human osteoblasts adhesion and proliferation on magnesium-substituted tricalcium phosphate dense tablets", J Mat Sci Mat Med, v. 20, n. 2 (Fev), p. 521-527.

SECK, T., DIEL, I., BISMAR, H., ZIEGLER, R., PFEILSCHITER, J., 2001, "Serum parathyroid hormone, but not menopausal status, is associated with the expression of osteoprotegerin and RANKL mRNA in human bone samples", European Journal of Endocrinology, v.145, pp. 199-205.

SUCHANEK, W.L., BYRAPPA, K., SHUK, P., RIMAN, R.E., JANASB, V.F., TENHUISEN, K.S., 2004, “Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical–hydrothermal method”, Biomaterials, v. 25, pp. 4647–4657.

TAVARES, D.S. 2012, “Avaliação in vitro do comportamento de células osteoprogenitoras e macrófagos humanos em pastilhas de fosfato tricálcico sem e com magnésio”. Tese de D.Sc. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

VALLET-REGI, M., GONZALEZ-CALBET, J., 2004, “Calcium phosphates as substitution of bone tissues”. Progress in Solid State Chemistry, v. 32, pp.1–31.

VERONESE, R.M., MILANEZI, L.A., OKAMOTO, R., OKAMOTO, T. 2005, “Processo de reparo em ferida de extração dental – interferência da solução anestésica contendo articaína 4% + adrenalina 1:100.000: análise histológica em ratos”, Rev Odontol Araçatuba, v. 26, n. 1, pp. 65-72.

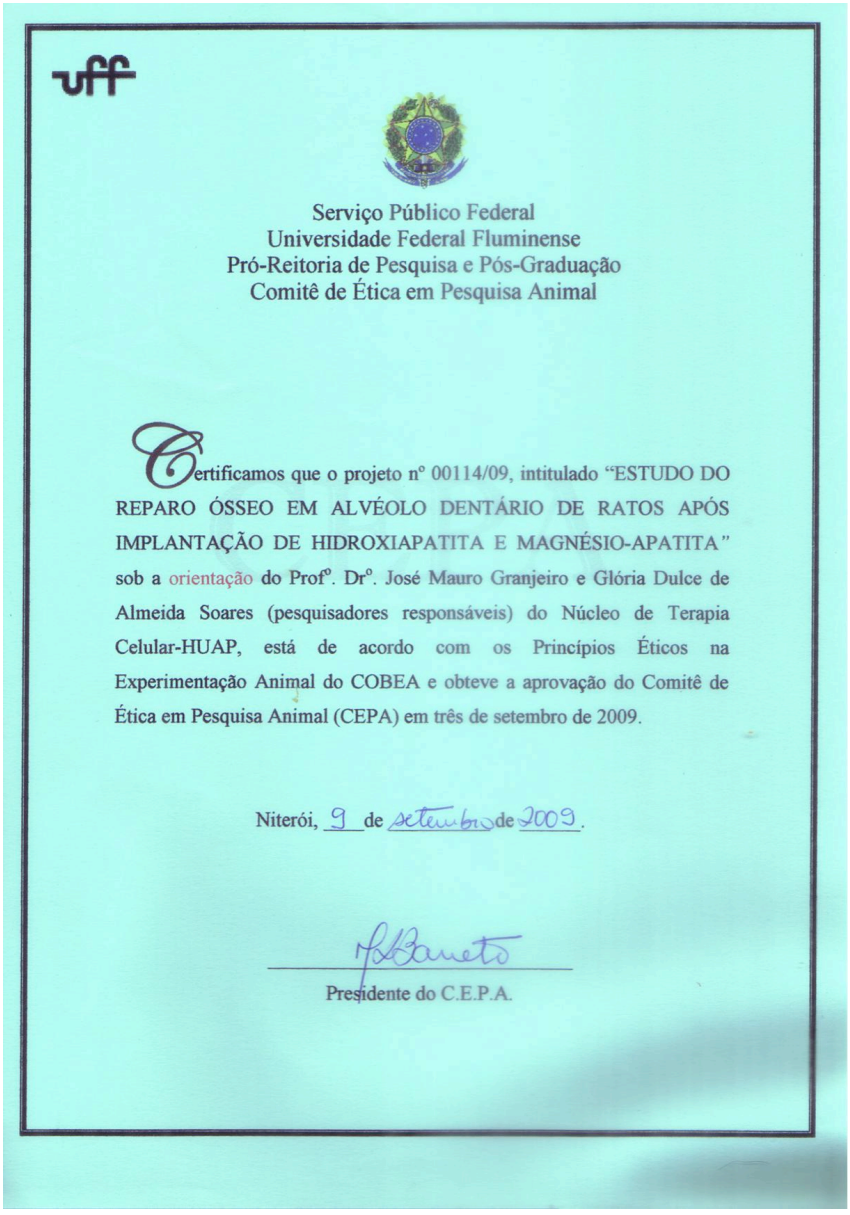
WALKER, C.G., DANGARIA, S., ITO, Y., LUAN, X., DIEKWISCH, T.G.H., 2010, “Osteopontin is Required for Unloading-Induced Osteoclast Recruitment and Modulation of RANKL Expression during Tooth Drift-associated Bone Remodeling, but Not for Super-Eruption”, Bone, v. 47, n. 6 (Dec), pp. 1020–1029.

WEI, J., DUCY, P., 2010, “Co-dependence of bone and energy metabolisms”, Arch Biochem Biophys, v. 503, n. 1 (Nov), pp. 35–40.

ZHANG, X., JIANG, F., GROTH, T., VECCHIO, K.S., 2008, “Preparation, characterization and mechanical performance of dense b-TCP ceramics with/without magnesium substitution”, J Mater Sci Mater Med, v. 19, p. 3063-3070.

ANEXOS

Anexo 1



Serviço Público Federal
Universidade Federal Fluminense
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa Animal

Certificamos que o projeto nº 00114/09, intitulado "ESTUDO DO REPARO ÓSSEO EM ALVÉOLO DENTÁRIO DE RATOS APÓS IMPLANTAÇÃO DE HIDROXIAPATITA E MAGNÉSIO-APATITA" sob a orientação do Profº. Drº. José Mauro Granjeiro e Glória Dulce de Almeida Soares (pesquisadores responsáveis) do Núcleo de Terapia Celular-HUAP, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal do COBEA e obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) em três de setembro de 2009.

Niterói, 9 de setembro de 2009.

Presidente do C.E.P.A.

Anexo 2

SPRINGER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

May 01, 2012

This is a License Agreement between Debora Yassuda ("You") and Springer ("Springer") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	2900361278237
License date	May 01, 2012
Licensed content publisher	Springer
Licensed content publication	Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders
Licensed content title	Molecular regulation of osteoclast activity
Licensed content author	Angela Bruzzaniti
Licensed content date	Jan 1, 2006
Volume number	7
Issue number	1
Type of Use	Thesis/Dissertation
Portion	Figures
Author of this Springer article	No
Order reference number	
Title of your thesis / dissertation	Study of bone repair in rat dental after implantation of beta tricalcuim phosphate and magnesium-substituted BTCP
Expected completion date	Jun 2012
Estimated size(pages)	80
Total	0.00 USD

Anexo 3

RightsLink®

Title: Molecular biology of bone remodeling: Implications for new therapeutic targets for osteoporosis

Author: J. Chris Gallagher,A.J. Sai

Publication: Maturitas

Publisher: Elsevier

Date: April 2010

Copyright © 2010, Elsevier

Logged in as:
Debora Yassuda
Account #:
3000528737

LOGOUT

Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Debora Yassuda ("You") and Elsevier ("Elsevier"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

Get the printable license.

License Number	2917830673122
License date	May 28, 2012
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Maturitas
Licensed content title	Molecular biology of bone remodeling: Implications for new therapeutic targets for osteoporosis
Licensed content author	J. Chris Gallagher,A.J. Sai
Licensed content date	April 2010
Licensed content volume number	65
Licensed content issue number	4
Number of pages	7
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	print
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	portuguese
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	Study of bone repair in rat dental after implantation of beta tricalcuim phosphate and magnesiu-substituted BTCP
Expected completion date	Jun 2012
Estimated size (number of pages)	80
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.0 USD / 0.0 GBP

Anexo 4

J. Funct. Biomater. **2010**, *1*, 22-107; doi:10.3390/jfb1010022
***Journal of* Functional Biomaterials ISSN 2079-4983**
www.mdpi.com/journal/jfb/

Review
Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art
Sergey V. Dorozhkin

Meaning of Open Access

In MDPI's understanding, which is in accordance with major definitions of open access to scientific literature (namely the Budapest, Berlin and Bethesda declarations), *open access* means:

- peer-reviewed literature is freely available without subscription or price barriers,
- literature is immediately released in open access format (no embargo period), and
- published material can be re-used without obtaining permission as long as a correct citation to the original publication is given.

Up to 2008 most articles published by MDPI contained the note "© *year* by MDPI (http://www.mdpi.org). Reproduction is permitted for noncommercial purposes". During 2008 MDPI journals started to publish articles under the Creative Commons Attribution License. However, all articles published by MDPI before and during 2008 should be considered as released under the same Creative Commons Attribution License since 2008.

This means that all articles published in MDPI journals, including data, graphics and supplements, can be linked from outside in, crawled by search engines, re-used by text mining applications or websites, blogs, *etc.* free of charge under the sole condition of proper accreditation of the source and original Publisher. MDPI believes that open access publishing can foster the exchange of research results amongst scientists from different disciplines, thus facilitating interdisciplinary research, whilst providing access to research results to researchers world-wide, including from developing countries, as well as to an interested general public. Although MDPI publishes all of its journals under the open access model, we believe that open access is an enriching part of the scholarly communication process that can and should co-exist with other forms of communication and publication, such as society-based publishing and conferencing activities.

Important Note: some articles (especially *Reviews*) may contain figures, tables or text taken from other publications, for which MDPI does not hold the copyright or the right to re-license the published material. Please note that you should inquire with the original copyright holder (usually the original Publisher or the original authors), if this material can be further re-used.