



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS DOS
ÓRGÃOS E SISTEMAS

MARION ALVES DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ESTRÔNCIO
E DE CÁLCIO NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO CRÍTICO
EM CALVÁRIA DE RATO

Salvador
2010

MARION ALVES DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ESTRÔNCIO
E DE CÁLCIO NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO CRÍTICO
EM CALVÁRIA DE RATO**

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

Orientador: Prof. Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa

Salvador
2010

N244 Nascimento, Marion Alves do
Avaliação dos níveis plasmáticos de estrôncio e de cálcio
na regeneração de defeito crítico em calvária de rato / Marion
Alves do Nascimento - Salvador, 2010.
77 f.: il

Orientador: Prof. Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior
Coorientadora: Prof^a Dr^a. Fabiana Paim Rosa
Dissertação (Mestrado) Universidade Federal da Bahia,
Instituto de Ciências da Saúde, 2010.

1. Engenharia tecidual 2. Materiais biocompatíveis.
3. Regeneração óssea. 4. Estrôncio. 5. Cálcio. I. Universidade
Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. II. Barbosa
Júnior, Aryon de Almeida. III. Título.

CDU: 616.314.17-002

MARION ALVES DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ESTRÔNCIO
E DE CÁLCIO NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO CRÍTICO
EM CALVÁRIA DE RATO**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em de novembro de 2010.

Banca Examinadora

Aryon de Almeida Barbosa Júnior – Orientador _____
Doutor em Medicina pela Universitat Zu Bonn Rheinischen Friedrich Wilhems, Bonn,
Alemanha.
Fundação Oswaldo Cruz.

Ricardo David Couto _____
Doutor em Farmácia pela Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Maria Helena Miguez da Rocha Leão _____
Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
Universidade Federal do Rio de Janeiro.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Aos vinte e nove dias do mês de novembro de dois mil e dez, reuniu-se em sessão pública o Colegiado do Programa de Pós- Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas com a finalidade de apreciar a Defesa de Dissertação da Pós-graduanda **Marion Alves do Nascimento**, através da Comissão Julgadora composta pelos Professores **Aryon de Almeida Barbosa Junior**, **Ricardo David Couto** e **Maria Helena Miguez da Rocha Leão**. O título da Dissertação apresentado foi **AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ESTRÔNCIO E DE CÁLCIO NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATO**. Ao final dos trabalhos os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Prof. Dr. Aryon de Almeida Barbosa Junior Aprovado
Prof. Dr. Ricardo David Couto Aprovado
Profa. Dra. Maria Helena Miguez da Rocha Leão Aprovado

Franqueada a palavra, como não houve quem desejasse fazer uso da mesma lavrou-se a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada por todos.

Salvador, 29 de novembro de 2010.

Prof. Dr. Maria Helena Miguez da Rocha Leão
Prof. Dr. Ricardo David Couto
Profa. Dra. Marion Alves do Nascimento

AGRADECIMENTOS

A nosso pai, Deus, por iluminar sempre meu caminho, guiando-me e protegendo-me em todos os momentos da vida.

A meus pais, Maria de Lourdes e Francisco, pelo apoio incondicional e incentivo em todas as minhas escolhas.

A meus familiares, pelo carinho.

Um agradecimento especial a Rita de Cássia, por compartilhar suas experiências profissionais, com seus ricos conhecimentos, sua inteligência e seu grande entusiasmo pela ciência.

A Arão, pelo carinho, pela paciência, pelos conselhos, incentivos, além de sempre ter estado a meu lado nos momentos mais difíceis desta caminhada.

A minha amiga Maria José, pelo apoio, incentivo e fé.

À Universidade Federal da Bahia, pela implantação deste curso de mestrado.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Professor Roberto Paulo Araújo, pelo empenho e pela dedicação ao crescimento do curso.

Aos Professores Aryon de Almeida Barbosa Júnior e Fabiana Paim Rosa, pela atuação precisa como orientadores, além da paciência e do incentivo.

À FAPESB, pelo auxílio financeiro.

A todos do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da UFBA, onde as análises plasmáticas foram realizadas. Em especial, ao Professor José Antonio Menezes, por ter disponibilizado o laboratório para as análises, a Gustavo, a Sérgio e a Nathália, por todos os auxílios e pela dedicação no preparo das amostras. Aprendi muito com vocês.

Ao Professor Marcos Almeida, porque, além de ter dedicado seu tempo a sanar minhas dúvidas, ampliou meus horizontes como pesquisadora. Sou-lhe extremamente grata.

Ao Professor Alexandre Malta Rossi, pela contribuição no desenvolvimento, no preparo e no fornecimento do biomaterial hidroxiapatita.

Às colegas Isabela Barreto (doutoranda), Ana Clara e Luciana (mestrandas) e aos alunos de iniciação científica Poliana, Manuel e Marcel, pela união, boa convivência, amizade e aprendizagem.

Sou extremamente grata a Isabela Campos, por toda confiança, pelo estímulo e pela força.

A Diogo, pela valiosa contribuição na realização das fotos.

A Júnior, por todo seu saber, dedicação e auxílio.

A Tatiane, pelo auxílio prestado em ceder materiais para o transporte das amostras.

À UNIME, por ter cedido espaço físico e materiais para a realização de plano piloto. Em especial, ao Professor Marcos Borges Ribeiro e ao técnico de laboratório, Anderson, por sua dedicação e paciência.

Aos Professores Hélio Mostarda, Abrahão Baptista e Telma Masuko e aos amigos Priscilla Malafaia e Vladimir, por me ajudarem com orientações e explicações específicas nas suas áreas.

Aos animais, que sempre nos permitem aprender – mesmo sem propósito – a difícil arte da pesquisa.

Como as abelhas reúnem o mel, assim nós tiramos o que há de
mais doce em tudo para o construirmos.

Rainer Maria Rilke, 1998.

NASCIMENTO, Marion Alves do. Avaliação dos níveis plasmáticos de estrôncio e de cálcio na regeneração de defeito crítico em calvária de rato. 77f.il.2010. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

RESUMO

No processo fisiológico de regeneração óssea, o estrôncio, em concentrações plasmáticas adequadas, compartilha e substitui o cálcio, e pode favorecer um melhor remodelamento tecidual. Este trabalho teve como finalidade mensurar os níveis de estrôncio e de cálcio no plasma sanguíneo, durante o reparo de defeito crítico em calvária de rato. Foram utilizados 75 *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, albinos, machos e adultos, distribuídos em cinco grupos (GI, GII, GIII, GIV e GV). Os defeitos críticos foram preenchidos por coágulo sanguíneo (GI e GII), por selante de fibrina (GIII e GV) e por microesferas de hidroxiapatita (GIV e GV). Os animais foram avaliados nos tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias. Aqueles pertencentes ao GI receberam dieta convencional, enquanto os dos demais grupos receberam, por via enteral, dieta pastosa com 900mg/Kg.dia do fármaco ranelato de estrôncio. Após a coleta sanguínea, os animais foram eutanasiados. O estrôncio e o cálcio foram mensurados por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) e espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), respectivamente. Observou-se que as concentrações plasmáticas de estrôncio e de cálcio, em 15 dias, foram, respectivamente: GI – 0,0005/2,5mmol/L; GII – 0,2/2,2mmol/L; GIII – 0,26/2,1mmol/L; GIV – 0,13/2,4mmol/L; GV – 0,24/2,1mmol/L. No período de 45 dias as concentrações obtidas foram: GI – 0,0006/2,5mmol/L; GII – 0,1/2,3mmol/L; GIII – 0,2/2,3mmol/L; GIV – 0,013/2,5mmol/L; GV – 0,1/2,3mmol/L e em 120 dias GI foi de 0,00047/2,4mmol/L; GII – 0,04/2,3mmol/L; GIII – 0,03/2,3mmol/L; GIV – 0,03/2,2mmol/L; GV – 0,03/2,3mmol/L. O grupo que fez uso apenas da hidroxiapatita apresentou menor valor de concentrações de estrôncio estatisticamente significantes ($p < 0,05$) nos tempos de 15 e 45 dias. Na comparação de todos os tempos biológicos, as concentrações plasmáticas de estrôncio foram menores em 120 dias, com diferenças estatisticamente significantes. Conclui-se que a administração de ranelato de estrôncio produziu variações na concentração plasmática dos elementos estrôncio e cálcio. A concentração plasmática de estrôncio aumentou após a administração de ranelato de estrôncio. Dentre os grupos em que houve administração de ranelato de estrôncio, a menor concentração plasmática do estrôncio foi observada no grupo com implantação de hidroxiapatita. Entre os grupos em que houve administração de ranelato de estrôncio, a maior concentração plasmática do cálcio foi observada no grupo com implantação de microesferas de hidroxiapatita.

Palavras-chave: Engenharia tecidual. Materiais biocompatíveis. Regeneração óssea. Estrôncio. Cálcio.

NASCIMENTO, Marion Alves do. Plasma levels evaluation of strontium and calcium in the regeneration of critical defect in rat calvaria. 77f.il.2010. Thesis (Masters) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2010.

ABSTRACT

In the physiological process of bone regeneration, the strontium, in appropriate plasma concentrations, shares, and replaces calcium, and can provide a better tissue remodeling. This study aimed to measure the strontium and calcium concentrations in the blood plasma during the repair of critical defect in the calvaria. 75 *Rattus norvegicus* of Wistar lineage, albino, male and adult, divided into five groups (GI, GII, GIII, GIV and GV) were used. The critical defects were filled with blood clot (GI and GII), by fibrin sealant (GIII and GV) and by hydroxyapatite microspheres (GIV and GV). The animals were evaluated at the biological time of 15, 45 and 120 days. Those belonging to GI received a conventional diet, while the ones in other groups received, by enteric route, pasty diet with 900mg/Kg.day of the strontium ranelate drug. After blood collection, the animals were euthanized. The strontium and calcium were measured by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) and flame atomic absorption spectrometry (FAAS), respectively. It was observed that plasma levels of strontium and calcium, in 15 days were respectively: GI – 0,0005/2,5mmol/L; GII – 0,2/2,2mmol/L; GIII – 0,26/2,1mmol/L; GIV – 0,13/2,4mmol/L; GV – 0,24/2,1mmol/L. In the period of 45 days, the obtained concentrations were: GI – 0,0006/2,5mmol/L; GII – 0,1/2,3mmol/L; GIII – 0,2/2,3mmol/L; GIV – 0,013/2,5mmol/L; GV – 0,1/2,3mmol/L and in 120 days GI was 0,00047/2,4mmol/L; GII – 0,04/2,3mmol/L; GIII – 0,03/2,3mmol/L; GIV – 0,03/2,2mmol/L; GV – 0,03/2,3mmol/L. The group that had only hydroxyapatite showed less strontium concentration statistically significant value ($p < 0,05$) in 15 and 45 days. In comparing all the times biological, the plasma concentrations of strontium were lower in 120 days with significant statistical differences. It is concluded that the administration of strontium ranelate produced variations on the plasma concentration of the elements strontium and calcium. The plasma concentration of strontium increased after the administration of strontium ranelate. Among the groups where strontium ranelate was administered, the smallest plasma concentration of strontium was observed in the group with hydroxyapatite implantation, and the largest plasma concentration of calcium was observed in the group with microspheres of hydroxyapatite implantation.

Keywords: Tissue Engineering. Biocompatible materials. Bone regeneration. Strontium. Calcium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	1	Estrutura química do ranelato de estrôncio	27
Figura	2	Mecanismo de ação do ranelato de estrôncio	28
Figura	3	Mecanismo de ação do cálcio	32
Figura	4	Microesferas de hidroxiapatita.....	37
Figura	5	Caracterização da HA por meio da DRX	37
Figura	6	Caracterização da HA por meio da FTIR	38
Figura	7	Imagem da HA por meio da MEV	39
Figura	8	Selante de fibrina (Tissucol [®])	39
Figura	9	Ranelato de estrôncio (Protos [®])	40
Figura	10	Procedimento cirúrgico na calvária dos animais: (A) Tricotomia; (B) Antissepsia; (C) Incisão; (D) Exposição da calvária intacta; (E) Provocação do defeito crítico; (F) Defeito crítico; (G) Colocação do biomaterial; (H) Sutura	44
Figura	11	Técnica de coleta das amostras: Punção cardíaca	45
Figura	12	Materiais de coleta das amostras: Tubos de coleta a vácuo com heparina sódica, adaptador e agulha	46
Figura	13	Aparelho de Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite	47
Figura	14	Aparelho de Espectrometria de Absorção Atômica com Chama.....	48
Figura	15	Concentrações plasmáticas do estrôncio entre os grupos, no tempo biológico de 15 dias	52
Figura	16	Concentrações plasmáticas do cálcio entre os grupos, no tempo biológico de 15 dias	53

Figura	17	Concentrações plasmáticas do estrôncio entre os grupos, no tempo biológico de 45 dias	55
Figura	18	Concentrações plasmáticas do cálcio entre os grupos, no tempo biológico de 45 dias	56
Figura	19	Concentrações plasmáticas do estrôncio entre os grupos, no tempo biológico de 120 dias	58
Figura	20	Concentrações plasmáticas do cálcio entre os grupos, no tempo biológico de 120 dias	59

LISTA DE TABELAS

Tabela	1	Distribuição de animais de acordo com os grupos e tempos biológicos (dias)	41
Tabela	2	Grupos e concentrações do estrôncio no tempo biológico de 15 dias	51
Tabela	3	Grupos e concentrações do cálcio no tempo biológico de 15 dias	53
Tabela	4	Grupos e concentrações do estrôncio no tempo biológico de 45 dias	54
Tabela	5	Grupos e concentrações do cálcio no tempo biológico de 45 dias	56
Tabela	6	Grupos e concentrações do estrôncio no tempo biológico de 120 dias	57
Tabela	7	Grupos e concentrações do cálcio no tempo biológico de 120 dias	59
Tabela	8	Comparação das concentrações plasmáticas do estrôncio entre os tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias. q1 e q3 são os quartis correspondentes a 25 e 75% da amostra, respectivamente	60
Tabela	9	Comparação das concentrações plasmáticas do cálcio entre os tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias. q1 e q3 são os quartis correspondentes a 25 e 75% da amostra, respectivamente	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
+ 2	Bivalência
<	Menor que
>	Maior que
≤	Menor ou igual que
®	Marca registrada
µgSr/L	Micrograma de estrôncio por litro
µm	Micrômetro
µmol/dia	Micromol por dia
1,25-DHCC	Hormônio 1,25- diidroxicolecalciferol
2A	Grupo 2A da tabela periódica
Ca ⁺²	Íon de cálcio
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Fórmula estequiométrica da hidroxiapatita
CaR	Receptor sensível de cálcio
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CEUA	Comitê de ética em pesquisa em animais
cm	Centímetro
Ctrl	Controle
d	Dia
Da	Dalton
DRX	Difração de raios X
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
FTIR	Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier
g	Gramas

g/Kg	Gramas por quilo
g/L	Gramas por litro
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
GI	Grupo um
GII	Grupo dois
GIII	Grupo três
GIV	Grupo quatro
GV	Grupo cinco
h	Horas
HA	Hidroxiapatita
HNO ₃	Ácido nítrico
L/min	Litro por minutos
M	Molar
mA	Miliampere
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mg	Elemento químico magnésio
mg	Miligrama
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg/Kg	Miligrama por quilo
mg/Kg.dia	Miligrama quilograma dia
mg/L	Miligrama por litro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol/Kg.dia	Milimol/quilograma dia
mmol/L	milimol por litro
mmol/Sr.dia	Milimol de estrôncio dia
nm	Nanômetro

nmol/Kg.dia	Nanomol/quilograma dia
°C	Graus Celsius
PTH	Paratormônio
q1	Primeiro quartil
q3	Terceiro quartil
rpm	Rotação por minuto
SF	Selante de fibrina
Sr	Elemento químico estrôncio
Sr ⁺²	Íon de estrôncio
Sr ⁸⁴	Isótopo de estrôncio estável 84
Sr ⁸⁶	Isótopo de estrôncio estável 86
Sr ⁸⁷	Isótopo de estrôncio estável 87
Sr ⁸⁸	Isótopo de estrôncio estável 88
Sr ⁸⁹	Isótopo de estrôncio radioativo 89
Sr ⁹⁰	Isótopo de estrôncio radioativo 90
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
µg/L	Micrograma por litro
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	BIOMATERIAIS	21
2.2	ESTRÔNCIO	23
2.2.1	Histórico	23
2.2.2	Química do estrôncio	24
2.2.3	Fisiologia do estrôncio	25
2.2.4	Mecanismo de ação do estrôncio no osso	26
2.3	CÁLCIO	30
3	OBJETIVOS	33
3.1	GERAL	34
3.2	ESPECÍFICOS	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	BIOMATERIAIS	36
4.2	FÁRMACO	40
4.3	ANIMAIS	40
4.4	TÉCNICA CIRÚRGICA	42
4.5	COLETA DAS AMOSTRAS	45
4.6	ANÁLISE LABORATORIAL	46
4.6.1	Dosagem de estrôncio	46
4.6.2	Dosagem de cálcio	48
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5	RESULTADOS	50
5.1	COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO ESTRÔNCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 15 DIAS ...	51
5.2	COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO CÁLCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 15 DIAS	52
5.3	COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO ESTRÔNCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 45 DIAS ...	54
5.4	COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO CÁLCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 45 DIAS	55
5.5	COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO	

	ESTRÔNCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 120 DIAS .	57
5.6	COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO CÁLCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 120 DIAS	58
5.7	COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO ESTRÔNCIO E DO CÁLCIO ENTRE OS TEMPOS BIOLÓGICOS DE 15, 45 E 120 DIAS	60
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXOS	76
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)	77

1 INTRODUÇÃO

Recentes avanços na área da Bioengenharia Tecidual têm possibilitado o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de biomateriais que se destacam em função do seu comportamento biológico e da adesão aos tecidos ósseos, os quais enfatizam sua atuação na regeneração óssea (ZAMBUZZI *et al.*, 2006).

Os biomateriais são materiais utilizados em tecidos vivos, para restaurar ou substituir tecidos danificados (NAGEM FILHO *et al.*, 2007). Podem possuir várias formas de apresentação (pó, grânulos, pastas, microesferas, dentre outros). As microesferas podem ser utilizadas em procedimentos de cirurgias minimamente invasivas, como um sistema injetável em defeitos ósseos e possibilitam um aumento na velocidade de regeneração tecidual. Os cerâmicos, dentre os diferentes tipos de materiais, têm sido amplamente estudados e aplicados na clínica como recursos regenerativos, substitutos de enxertos de osso autógeno (KAWACHI *et al.*, 2000; LEGEROS, 2002).

Um grande desafio da pesquisa atual reside em produzir biocerâmicas comerciais biodegradáveis com características físico-químicas e morfológicas tais que, quando implantadas nas regiões lesadas, estimulem a osteogênese. Dessa forma, irão propiciar a formação de estruturas semelhantes à dos elementos da matriz extracelular, a mobilização, expansão e integração de populações de células regenerativas (NAGEM FILHO *et al.*, 2007). Uma das principais cerâmicas usadas em aplicações clínicas que visam à regeneração óssea é a hidroxiapatita (HA). Essa substância possui composição química $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ que se mostra similar à fase mineral dos tecidos calcificados e pode ser sintetizada com relativa facilidade em laboratório; além de apresentar excelente biocompatibilidade, bioatividade e osteocondução, ela é capaz de se ligar quimicamente ao osso. Alguns metais, como o estrôncio, podem ser acrescentados à estrutura da HA com o escopo de potencializar a regeneração óssea. Isso ocorre porque o estrôncio é incorporado pelas apatitas biológicas, substituindo o cálcio. Mediante a influência do plasma sanguíneo, a superfície de uma cerâmica bioativa induz a biomineralização da HA, que interage com a superfície do implante, após sua inserção em defeitos teciduais, caracterizando a primeira fase da HA (ANDRADE & DOMINGUES, 2006).

Outro recurso também utilizado pela bioengenharia tecidual é o selante de fibrina, um polímero natural que tem sido usado na produção dos compósitos de biomateriais, para regeneração óssea. Dessa forma, é necessário que o biomaterial esteja bem aderido ao tecido-alvo e, para isso, na tentativa de resolver essa condição, o selante de fibrina vem sendo aplicado como agente aglutinante (OSATHANON *et al.*, 2008). Vale salientar que, após o

contato com metais pesados, como o estrôncio, o selante de fibrina pode ter a sua ação diminuída (INFARMED, 2007).

O estrôncio é um metal alcalino terroso pouco investigado na área biomédica. Entretanto, o interesse por esse metal cresceu após o desenvolvimento da droga ranelato de estrôncio como agente antiosteoporótico. Essa droga é um sal de ácido ranélico divalente, com dois íons de estrôncio estável por molécula, que age simultaneamente no metabolismo da reabsorção e da estimulação da formação óssea com ação dose-dependente (BOONEN, 2006; GEOFFROY *et al.*, 2010). Desse modo, baixas concentrações desse fármaco estimulam a formação óssea, por meio de uma ação mediada por células, com foco de atuação em células progenitoras. Em altas concentrações, esse fármaco leva a uma mineralização deficiente, devido a uma interferência na diferenciação osteoblástica (VERBERCKMOES; BROE & D'HAESE, 2003). O ranelato de estrôncio tem sido administrado a pacientes com osteoporose e, em baixas concentrações (0,19 - 0,40%), é capaz de estimular a formação e a mineralização óssea, através do aumento de níveis plasmáticos de Ca^{+2} e Sr^{+2} (DAGANG; KEWEI & YONG, 2008; VERBERCKMOES; BROE & D'HAESE, 2003; MARIE *et al.*, 1985). Além disso, administrado por via enteral, também pode influenciar os níveis plasmáticos de outros minerais, como o magnésio (Mg) e o fosfato (MARIE *et al.*, 1985).

O cálcio é um elemento essencial para todos os seres vivos, sendo o elemento metálico mais abundante no corpo humano. A maior parte do cálcio (90%) está armazenada nos ossos, mas ele também é encontrado nas células e no sangue. O nível normal de cálcio no plasma humano é de 2,2 a 2,6mmol/L (8,8 a 10,4mg/dL), mas a sua concentração como íon (Ca^{+2}) é 1,2mmol/L. Quando necessário, o Ca^{+2} desloca-se dos ossos para o sangue, para manter a sua concentração sérica. Entretanto, a mobilização excessiva do Ca^{+2} dos ossos acarretará alteração no metabolismo geral do cálcio (PINTO, 2008).

Nos fluidos biológicos, o estrôncio e o cálcio apresentam diversos graus de ligação a proteínas plasmáticas e séricas. Ambos competem pelas proteínas presentes no soro e no plasma sanguíneo, além de compartilharem propriedades químicas e fisiológicas similares. Alterações dos níveis desses elementos podem estar relacionadas a processos bioquímicos e fisiológicos, especialmente aqueles envolvidos no metabolismo e na reparação óssea. Isso reveste o estudo desses elementos de grande importância clínica. Nesse sentido, o objetivo geral deste trabalho foi mensurar os níveis plasmáticos de Sr^{+2} e Ca^{+2} durante o reparo de defeito ósseo preenchido com biomaterial em microesferas cerâmicas de HA e selante de fibrina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A utilização de alguns biomateriais implantados no osso contribui para o favorecimento de uma troca iônica dos elementos cálcio e estrôncio.

2.1 BIOMATERIAIS

A Bioengenharia Tecidual, por ser um campo multidisciplinar em expansão, visa a desenvolver, mimetizadamente, tecidos e órgãos, de modo a recuperar ou substituir a função dos tecidos e órgãos naturais (ARRIBANÇA & CARDOSO, 2009). A bioengenharia tecidual associa conhecimentos de grandes áreas da ciência, como a biologia e a engenharia, que são aplicados atualmente na medicina reparadora. Diversos tipos de biomateriais de origem biológica ou sintética são utilizados na prática da bioengenharia com o objetivo de melhorar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo.

Geralmente, os biomateriais são divididos em classes de acordo com suas características físico-químicas, tais como: metais, ligas, compósitos, polímeros, cerâmicas *etc.* Mas, podem ser também categorizados de acordo com a resposta que produzem no tecido vivo. Portanto, apresentam características que os categorizam como materiais biologicamente inertes, bioativos, biomiméticos e biocompatíveis (MEROLLI & THOMAS, 2009). A característica de biocompatibilidade é não induzir respostas teciduais ou imunológicas adversas (NAGEM FILHO *et al.*, 2007).

As primeiras pesquisas sobre o uso de materiais cerâmicos como biomateriais foram iniciadas por Albee em 1930, utilizando uma cerâmica de fosfato tricálcico para regenerar um defeito ósseo. Contudo, somente 50 anos depois é que começaram a aparecer diferentes tipos de cerâmicas de fosfato de cálcio – como materiais implantáveis –, para a aplicação na medicina e na odontologia (COSTA *et al.*, 2009).

Uma variedade de biomateriais – polímeros naturais e cerâmicos – está sendo usada para produzir arcabouços sintéticos. Eles agem como um guia e estimulam o crescimento do tecido (COSTA *et al.*, 2007), promovendo adesão, proliferação e diferenciação celular, muitas vezes mimetizando as propriedades histológicas da matriz extracelular (MEROLLI & THOMAS, 2009). Tais características possibilitam que os biomateriais se associem com

moléculas sinalizadoras, envolvidas no controle do crescimento e da diferenciação celular, e que façam parte de um grupo distinto de fatores indutores que podem incluir células de sustentação e mecanismo de ação com propriedades de osteoindução, osteocondução, osteointegração e regeneração (NAGEM FILHO *et al.*, 2007; TEIXEIRA, 2009).

Os biomateriais diferem na sua origem (biógena ou sintética), composição (biovidros, alumina, hidroxiapatita, betatricalcio – fosfato, fosfato de cálcio bifásico), forma física (particulados, blocos, cimentos *etc.*) e pelas propriedades físico-químicas (NAGEM FILHO *et al.*, 2007). Dentre essas disposições, destaca-se a de composição, especificamente a hidroxiapatita, por ser o principal constituinte da fase inorgânica do osso. Devido à sua similaridade com o tecido ósseo, a HA é um dos mais conhecidos materiais biocerâmicos que propicia a proliferação de fibroblastos e osteoblastos. Portanto, na sua forma sintética, torna-se substituta de osso humano em implantes dentários, por apresentar propriedades de osteointegração, excelente biocompatibilidade, bioatividade e osteocondução (COSTA *et al.*, 2009).

A descoberta de que osteoblastos podem crescer em revestimento de hidroxiapatita artificial melhorou significativamente a possibilidade de se obter uma resposta favorável à implantação de um biomaterial. Os osteoclastos parecem ser também capazes de reabsorver a hidroxiapatita (MEROLLI & THOMAS, 2009). Dessa forma, esse biomaterial reproduz o processo fisiológico de aposição e remoção que ocorre no osso vivo.

As biocerâmicas, principalmente a HA, têm sido vastamente utilizadas na clínica, em virtude da semelhança estrutural, química e física com a matriz mineral óssea. Esse biomaterial possui várias formas de apresentação (pó, grânulos, pastas, microesferas, dentre outros), sendo que a apresentação na forma de microesferas pode ser utilizada como um sistema injetável em cirurgias minimamente invasivas em defeitos ósseos, possibilitando, portanto, um aumento na velocidade de regeneração tecidual. Vale salientar que, dentre os diferentes tipos de materiais, os de tipo cerâmico têm sido amplamente estudados e aplicados na clínica como recursos regenerativos, substitutos de enxertos de osso autógeno (LEGEROS, 2002; KAWACHI *et al.*, 2000).

As microesferas de biocerâmicas podem ter composição variada, embora, uma alteração na estrutura cristalina da hidroxiapatita pela adição de íons de estrôncio promova alterações físico-químicas no biomaterial (TERRA *et al.*, 2009). Alguns estudos revelam que há maior deposição dos íons de estrôncio em regiões de maior metabolismo, o que aumenta a atividade osteoblástica e interfere nos mecanismos de maturação e remodelação óssea (TIAN

et al., 2009; WANG & YE, 2008). Portanto, o Sr^{+2} – como um constituinte inorgânico do tecido ósseo –, quando associado à hidroxiapatita, é capaz de promover regeneração óssea (TIAN *et al.*, 2009).

É necessário, para que o biomaterial se aproprie de suas funções favoráveis, que ele esteja bem aderido ao tecido-alvo e permaneça estabilizado durante a sua aplicação no defeito. Na tentativa de resolver essa limitação, o selante de fibrina tem sido muito utilizado, por ser um polímero natural que entra na produção dos compósitos de biomateriais para regeneração óssea. Ademais, o selante de fibrina auxilia na cicatrização por induzir angiogênese e promover proliferação celular, podendo fornecer, por isso, um ambiente mais condutor para regeneração do osso de forma acelerada (DUSSE *et al.*, 2008; OSATHANON *et al.*, 2008). Em cirurgias, os selantes de fibrina são muitos utilizados no controle da homeostase e na atuação em suturas (TREDWELL *et al.*, 2006).

2.2 ESTRÔNCIO

O estrôncio tem se tornado atrativo para a prevenção e tratamento da osteoporose.

2.2.1 Histórico

O estrôncio foi descoberto em 1790, mas só foi isolado em forma impura em 1808 por Sir Humphrey Davy. O nome faz referência à cidade escocesa *Strontian* porque nela se encontram altas concentrações desse elemento em rochas de apatitas naturais (CABRERA *et al.*, 1999). O seu uso na medicina foi primeiramente descrito pela *Squire's Companion to the British Pharmacopoeia* em 1884. O estrôncio foi usado em combinação com outros compostos, tais como o salicilato, no tratamento de várias doenças como no câncer, diante de uma base puramente empírica e sem conhecimento detalhado de sua ação. Além disso, outros fatores – como a falta de entendimento de suas propriedades, o desconhecimento dos seus

efeitos adversos e tóxicos na clínica e a associação indevida do estrôncio radioativo com o do estrôncio estável – contribuíram para que o estrôncio fosse esquecido gradativamente e caísse em descrédito. Possivelmente, por causa dessa situação, o trabalho inicial de Shorr & Carter e de McCaslin & Janes sobre os efeitos benéficos do estrôncio estável no tratamento da osteoporose pós-menopausa não recebeu atenção suficiente, mas o seu primeiro uso na osteoporose foi em 1950 (SKORYNA, 1981; TOURNIS; ECONOMOPOULOS & LYRITIS, 2006).

2.2.2 Química do estrôncio

O estrôncio pertence ao grupo 2A da tabela periódica com número atômico 38, apresenta massa molecular de 87,620 Da (LLINAS *et al.*, 2006) e é considerado o 15º elemento químico em abundância na crosta terrestre, onde é encontrado em concentrações de até 450mg/Kg. É um dos constituintes de apatitas naturais, nas quais a concentração do metal pode chegar a 73g/Kg. Em água do mar é o elemento-traço mais abundante, alcançando valores de 8mg/L. Em águas naturais é encontrado em concentrações que variam de 0,021mg/L até 0,375mg/L. É um dos constituintes naturais de alimentos e bebidas, sendo que carne, aves, vegetais e frutas contêm baixas concentrações desse elemento, variando de 0,3 a 5,1mg/Kg, enquanto que, em cereais, pode estar em concentrações de até 25mg/Kg. O teor do elemento na dieta humana varia de acordo com a área geográfica e o tipo de alimento consumido (CABRERA *et al.*, 1999).

O estrôncio reage rapidamente com água e oxigênio. Portanto, é encontrado apenas na natureza no estado de oxidação (+ 2). Na sua forma natural, não é radioativo e existe em quatro formas isotópicas estáveis: Sr⁸⁴ (0,6%), Sr⁸⁶ (9,9%), Sr⁸⁷ (7,0%) e Sr⁸⁸ (82,6%). Além disso, vinte e dois isótopos radioativos são conhecidos. Os mais importantes são Sr⁸⁹ e Sr⁹⁰, os quais são formados durante operações de reatores e explosões nucleares (WHO, 2010).

2.2.3 Fisiologia do estrôncio

Considerado um elemento-traço no ser humano, o estrôncio está distribuído no plasma, fluido extracelular e tecidos moles, mas a sua maior parte está localizada nos ossos e dentes. E o segundo local mais importante é o sangue (CABRERA *et al.*, 1999). As concentrações exatas de estrôncio dentro do microambiente ósseo não são ainda conhecidas. Entretanto, ele se liga preferencialmente ao osso, transferindo-se rapidamente para a superfície de cristais (hidroxiapatita) em curto prazo. Em longo prazo, o Sr^{+2} permuta com o Ca^{+2} no mineral ósseo e permanece ligado ao esqueleto (BLAKE & FOGELMAN, 2005). Uma pequena fração de estrôncio também parece estar incorporada no osso recentemente formado. Durante tratamentos com ranelato de estrôncio, foi observado que concentrações de estrôncio apresentadas no osso podem exceder substancialmente os níveis, aproximadamente, de 0,1mmol, que estão presentes no sangue (BROWN, 2003).

Estima-se que a concentração de estrôncio no sangue humano varia de 27 a 53 $\mu\text{g/L}$ (WHO, 2010). Em animais, a incorporação do estrôncio nos ossos é diretamente relacionada à dose administrada, aos níveis plasmáticos de estrôncio, ao tempo de exposição e à renovação óssea. Evidências experimentais *in vivo* abordam que a administração de estrôncio em doses baixas (4nmol/Kg.dia) atua na reabsorção, aumenta a formação óssea e reduz a perda óssea em modelos animais com osteopenia (UNFER, 2006). Isso sugere que doses controladas de estrôncio podem ter um potencial benéfico no tratamento da osteoporose, pois dados indicam que esse elemento pode inibir, em ratos, a diferenciação pré-osteoclástica em osteoclastos, bem como aumentar a apoptose de osteoclastos em ratos (GRYNPAS *et al.*, 1996; MARIE, 2006).

Marie (2006) destaca que o estrôncio apresenta papel semelhante ao do cálcio, pois quimicamente são similares e, desse modo, induzem efeitos significantes nas células ósseas. Nielsen (2004) salienta, em relação ao mecanismo homeostático controlado por hormônios (principalmente o paratormônio e a calcitonina), que estes influenciam no equilíbrio do cálcio extracelular, embora não haja confirmação se o mesmo acontece para o estrôncio. Todavia existem diferenças comportamentais desses elementos nos processos fisiológicos no que diz respeito à contração muscular, coagulação sanguínea, absorção gastrintestinal, excreção renal, transferência placentária e secreção mamária. Unfer (2006) & Nielsen (2004) registram um menor grau de participação do estrôncio na contração muscular e na coagulação sanguínea. Tournis; Economopoulos & Lyritis (2006) ressaltam que, na concorrência desses elementos

no trato gastrointestinal, há uma menor absorção do estrôncio no intestino em razão do átomo deste ser maior do que o do cálcio; como também, pelo mesmo motivo, nos túbulos renais há uma menor reabsorção do estrôncio, sendo sua *clearance* três vezes maior do que a do cálcio.

O trato gastrointestinal representa a principal via de entrada do estrôncio no organismo. Os seus mecanismos de transporte por meio da parede do intestino têm sido reconhecidos, mas não demonstrados (CABRERA *et al.*, 1999). O Sr^{+2} pode ser absorvido completamente por difusão passiva. Além da via gastrointestinal, a absorção do elemento pode também acontecer pela via pulmonar e tegumentar (WHO, 2010). O rim é a principal via de excreção.

De um modo geral, de acordo com Flórez (1998), cerca de 75% dos diversos fármacos administrados por via enteral sofrem metabolizações ao passarem pelo fígado. Entretanto, o estrôncio, por ser considerado um cátion divalente, não é metabolizado no fígado; logo não inibi as enzimas do citocromo P450 (CORTINA & LOPES, 2008). Estas são pertencentes a uma superfamília de heme-proteínas as quais são distribuídas em todos os seres vivos e estão envolvidas no metabolismo de uma variedade de compostos quimicamente diferentes; destacando-se, assim, dentre diversos sistemas enzimáticos responsáveis pelo processo de metabolismo.

Diante da sua farmacocinética, a biodisponibilidade absoluta do estrôncio se aproxima de 25%, depois de administrado em uma dose oral de 2g em forma de granulado dissolvido em água. As concentrações plasmáticas máximas são alcançadas de 3 a 5 horas depois de uma dose única de 2g (*id*). Devido à sua lenta absorção, deve-se evitar a ingestão de cálcio antes e durante a administração do estrôncio (LI *et al.*, 2009). Nos fluidos biológicos, o estrôncio e o cálcio apresentam diversos graus de ligação a proteínas plasmáticas e séricas, porém esta ligação é fraca. Propriedades químicas e fisiológicas são compartilhadas por ambos os elementos.

2.2.4 Mecanismo de ação do estrôncio no osso

O estrôncio, como um composto ranelato, vem sendo utilizado no tratamento da osteoporose pós-menopausa. O ranelato de estrôncio é um sal (diestrôncico de ácido 5- [bi (carboximetil] amino) – 2 – carboxi – 4 – ciano – 3 - tiofenacético) (Figura 1), formado por

uma substância orgânica – o ácido ranélico – e dois átomos de estrôncio estável (CORTINA & LOPES, 2008; BASURTO *et al.*, 2009). Ele é considerado como a primeira droga antiosteoporótica que age simultaneamente na reabsorção e na formação óssea (MARIE, 2006). Outras terapias estão disponíveis para tratar a osteoporose, mas alcançam apenas um dos aspectos da remodelação óssea e apresentam-se como agentes anabólicos ou anticatabólicos. Portanto, os agentes anabólicos, como os análogos do paratormônio, estimulam a osteoformação; e os agentes anticatabólicos, como os bifosfanatos, o raloxifeno, a calcitonina e os estrógenos inibem a reabsorção óssea (TOURNIS, 2007). A maioria dos fármacos disponíveis para o tratamento da osteoporose impede a reabsorção óssea; poucos são os que estimulem a formação do osso.

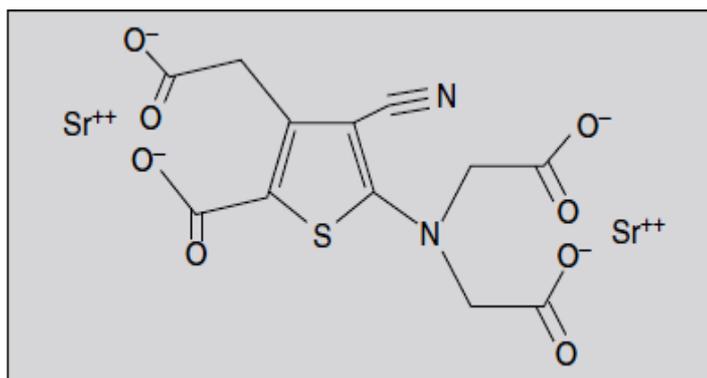


Figura 1 – Estrutura química do ranelato de estrôncio.
Fonte – Eslava, Heras & López *et al.*, 2005.

O ranelato de estrôncio é efetivo em vários estudos clínicos, nos quais tem aumentado a densidade mineral óssea e promovido a redução dos riscos de fraturas vertebrais e não-vertebrais, incluindo as fraturas de quadril em mulheres pós-menopausa, além de melhorar os marcadores circulantes de remodelação óssea (BASURTO, 2009). O mecanismo de ação do ranelato de estrôncio na regeneração óssea ainda não está completamente elucidado (BLAKE & FOGELMAN, 2005; ZAMBURLINI; PEJOVIC´ - MILIC´ & CHETTLE, 2008). Estudos *in vivo* com osteoblastos de ratos e seres humanos têm revelado que o ranelato de estrôncio reduz a diferenciação e a atividade osteoclástica, e, em consequência, também a reabsorção óssea de forma dose-dependente (AMMANN *et al.*, 2007; BASURTO *et al.*, 2009). Ademais,

sua atividade osteoformadora destaca-se pela proliferação dos pré-osteoblastos, o que leva a um aumento da síntese da matriz óssea através dos osteoblastos (Figura 2). Essas provas da ação do ranelato de estrôncio *in vitro* têm sido apoiadas em estudos *in vivo*.

O mecanismo molecular mediante o qual o estrôncio exerce ações nas células ósseas ainda é completamente desconhecido. Alguns estudos indicam que a interação do estrôncio com o receptor sensível ao cálcio (CaR) ou com um novo mecanismo sensível a cátions, distinto do CaR, poderia ser uma das explicações do seu mecanismo de ação (RUIZ *et al.*, 2009). O CaR é um receptor acoplado à proteína G, que exerce um papel essencial na regulação da homeostase do cálcio extracelular.

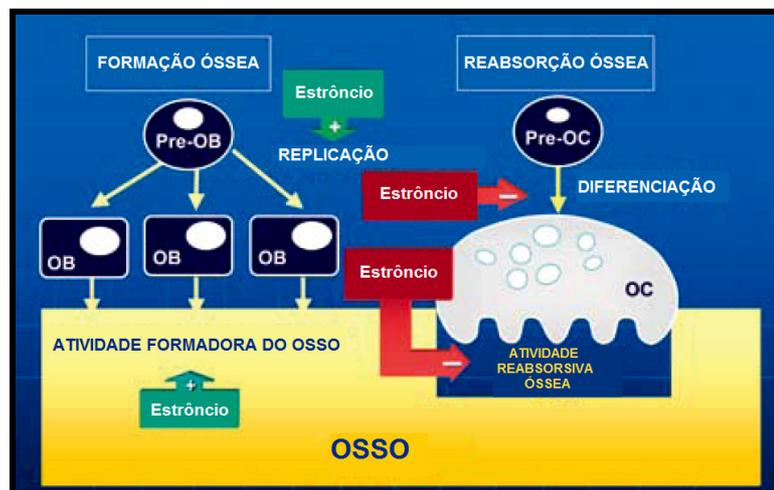


Figura 2 – Mecanismo de ação do ranelato de estrôncio.
Fonte – Adaptado de Cortina & Lopes, 2008.

Fundamentos experimentais indicam que doses terapêuticas de ranelato de estrôncio não alteram a deposição de minerais no osso em todas as espécies estudadas, incluindo a humana (BAZOT; DELANNOY & MARIE, 2002). Por outro lado, indicam também que o efeito seja dose-dependente, pois a administração de baixas quantidades em pacientes com osteoporose tem sido capaz de estimular a formação e a mineralização óssea (VERBERCKMOES; BROE & D'HAESE, 2003; WANG & YE, 2008). O ranelato de estrôncio, em doses de 225 a 900mg/Kg.dia, melhorou a resistência óssea no tratamento de vértebras de ratos (AMMANN; ROBIN & SHEN, 2004), embora tenha sido mostrado que

altas doses de estrôncio na dieta produzem, em animais experimentais jovens, sem suplementação de cálcio, raquitismo temporário. Essa desordem é decorrente da redução na absorção intestinal do cálcio, por conta da inibição na conversão de 25- hidroxicolecalciferol em 1,25 - diidroxicolecalciferol (1,25-DHCC) (GRYNPAS & MARIE, 1990).

A administração prolongada de estrôncio em doses de 1800mg/Kg.dia não produziu efeitos deletérios na mineralização óssea em camundongos. Nesse mesmo estudo, ainda foi observado que a administração de ranelato de estrôncio resultou em diferenças nos animais de acordo com o gênero, pois efeitos mais agudos estavam presentes na formação óssea em camundongos machos e um efeito inibitório na reabsorção em camundongos fêmea (BAZOT & DELANNOY & MARIE, 2002). De acordo com Marie *et al.* (2001), estudos *in vitro* sugeriram que o estrôncio inibiu diretamente o recrutamento e a atividade dos osteoclastos e, conseqüentemente, reduziu a reabsorção. Além disso, o estrôncio aumentou a replicação pré-osteoblástica e a síntese de colágeno, favoráveis ao mecanismo da formação óssea.

Baixas doses de estrôncio, administradas via oral, estimularam, em ratos, a formação óssea sem alterar a reabsorção, mesmo ocorrendo, após quatro semanas de tratamento, hipocalcemia transitória (MARIE *et al.*, 1985). Por outro lado, o tratamento de pacientes osteoporóticos com pequenas doses de estrôncio tem sido bem sucedido em melhorar a densidade óssea vertebral (JANES & McCASLIN, 1959; SHORR & CARTER, 1952). Após um ano de tratamento com ranelato de estrôncio em um grupo de mulheres, autores mostraram que houve redução do número de fraturas de vértebras em 59% e de colo de fêmur em 41% (AMMANN; ROBIN & SHEN, 2004; CEBESOVY *et al.*, 2007). Após três anos de tratamento, a redução foi de 32% para fraturas de vértebras e 31% para fraturas de colo do fêmur. Eslava; Heras & López (2005) destacam que mulheres com osteoporose, ao serem tratadas com carbonato de estrôncio em doses de 6 a 8mmol/Sr.dia, durante 6 meses, apresentaram melhora na formação óssea, o que favorece o aumento da quantidade de osteoblastos e da quantidade da matriz, sem afetar a mineralização do osso.

Estudos realizados por Rocha *et al.* (2005) em camundongos sugeriram que os efeitos do estrôncio no osso dependem da dose e que, mesmo baixas doses (dieta com estrôncio < 4 g/L) podem ocasionar aumento da taxa de formação e da densidade óssea trabecular. Essa observação pode ter aplicações terapêuticas, particularmente em doenças caracterizadas por acelerado processo de remodelamento ósseo e desmineralização. Por outro lado, uma dieta com altas doses de estrôncio (> 4g/L) pode causar hipocalcemia, pela inibição da síntese da 1,25 diidroxicolecalciferol e da absorção intestinal do cálcio, o que afeta o metabolismo

ósseo. Entretanto, nestes mesmos estudos, ao receberem doses intermediárias (3g/L) de estrôncio em água, os camundongos com disfunção renal apresentaram osteomalácia.

A administração de baixas doses ($\leq 4\text{mmol/Kg.dia}$), em ratos tratados com estrôncio, não causou efeitos tóxicos nas células ósseas ou na mineralização óssea; mas, quando foram administradas doses altas (8,75mmol/Kg.dia), o estrôncio em forma de carbonato de estrôncio induziu anormalidades esqueléticas, como raquitismos; defeitos na mineralização; e alterações do perfil mineral, sobretudo em animais com dieta baixa de cálcio (ESLAVA; HERAS & LÓPEZ, 2005). Nesse mesmo estudo, em ratas ovariectomizadas, doses de 0,3 a 1,2mmol/Kg.dia preveniram a perda do osso trabecular. Marie *et al.* (2001) relataram que concentrações equimolares de cálcio e estrôncio podem debilitar seriamente o crescimento de ratos jovens, e que tal efeito é reversível.

2.3 CÁLCIO

O cálcio é um metal alcalino terroso, pertence ao grupo 2A da tabela periódica, apresenta número atômico 20 e peso molecular 40,078 Da. Foi isolado pela primeira vez em 1808, em forma impura, por Sir Humphrey Davy.

O cálcio está armazenado em 90% nos tecidos ósseos e dentários, os quais, junto com o fosfato, formam os cristais de hidroxiapatita, resultando nos componentes inorgânicos e estruturais do esqueleto. Esse mineral ósseo está em constante equilíbrio de troca com o líquido intersticial e, por isso, há um balanço entre reabsorção e formação óssea, o que leva o tecido ósseo à integridade. O nível normal de cálcio no plasma sanguíneo é de 2,2 a 2,6mmol/L (8,8 a 10,4mg/dL), apresentando-se em três formas diferentes: (a) complexado com os ânions citrato e fosfato; (b) ligado às proteínas, principalmente a albumina; e (c) ionizado em uma fração biologicamente ativa, com uma concentração de 1,2mmol/L.

O Ca^{+2} desempenha papel-chave em muitos processos fisiológicos, tais como na manutenção da integridade do esqueleto, na coagulação sanguínea, na contração muscular e na transmissão de impulsos nervosos (SHARAN *et al.*, 2008). Um complexo sistema homeostático (Figura 3) é designado para a manutenção da concentração de Ca^{+2} extracelular,

por meio da secreção de hormônios reguladores de cálcio, como o paratormônio (PTH) e a calcitonina, produzidos, respectivamente, pelas glândulas paratireóides e pela tireóide (GONZÁLEZ & SILVA, 2006). Associado a essa manutenção, o calcitriol (vitamina D ativa) também atua para regular a concentração do Ca^{+2} nos líquidos extracelulares.

O PTH é o principal regulador do metabolismo do cálcio, sendo liberado sempre que o nível plasmático de Ca^{+2} cai abaixo dos limites normais, e sua célula-alvo no tecido ósseo é o osteoclasto, aumentando, assim, a atividade reabsortiva (VERONEZE, 2008). Além dessa função, o PTH também inibe a reabsorção de fósforo no filtrado glomerular, estimula a síntese de calcitriol nos túbulos proximais renais e aumenta indiretamente a reabsorção intestinal do cálcio e do fósforo intestinal. Quando a concentração de Ca^{+2} diminui, a secreção do PTH é estimulada (GASPARINI *et al.*, 2007).

A calcitonina produz efeito oposto, ao participar da homeostase esquelética como reguladora do metabolismo mineral e ósseo, interferindo, assim, na ação do PTH em manter a massa óssea (GUYTON, 1996). Esse processo é devido à ação da calcitonina, que diminui a concentração de cálcio no sangue, tendo sua ação contrária à do PTH o qual aumenta a quantidade de cálcio no sangue. O cálcio extracelular é responsável por diversos processos: manutenção do cálcio intracelular, mineralização óssea, coagulação sanguínea, manutenção do potencial da membrana, contração muscular e pela ação do cálcio, como segundo mensageiro nas atividades enzimáticas e na secreção hormonal (VERONEZE, 2008).

O Ca^{+2} é biologicamente ativo, firmemente regulado por hormônios, e origina-se tanto da absorção no intestino delgado quanto da reabsorção dos ossos, sendo mantido sempre sob um rígido controle homeostático.

O esqueleto tem, ao nascimento, aproximadamente 25g de cálcio e, na idade adulta, cerca de 1200g. Essa diferença na quantidade de cálcio está também condicionada a uma dieta do dia a dia, que mantém o constante processo de reabsorção e formação do tecido ósseo, a fim de que se tenha cálcio disponível para as demais funções do corpo. Afinal, se o organismo não recebe cálcio suficiente na dieta, esse mineral será extraído dos ossos automaticamente (DI BERNARDO *et al.*, 2005).

A homeostase do cálcio depende de algumas variáveis, tais como crescimento, consumo de cálcio, vitamina D e de hormônios (LÓPEZ, 2009). A vitamina D executa um papel-chave para a absorção do cálcio, pois ela forma, nos rins, o hormônio 1,25 -

diidroxicoalciferol (1,25-DHCC), o qual estimula a absorção intestinal do cálcio (VERONEZE, 2008).

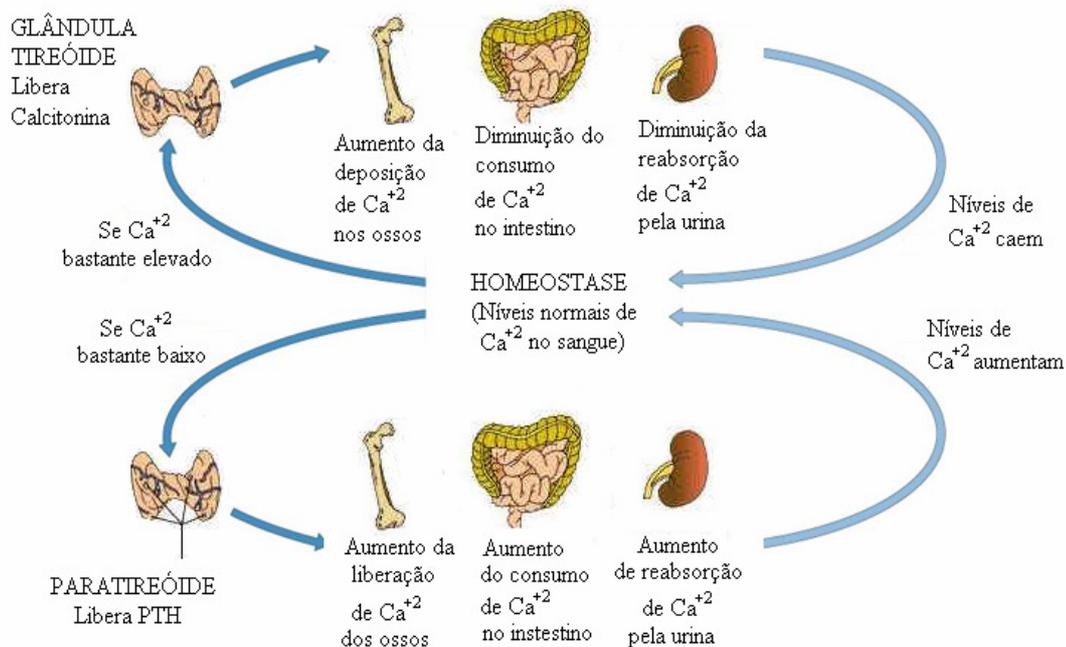


Figura 3 – Mecanismo de ação do cálcio.

Fonte – Elaboração nossa.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Mensurar o estrôncio e o cálcio em amostras de plasma durante a reparação óssea em ratos tratados com ranelato de estrôncio.

3.2 ESPECÍFICOS

Avaliar os níveis plasmáticos do estrôncio durante o reparo de defeito crítico na calvária de rato, preenchido com biomaterial em microesferas cerâmicas de hidroxiapatita e selante de fibrina.

Avaliar os níveis plasmáticos do cálcio durante o reparo de defeito crítico na calvária de rato, preenchido com biomaterial em microesferas cerâmicas de hidroxiapatita e selante de fibrina.

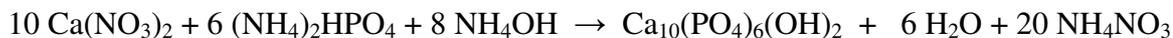
4 MATERIAIS E MÉTODOS

Dentre os procedimentos relatados a seguir, destacam-se os biomateriais, o fármaco, o procedimento cirúrgico e a análise laboratorial do estrôncio e do cálcio.

4.1 BIOMATERIAIS

Foram utilizados dois biomateriais: selante de fibrina (Tissucol[®]) e as microesferas de hidroxiapatita. Estas foram desenvolvidas, preparadas e fornecidas pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

As amostras de hidroxiapatita estequiométrica foram sintetizadas pelo método de precipitação por via úmida com razão molar dos íons $[Ca] + 2/[PO_4] - 3 = 1,67$, em condições reacionais apropriadas à formação de um material com uma única fase cristalina ilustrada pela reação:



A síntese foi realizada a partir da adição de uma solução com íons fosfato a uma solução com íons cálcio em condições reacionais propícias à formação do precipitado.

A solução de nitrato de cálcio 0,2M foi colocada dentro do balão onde foi realizada a reação de precipitação, sob agitação e temperatura de 90°C, sendo então adicionada à solução de fosfato dibásico de amônio com auxílio de uma bomba peristáltica. A mistura permaneceu sob agitação, sob a mesma temperatura, por mais duas horas, para a maturação do precipitado formado, sendo em seguida filtrada em funil de Buckner e lavada por ressuspensão com água Milli-Q a 90°C até se obter pH=7,0 na água de lavagem. O sólido obtido foi seco em estufa a 80°C por 24 horas.

Com o uso de uma única seringa, as microesferas foram formadas com diâmetro entre 250 e 425µm (Figura 4). Após 24 horas de incubação, em temperatura ambiente, estas foram recolhidas com uma peneira apropriada e, então, sinterizadas em rampa de aquecimento até 1100°C.

Antes de serem utilizadas, as microesferas foram preservadas em tubos *ependorfs*, que foram esterilizados em autoclaves a 120°C por 30 minutos.



Figura 4 – Microesferas de hidroxiapatita.
Fonte – Elaboração nossa.

A caracterização da hidroxiapatita foi realizada por meio da difração de raio X (DRX) (Figura 5); espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Figura 6); e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 7).

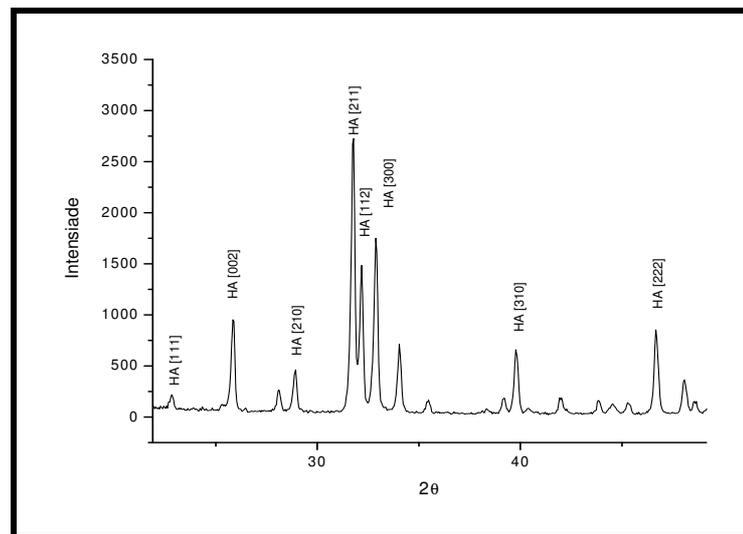


Figura 5 – Caracterização da HA por meio da DRX.
Fonte – CBPF.

A DRX (Figura 5) apresenta os principais picos de uma hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ padrão, de acordo com a ficha padrão PCPDFWIN 09.0432. É possível observar pelo eixo y que a amostra tem picos bem finos e uma alta intensidade, característico de amostra com alta cristalinidade.

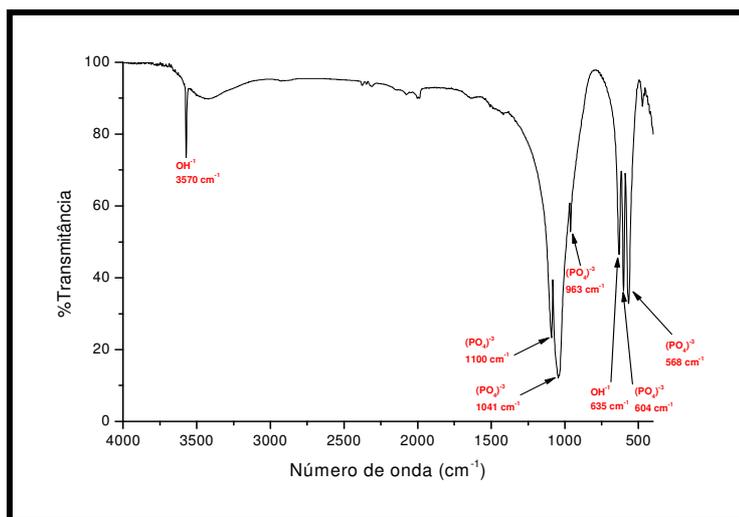


Figura 6 – Caracterização da HA por meio da FTIR.
Fonte – CBPF.

A FTIR (Figura 6) indica os grupos funcionais de uma hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ padrão, com as bandas de vibração apontadas. A largura das bandas indica que a HA após a sinterização tornou-se muito cristalina e que não perdeu nenhuma de suas características elementares. É constituída pelas bandas de OH^- em 3574cm^{-1} e 630cm^{-1} e as bandas de fosfatos nas regiões de 1000cm^{-1} a 1100cm^{-1} e 500cm^{-1} a 600cm^{-1} , respectivamente.

A HA em microscopia eletrônica de varredura (Figura 7) pode ser observada uma morfologia porosa, esférica e de tamanhos homogêneas.

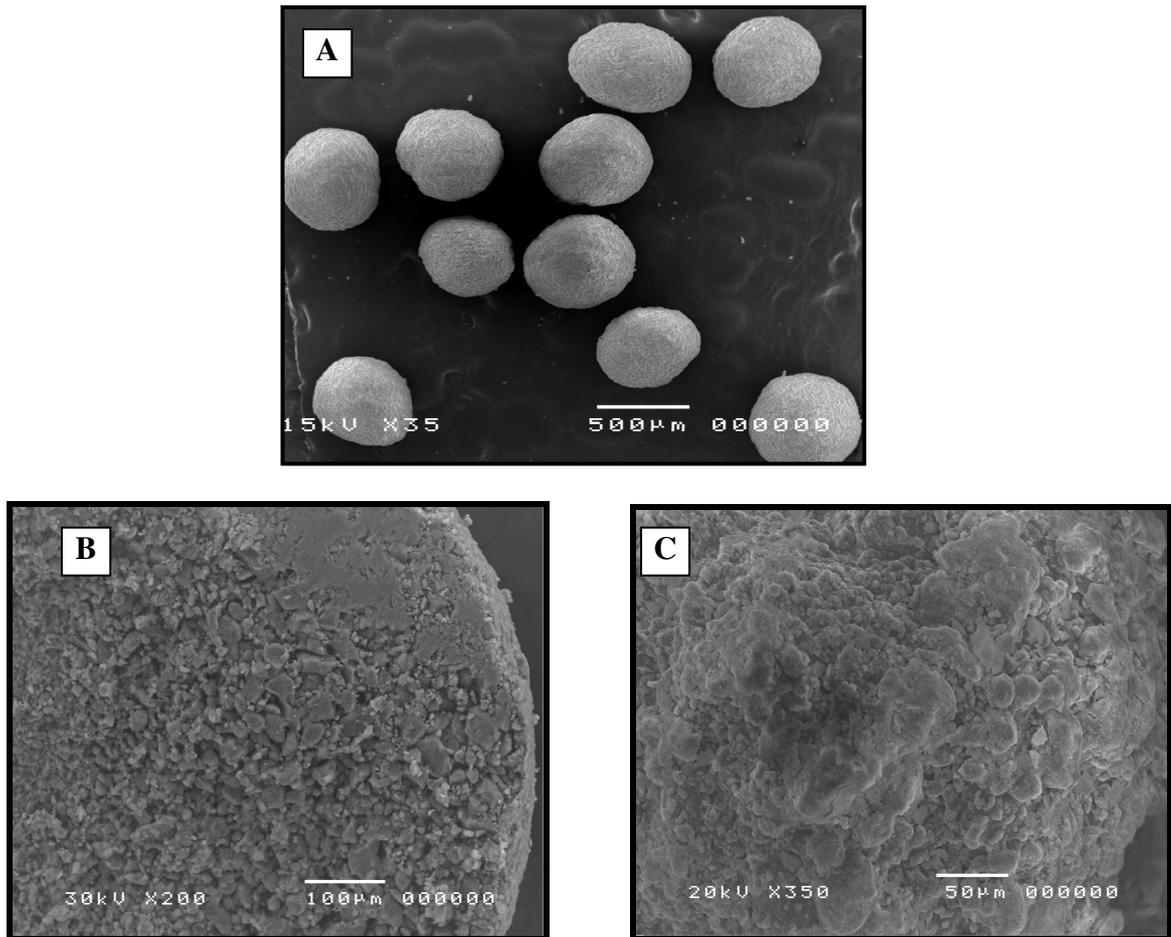


Figura 7 – Imagem da HA por meio da MEV.
Fonte – CBPF.

Foi utilizado selante de fibrina (Tissucol[®]), formado a partir de proteínas do plasma humano, especificamente fibrinogênio e trombina, acrescido de uma proteína bovina, a aprotinina (Figura 8).



Figura 8 – Selante de fibrina (Tissucol[®])
Fonte – Elaboração nossa.

4.2 FÁRMACO

O ranelato de estrôncio (Protos[®]) é um sal composto por dois átomos de estrôncio estável e uma substância orgânica, o ácido ranélico. Cada saqueta de ranelato de estrôncio contém 2g de grânulos para suspensão oral. Seus excipientes são aspartame, maltodextrina e manitol (Figura 9).



Figura 9 – Ranelato de estrôncio (Protos[®]).
Fonte – Elaboração nossa.

4.3 ANIMAIS

O experimento foi realizado no Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), em conformidade com os princípios aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEUA) dessa Instituição (Anexo A).

Foram utilizados 75 *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, albinos, machos, adultos, com massa corpórea de 350 a 400g, de três a quatro meses de idade. A quantidade de animais (n=5) foi baseada pelos estudos de Paula *et al.* (2009) e Marie *et al.* (1985).

Todos os animais do estudo foram mantidos durante todo período experimental em caixas identificadas e autoclavadas, forradas com *maravalha de pinus* autoclavada e trocada

diariamente, alimentados com ração sólida Labina (Purina, Paulínia, SP, Brasil) e água *ad libidum*, mantidos em condições ambientais controladas de temperatura e luminosidade.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para a formação de cinco grupos, cada um deles composto por 15 animais, os quais foram avaliados nos tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias pós-operatórios (Tabela 1):

Grupo I – Grupo controle A: defeito ósseo crítico preenchido apenas por coágulo sanguíneo, submetido a dieta convencional.

Grupo II - Grupo controle B: defeito ósseo crítico preenchido apenas por coágulo sanguíneo, submetido a dieta com 900mg/Kg.dia de ranelato de estrôncio - Protos[®]- Laboratório Servier.

Grupo III – defeito ósseo crítico preenchido por selante de fibrina (Tissucol[®]), submetido a dieta com 900mg/Kg.dia de ranelato de estrôncio - Protos[®] - Laboratório Servier.

Grupo IV – defeito ósseo crítico preenchido por microesferas de hidroxiapatita, submetido a dieta com 900mg/Kg.dia de ranelato de estrôncio - Protos[®] - Laboratório Servier.

Grupo V – defeito ósseo crítico preenchido por microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina (Tissucol[®]), submetido a dieta com 900mg/Kg.dia de ranelato de estrôncio - Protos[®] - Laboratório Servier.

Tabela 1 – Distribuição de animais de acordo com os grupos e tempos biológicos (dias).

Tempos biológicos	Grupos					Total
	GI	GII	GIII	GIV	GV	
15 dias	5	5	5	5	5	25
45 dias	5	5	5	5	5	25
120 dias	5	5	5	5	5	25
Total	15	15	15	15	15	75

Os animais pertencentes ao grupo GI receberam somente a dieta convencional com ração sólida Labina (Purina, Paulínia, SP, Brasil) durante todo o experimento.

Os animais pertencentes aos grupos GII a GV receberam uma dieta pastosa, preparada e administrada como se descreve a seguir.

A ração sólida foi triturada e logo em seguida distribuída para cada animal em seus respectivos recipientes na quantidade de 7900mg. Em seguida, foram adicionadas 900mg/Kg.dia de ranelato de estrôncio e 5mL de água, para formar uma dieta pastosa.

Esse composto começou a ser administrado na manhã do dia seguinte à cirurgia. A referida dieta foi administrada durante todas as manhãs que se seguiram. No entanto, antes de receber o composto, os animais dispunham para consumo apenas de água *ad libidum*. Somente após o consumo de todo o composto, o que se deu de maneira mais intensa ao passar do quarto dia pós-cirúrgico, os animais se alimentavam normalmente com a ração sólida e água *ad libidum*. Vale ressaltar que eles consumiam toda a dieta pastosa após duas horas.

4.4 TÉCNICA CIRÚRGICA

A técnica cirúrgica (Figura 10) empregada foi a mesma utilizada por Takagi & Urist (1982). Os animais foram anestesiados com injeções intramusculares de cloridrato de quetamina (Vetaset[®]) na proporção de 0,12mL/100g de peso, enquanto a analgesia e a sedação foram realizadas com injeções, aplicadas também via intramuscular, de cloridrato de xilazina (Copazine[®] 2%), na proporção de 0,06mL/100g de massa corpórea. Em seguida, foram tricotomizados na região da calvária, onde foi realizada uma antisepsia do campo operatório com álcool iodado, e posicionados em decúbito ventral para acesso à calvária.

Foi realizada uma incisão cutânea bicoronal com lâmina de bisturi n°. 15 (Bencton Dickinson), com aproximadamente 3,0cm de extensão, seguida de divulsão e elevação do retalho para acesso ao periósteo. O próximo passo consistiu em incisar e remover o periósteo, para expor o tecido ósseo.

O defeito crítico¹ foi realizado com uma fresa trefina de 8,5mm de diâmetro externo (Dentoflex[®]), montada em contra ângulo com redução de 1:16, acoplada a um motor cirúrgico (Driller BLM 350) de 1500rpm, sob irrigação constante com solução fisiológica;

¹ Lesão óssea que não possui capacidade reparadora espontânea (BRAZ *et al.*, 2003).

confeccionou-se, na porção mediana da calvária, entre os vértices das suturas anterior e posterior, o defeito ósseo, transfixado com aproximadamente 1,0mm de espessura, obtida pela remoção total da calvária. Por fim, o biomaterial foi implantado no defeito, ou não, procedimento seguido pela reposição e sutura do retalho com fio de seda 4.0 (Ethicon – Johnson & Johnson).

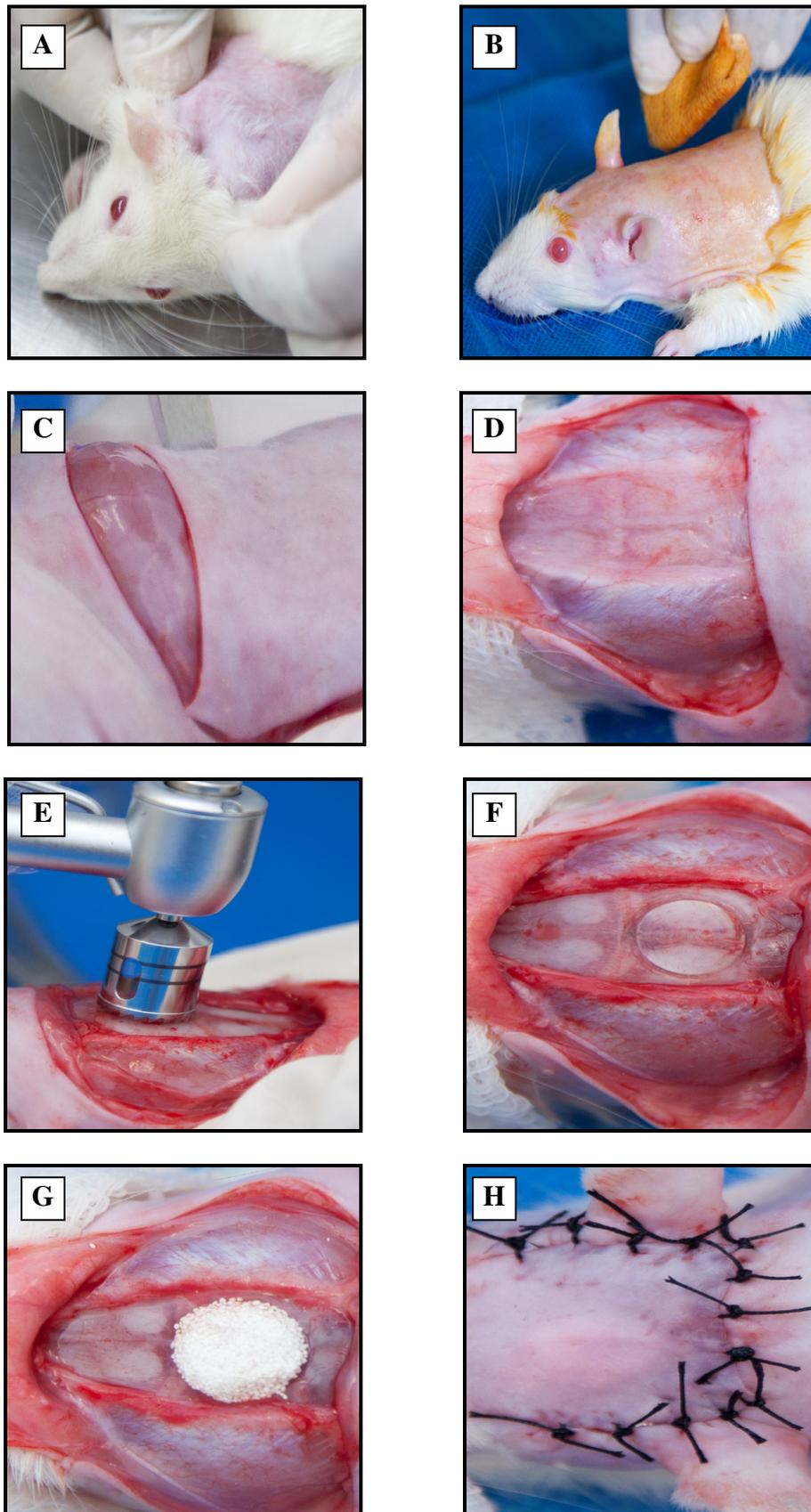


Figura 10 – Procedimento cirúrgico na calvária dos animais: (A) Tricotomia; (B) Antissepsia; (C) Incisão; (D) Exposição da calvária intacta; (E) Provocação do defeito crítico; (F) Defeito crítico; (G) Colocação do biomaterial; (H) Sutura.

Fonte – Elaboração nossa.

4.5 COLETA DAS AMOSTRAS

Os animais foram anestesiados e sedados. Em seguida, posicionados em decúbito dorsal; localizou-se o coração, colocando o dedo indicador sobre o tórax entre a 4^a e a 6^a costela; ao perceber os batimentos cardíacos, introduziu-se a agulha perpendicularmente à parede torácica (Figura 11). Nos grupos I a V, o sangue foi coletado em tubos a vácuo de 6mL, livres de metais, com heparina sódica (Bencton & Dicson[®]) (Figura 12). A coleta ocorreu nos tempos biológicos de morte dos animais. O sangue foi centrifugado a 300rpm por 10 minutos, e aproximadamente 3mL do plasma foram transferidos para dois tubos *Eppendorf* de 1,5mL, previamente descontaminados em banho de ácido nítrico a 10%. As amostras foram armazenadas a -22°C até o momento da análise.

Após a coleta, os animais foram eutanasiados por dose letal de anestésico, nos tempos biológicos previstos de 15, 45 e 120 dias.



Figura 11 – Técnica de coleta das amostras:
Punção cardíaca.

Fonte – Elaboração nossa.



Figura 12 – Materiais da coleta das amostras:
Tubos de coleta a vácuo, com
heparina sódica, adaptador e
agulha.

Fonte – Elaboração nossa.

4.6 ANÁLISE LABORATORIAL

As mensurações do estrôncio e do cálcio no plasma sanguíneo foram realizadas, respectivamente, mediante espectrometria de absorção atômica, com forno de grafite e espectrometria de absorção atômica com chama.

4.6.1 Dosagem de estrôncio

As concentrações de estrôncio no plasma foram determinadas por meio da espectrometria de absorção atômica, com forno de grafite (GFAAS²) (Figura 13). Essa técnica apresenta alta sensibilidade, especificidade e seletividade para quantificar elementos cujos teores estão geralmente muito baixos em amostras biológicas (D'HAESE *et al.*, 1997). O equipamento utilizado foi o espectrômetro Varian AA240Z, acoplado ao forno de grafite GTA 120 com o auxílio do amostrador automático PSD 120. A fonte de luz foi uma lâmpada de

² Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry.

cátodo oco, usada em 25mA a 460.7nm. As condições de temperatura padronizadas foram as seguintes: secagem – evaporação do solvente (70-120°C); carbonização – remoção da matéria orgânica ou dos componentes voláteis da matriz (1000°C), ambas sob fluxo de argônio de 0,3 L/min; e a atomização – que gera uma nuvem do metal no estado elementar quando é feita a leitura a 2600°C. Apenas 8µL da amostra foram transferidos para o tubo de grafite particionado, revestido piroliticamente.

As amostras foram preparadas de acordo com o método descrito por D'HAESE *et al.* (1997). Nesse procedimento, 400µL da solução diluente [Triton X-100 0,1% em HNO₃ 0,2% (Suprapur, Merck®)] foram pipetados diretamente para os frascos do amostrador automático e, em seguida, adicionados a 100µL do plasma, com agitação. Essa diluição (1:5) foi suficiente para que os níveis plasmáticos normais ficassem dentro da faixa da curva de calibração que foi a de 2,5 a 20µg/L. As amostras dos animais tratados com ranelato de estrôncio sofreram diluição mais elevada (1: 1000).

Todas as amostras foram preparadas em duplicata, e cada uma delas foi também, injetada no GFAAS em duplicata, sendo aceita somente uma variação intrainjeção menor que 10%. O limite de detecção do método foi de 1µg/L. A precisão intrabateria, em amostra de plasma humano (n=5, 25µg/L), calculada como coeficiente de variação, foi <1%. Por falta de uma amostra de referência certificada, a exatidão (99,6%) foi calculada como recuperação em plasma humano, adicionando-se 10µgSr/L. Todas as vidrarias, ponteiras e outros recipientes foram previamente descontaminados por imersão em solução de ácido nítrico a 10% e enxaguados em água pura Tipo I (Milli-Q, Millipore®).



Figura 13 – Aparelho de Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite.
Fonte – Acervo do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da UFBA.

4.6.2 Dosagem de cálcio

As concentrações de Ca no plasma foram determinadas por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS³) (Figura 14). Essa é uma técnica bastante utilizada para analisar elementos em níveis de mg/L. O equipamento utilizado foi o espectrômetro Varian 55B equipado com queimador de ar-acetileno. A fonte de luz foi uma lâmpada de cátodo oco, usada em 10mA a 422,7nm.

O método empregado na preparação e análise do Ca plasmático foi adaptado a partir do descrito por Welch; Hamar & Fettman (1990). Uma alíquota do plasma dos animais foi precipitada com igual volume de ácido tricloroacético (Merck) a 5%. Em seguida, o sobrenadante foi diluído na proporção 1:50 com solução de cloreto de lantânio (JT Backer[®]) a 0,1%. Todas as amostras foram preparadas em duplicatas e aspiradas no FAAS. Foi registrada a média de três leituras, observado o coeficiente de variação menor que 5%. O equipamento foi calibrado com soluções-padrão de cálcio (1 a 5mg/L), preparadas em ácido nítrico 0,2%. Para fins de controle de qualidade, amostras de referência de soro humano Lyphocheck Nível 1 (Bio-Rad[®]) foram analisadas repetidamente (n=6) durante a corrida das amostras. A exatidão e precisão observadas foram 103,3% e 98,8%, respectivamente.



Figura 14 – Aparelho de Espectrometria de Absorção Atômica com Chama.

Fonte – Acervo do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da UFBA.

³ *Flame Atomic Absorption Spectrometry.*

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O banco de dados foi criado no Excel 2003 e analisado no software R (versão 2.12.0), tendo sido realizada a correção dos dados digitados, com o objetivo de eliminar possíveis erros. Foi feita uma análise descritiva (mediana, 1º e 3º quartis), com a finalidade de identificar as características gerais e específicas da amostra estudada. Para testar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk.

Para verificar a existência de diferenças significativas das concentrações plasmáticas de estrôncio e de cálcio, de acordo com o grupo intervenção, e também para comparar cada grupo de intervenção de acordo com os tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias, foi utilizado o teste Exato de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste Exato de Mann-Whitney (sem correção de Bonferroni). O nível de significância estabelecido para este trabalho é de 5%. Os resultados obtidos serão apresentados de forma descritiva, formulados em Word, com tabelas e figuras comparativas.

5 RESULTADOS

As concentrações plasmáticas encontradas do Sr^{+2} e do Ca^{+2} de cada animal dos cinco grupos experimentais para os tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias podem ser visualizadas nas Tabelas 2, 3, 4 e 5, 6 e 7.

As Figuras 15, 16, 17 18, 19 e 20 representam as concentrações plasmáticas de Sr^{+2} e Ca^{+2} entre os grupos, nos tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias.

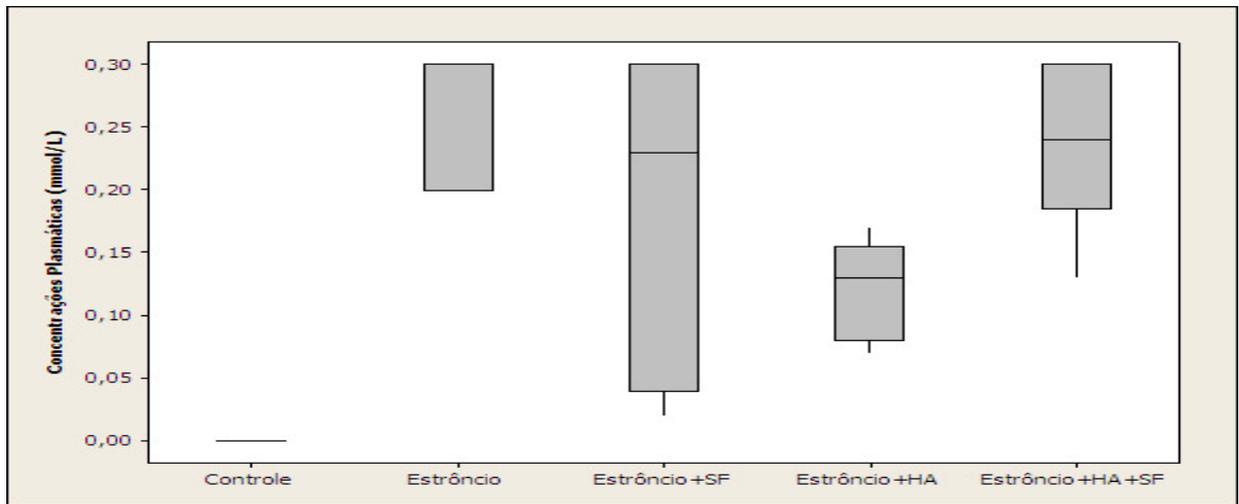
5.1 COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO ESTRÔNCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 15 DIAS

A Figura 15 exibe os resultados obtidos quanto à comparação das concentrações plasmáticas de Sr^{+2} , no tempo biológico de 15 dias.

Tabela 2 – Grupos e concentrações do estrôncio no tempo biológico de 15 dias.

Grupos e tempo biológico de 15 dias					
Concentrações do Sr^{+2} (mmol/L)					
Sujeitos	GI (Ctrl)	GII (Sr)	GIII (SF + Sr)	GIV (HA+ Sr)	GV (HA+ SF + Sr)
S1	0,00042	0,20	0,02	0,07	0,13
S2	0,00049	0,20	0,23	0,09	0,24
S3	0,00050	0,20	0,30	0,13	0,24
S4	0,00054	0,30	0,30	0,14	0,30
S5	0,00057	0,30	0,06	0,17	0,30

Figura 15 – Concentrações plasmáticas do estrôncio entre os grupos, no tempo biológico de 15 dias.



Foi possível constatar que, no tempo biológico de 15 dias, em todos os grupos, as concentrações plasmáticas de estrôncio aumentaram, apresentando estatisticamente diferenças significantes ($p < 0,05$), quando comparadas às do grupo de controle. Os teores de Sr^{+2} encontrados no GI variaram entre 0,00042 a 0,00057 mmol/L; no GII, de 0,2 a 0,3 mmol/L; no GIII, de 0,02 a 0,3 mmol/L; no GIV, de 0,07 a 0,17 mmol/L; e no GV, de 0,13 a 0,3 mmol/L (Tabela 2). A relação entre GII e GIV e a de GIV e GV mostra também uma alteração significativa para o Sr^{+2} . Não foi observada alteração estatisticamente significativa entre GII e GIII; GII e GV; GIII e GIV; GIII e GV.

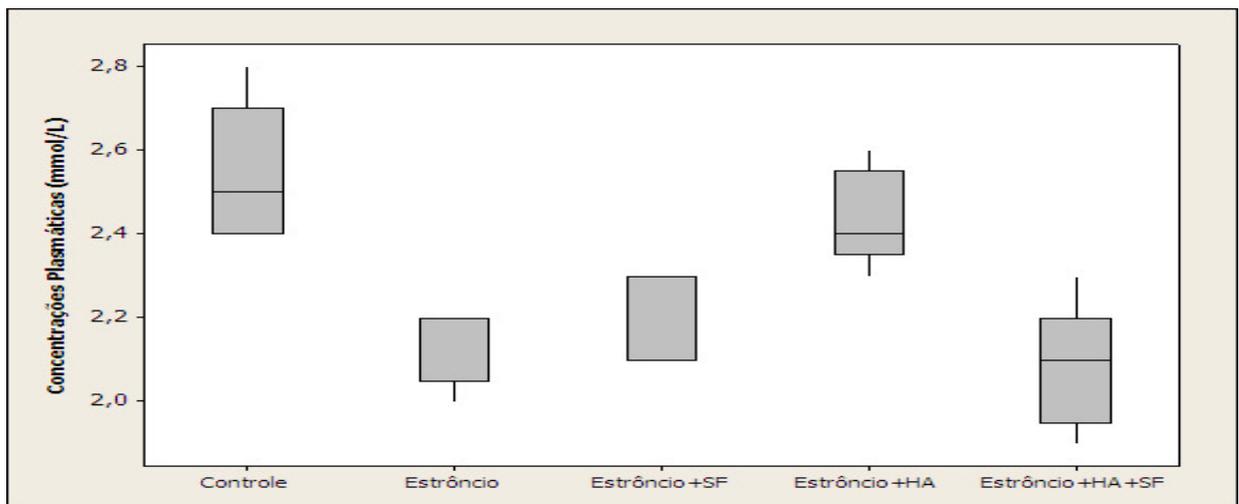
5.2 COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE CÁLCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 15 DIAS

A Figura 16 mostra os resultados obtidos quanto à comparação das concentrações plasmáticas de Ca^{+2} , no tempo biológico de 15 dias.

Tabela 3 – Grupos e concentrações do cálcio no tempo biológico de 15 dias.

Grupos e tempo biológico de 15 dias					
Concentrações do Ca ⁺² (mmol/L)					
Sujeitos	GI (Ctrl)	GII (Sr)	GIII (SF + Sr)	GIV (HA+ Sr)	GV (HA+ SF + Sr)
S1	2,5	2,1	2,1	2,3	2,1
S2	2,6	2,2	2,1	2,4	2,0
S3	2,4	2,2	2,1	2,6	2,3
S4	2,8	2,0	2,3	2,5	1,9
S5	2,4	2,2	2,3	2,4	2,1

Figura 16 – Concentrações plasmáticas do cálcio entre os grupos, no tempo biológico de 15 dias.



Foi possível observar que, no tempo biológico de 15 dias, em todos os grupos, as concentrações plasmáticas de Ca⁺² foram diminuídas, com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$), quando comparadas às do grupo de controle, exceto para o GIV. Os teores de Ca⁺² encontrados no GI variaram entre 2,4 a 2,8mmol/L; no GII, de 2,0 a 2,2mmol/L; no GIII, de 2,1 a 2,3mmol/L; no GIV, de 2,3 a 2,6mmol/L; e no GV, de 1,9 a 2,3mmol/L (Tabela 3). A associação entre GII e GIV, GIII e GIV, GIV e GV revela também

uma alteração significativa para o Ca^{+2} , mas não houve diferenças estatísticas significantes entre GII e GIII, GII e GV, e GIII e GV.

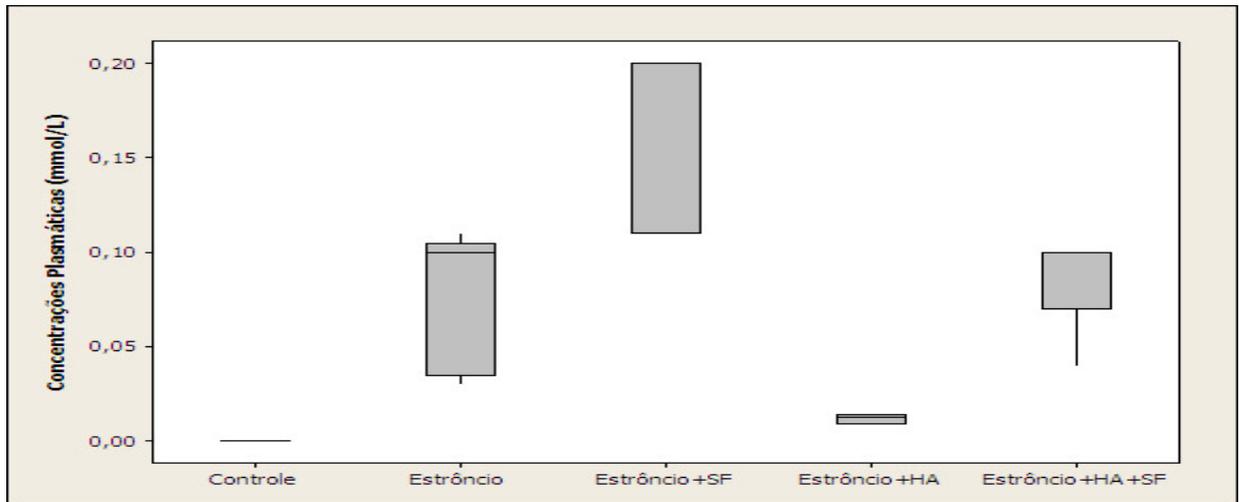
5.3 COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO ESTRÔNCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 45 DIAS

A Figura 17 resume os resultados obtidos quanto à comparação das concentrações plasmáticas de Sr^{+2} , no tempo biológico de 45 dias.

Tabela 4 – Grupos e concentrações do estrôncio no tempo biológico de 45 dias.

Grupos e tempo biológico de 45 dias					
Concentrações do Sr^{+2} (mmol/L)					
Sujeitos	GI (Ctrl)	GII (Sr)	GIII (SF + Sr)	GIV (HA+ Sr)	GV (HA+ SF + Sr)
S1	0,00052	0,03	0,11	0,009	0,04
S2	0,00059	0,04	0,11	0,009	0,10
S3	0,00060	0,10	0,20	0,013	0,10
S4	0,00060	0,10	0,20	0,013	0,10
S5	0,00064	0,11	0,20	0,015	0,10

Figura 17 – Concentrações plasmáticas do estrôncio entre os grupos, no tempo biológico de 45 dias.



Notou-se que, no tempo biológico de 45 dias, em todos os grupos, as concentrações plasmáticas de Sr^{+2} aumentaram, com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$), quando comparadas às do grupo de controle. Os teores de Sr^{+2} encontrados no GI variaram entre 0,0006 e 0,00064 mmol/L; no GII, de 0,03 a 0,11 mmol/L; no GIII, de 0,11 a 0,2 mmol/L; no GIV, de 0,009 a 0,015 mmol/L; e no GV, de 0,04 a 0,1 mmol/L (Tabela 4). A comparação entre GII e GIII, GII e GIV, GIII e GIV, GIII e GV, GIV e GV mostra também uma alteração significativa para o estrôncio, mas não houve diferença estatística significativa entre GII e GV.

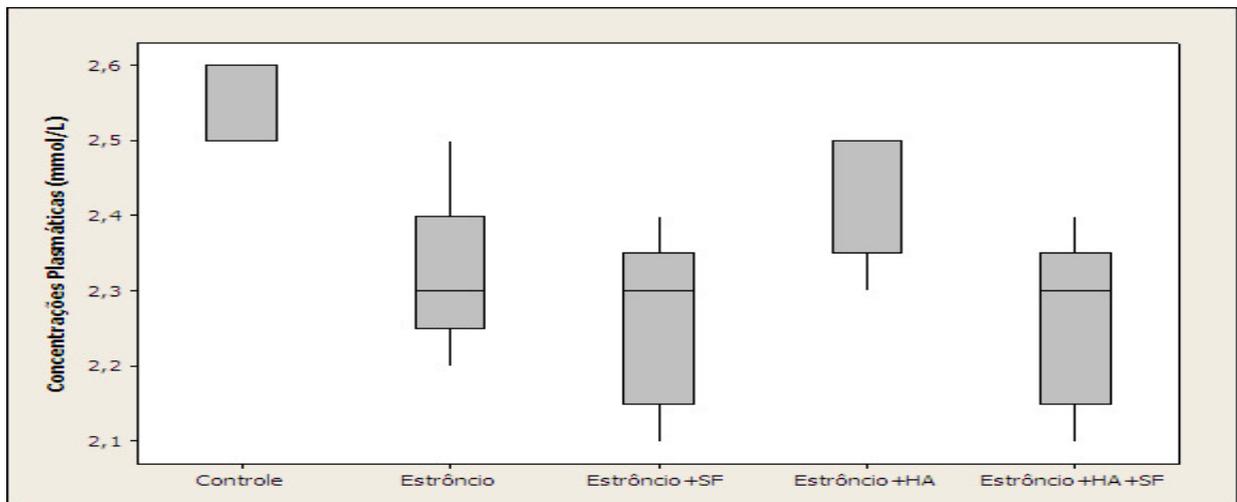
5.4 COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO CÁLCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 45 DIAS

A Figura 18 resume os resultados obtidos quanto à comparação das concentrações plasmáticas de Ca^{+2} , no tempo biológico de 45 dias.

Tabela 5 – Grupos e concentrações do cálcio no tempo biológico de 45 dias.

Grupos e tempo biológico de 45 dias					
Concentrações do Ca ⁺² (mmol/L)					
Sujeitos	GI (Ctrl)	GII (Sr)	GIII (SF + Sr)	GIV (HA+ Sr)	GV (HA+ SF + Sr)
S1	2,5	2,3	2,3	2,5	2,1
S2	2,6	2,2	2,4	2,5	2,3
S3	2,5	2,5	2,3	2,5	2,4
S4	2,5	2,3	2,2	2,4	2,3
S5	2,6	2,3	2,1	2,3	2,2

Figura 18 – Concentrações plasmáticas de cálcio entre os grupos, no tempo biológico de 45 dias.



Foi observado que, no tempo biológico de 45 dias, em todos os grupos, as concentrações plasmáticas de Ca⁺² foram diminuídas, com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$), se comparadas às do grupo de controle, exceto para o GIV. Os teores de Ca⁺² encontrados no GI variaram de 2,5 a 2,6mmol/L; no GII, de 2,2 a 2,5mmol/L; no GIII, de 2,1 e 2,4mmol/L; no GIV, de 2,3 a 2,5mmol/L; e no GV, de 2,1 a 2,4mmol/L (Tabela

5). Não houve alterações estatísticas significantes entre os grupos GII e GIII, GII e GIV, GII e GV, GIII e GIV, GIII e GV, GIV e GV.

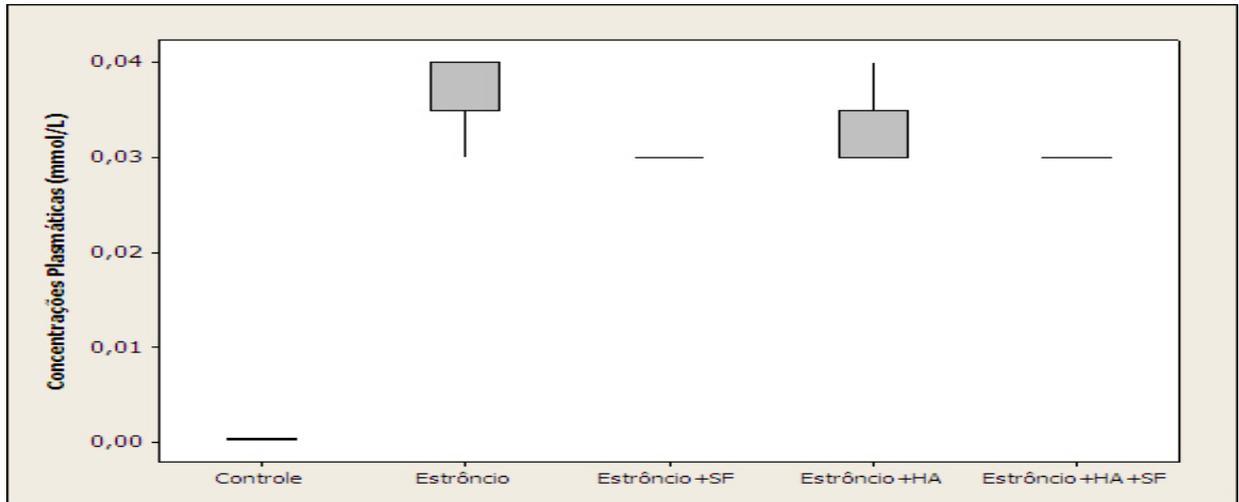
5.5 COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO ESTRÔNCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 120 DIAS

A Figura 19 exibe os resultados obtidos quanto à comparação das concentrações plasmáticas de Sr^{+2} , no tempo biológico de 120 dias.

Tabela 6 – Grupos e concentrações do estrôncio no tempo biológico de 120 dias.

Grupos e tempo biológico de 120 dias					
Concentrações do Sr^{+2} (mmol/L)					
Sujeitos	GI (Ctrl)	GII (Sr)	GIII (SF + Sr)	GIV (HA+ Sr)	GV (HA+ SF + Sr)
S1	0,00047	0,04	0,03	0,03	0,3
S2	0,00052	0,04	0,03	0,03	0,3
S3	0,00040	0,04	0,03	0,03	0,3
S4	0,00045	0,04	0,03	0,03	0,3
S5	0,00048	0,03	0,03	0,04	0,3

Figura 19 – Concentrações plasmáticas de estrôncio entre os grupos, no tempo biológico de 120 dias.



Notou-se que, no tempo biológico de 120 dias, em todos os grupos, as concentrações plasmáticas de Sr^{+2} aumentaram, com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$), se comparadas às do grupo de controle. Os teores de Sr^{+2} encontrados no GI variaram entre 0,00040 a 0,00052 mmol/L; no GII, de 0,03 a 0,04 mmol/L; no GIV, de 0,03 a 0,04 mmol/L. No GIII e no GV, tais valores foram de 0,03 mmol/L e de 0,30 mmol/L, respectivamente (Tabela 6). A relação entre GII e GIII e GII e GV mostrou também uma alteração significativa para o estrôncio, mas não houve diferença estatística significativa entre GII e GIV, GIII e GIV, GIII e GV, GIV e GV.

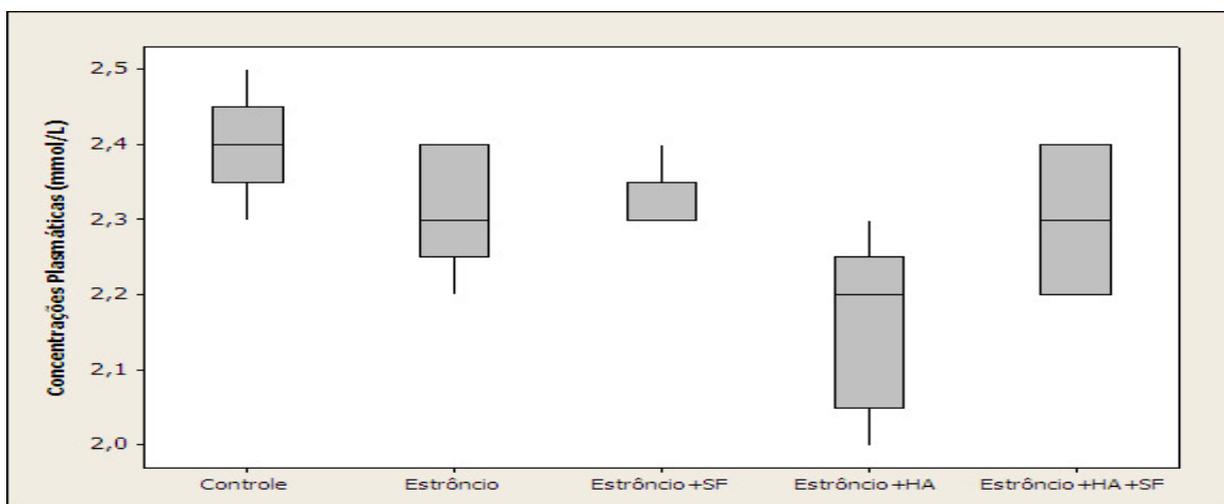
5.6 COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO CÁLCIO ENTRE OS GRUPOS, NO TEMPO BIOLÓGICO DE 120 DIAS

A Figura 20 exibe os resultados obtidos quanto à comparação das concentrações plasmáticas de Ca^{+2} , no tempo biológico de 120 dias.

Tabela 7 – Grupos e concentrações do cálcio no tempo biológico de 120 dias.

Grupos e tempo biológico de 120 dias					
Concentrações do Ca ⁺² (mmol/L)					
Sujeitos	GI (Ctrl)	GII (Sr)	GIII (SF + Sr)	GIV (HA+ Sr)	GV (HA+ SF + Sr)
S1	2,5	2,4	2,3	2,0	2,4
S2	2,3	2,2	2,4	2,1	2,4
S3	2,4	2,3	2,3	2,2	2,3
S4	2,4	2,3	2,3	2,2	2,2
S5	2,4	2,4	2,3	2,3	2,2

Figura 20 – Concentrações plasmáticas do cálcio entre os grupos, no tempo biológico de 120 dias.



Notou-se que, no tempo biológico de 120 dias, em todos os grupos, as concentrações plasmáticas de Ca⁺² não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação às do grupo de controle, exceto para GIV, pois o cálcio se apresentou diminuído. Entre os grupos, os teores de Ca⁺² encontrados também não se apresentaram estatisticamente

diferentes, sendo que, no GI, variou de 2,3 a 2,5mmol/L; no GII, de 2,2 a 2,4mmol/L; no GIII, de 2,3 e 2,4mmol/L; no GIV, de 2,0 a 2,3mmol/L; e no GV, de 2,2 a 2,4mmol/L (Tabela 7).

5.7 COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DO ESTRÔNCIO E DO CÁLCIO ENTRE OS TEMPOS BIOLÓGICOS DE 15, 45 E 120 DIAS.

As Tabelas 8 e 9 mostram os resultados obtidos das concentrações plasmáticas de Sr^{+2} e Ca^{+2} , respectivamente, entre os tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias.

Tabela 8 - Comparação das concentrações plasmáticas do estrôncio entre os tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias. q1 e q3 são os quartis correspondentes a 25 e 75% da amostra, respectivamente.

	GI (Ctrl)	GII (Sr)	GIII (SF + Sr)	GIV (HA+ Sr)	GV (HA+ SF + Sr)
(15d) / Mediana	0,00050mmol/L	0,20mmol/L	0,26mmol/L	0,13mmol/L	0,24mmol/L
(15d) / Percentis	q1= 0,00045; q3= 0,00055	q1= 0,2; q3= 0,3	q1= 0,07; q3= 0,30	q1= 0,08; q3= 0,15	q1= 0,18; q3= 0,30
(45d) / Mediana	0,0006mmol/L	0,10mmol/L	0,20mmol/L	0,013mmol/L	0,10mmol/L
(45d) / Percentis	q1= 0,00055; q3= 0,00062	q1= 0,035; q3= 0,1	q1= 0,11; q3= 0,2	q1= 0,009; q3= 0,014	q1= 0,07; q3= 0,1
(120 d) / Mediana	0,00047mmol/L	0,04mmol/L	0,030mmol/L	0,030mmol/L	0,030mmol/L
(120 d) / Percentis	q1= 0,00042; q3= 0,00050	q1= 0,035; q3= 0,040	q1= 0,030; q3= 0,030	q1= 0,030; q3= 0,035	q1= 0,030; q3= 0,030

Ao serem comparados os tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias (Tabela 8), observou-se que os teores de estrôncio, no plasma sanguíneo, foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$), sendo que, em 15 dias, as concentrações foram mais elevadas e, em 120 dias, foram bastante reduzidas.

Tabela 9 - Comparação das concentrações plasmáticas do cálcio entre os tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias. q1 e q3 são os quartis correspondentes a 25 e 75% da amostra, respectivamente.

	GI (Ctrl A)	GII (Sr)	GIII (SF + Sr)	GIV (HA+ Sr)	GV (HA+ SF + Sr)
(15d) / Mediana	2,5mmol/L	2,2mmol/L	2,1mmol/L	2,4mmol/L	2,1mmol/L
(15d) / Percentis	q1= 2,4; q3= 2,7	q1= 2,05; q3= 2,2	q1= 2,1; q3= 2,25	q1= 2,35; q3= 2,55	q1= 1,95; q3= 2,2
(45d) / Mediana	2,5mmol/L	2,3mmol/L	2,3mmol/L	2,5mmol/L	2,3mmol/L
(45d) / Percentis	q1= 2,5; q3= 2,6	q1= 2,25; q3= 2,4	q1= 2,15; q3= 2,35	q1= 2,35; q3= 2,5	q1= 2,15; q3= 2,35
(120 d) / Mediana	2,4mmol/L	2,3mmol/L	2,3mmol/L	2,2mmol/L	2,3mmol/L
(120 d) / Percentis	q1= 2,35; q3= 2,45	q1= 2,25; q3= 2,4	q1= 2,30; q3= 2,35	q1= 2,05; q3= 2,25	q1= 2,2; q3= 2,4

Ao serem comparados os tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias (Tabela 9), observou-se que os teores de cálcio, no plasma sanguíneo, não se apresentaram estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Múltiplos estudos têm mostrado que a administração de estrôncio aumenta as concentrações desse elemento no osso e no sangue (FUCHS *et al.*, 2008; BAZOT; DELANNOY & MARIE, 2002). No tratamento à base de Sr^{+2} , administrado na forma de ranelato de estrôncio, ocorre um estímulo à formação óssea e diminui a reabsorção óssea em humanos e roedores, resultando em aumento de volume dos ossos, ao passo que o padrão de mineralização permanece normal (AMMANN; ROBIN & SHEN, 2004; BRUYERE *et al.*, 2007). De acordo com alguns autores, ao se administrar, na dieta, uma dose de 900mg/Kg.dia de ranelato de estrôncio em ratos, as concentrações plasmáticas de estrôncio se mostram dentro de um intervalo de 0,30 a 0,35mmol/L, sendo que esses valores podem resultar em efeitos positivos, como aumento de massa óssea, a melhora da microestrutura e a da resistência óssea.

No presente trabalho, observou-se – na mensuração das concentrações plasmáticas de estrôncio e cálcio na regeneração de defeito crítico em calvária de rato, aos quais foram administradas 900mg/Kg.dia de ranelato de estrôncio – que a quantidade de cálcio dos grupos de 15 e 45 dias apresentou alterações estatisticamente significantes quando comparada à do grupo de controle. O mesmo não aconteceu no tempo biológico de 120 dias, pois as concentrações de cálcio não foram estatisticamente significantes entre todos os grupos. Também, em 120 dias, os teores de estrôncio não atingiram os valores plasmáticos esperados. Quando foi administrado o ranelato de estrôncio no tempo de 15 dias, verificou-se uma variação da mediana de 0,13 a 0,26mmol/L; em 45 dias, de 0,10 a 0,20mmol/L; e em 120 dias, de 0,030 a 0,040mmol/L.

Observou-se – conforme é descrito em outros estudos – que os teores de estrôncio, no plasma, foram maiores nos grupos tratados com ranelato de estrôncio em 15, 45 e 120 dias, se comparados aos do grupo de controle, apesar de níveis plasmáticos não atingirem os valores esperados. Logo, evidencia-se que o ranelato de estrôncio eleva a concentração de estrôncio no plasma sanguíneo, seguindo a dinâmica de retrocontrole (*feedback*) que lhe é própria, diferentemente do cálcio, que apresenta um mecanismo homeostático singular e potente. (NIELSEN, 2004). Por se tratar de um metal pesado, o estrôncio pode ser bioacumulável no organismo e, portanto, os seus níveis plasmáticos permaneceram elevados entre os grupos referidos.

Estudos experimentais com ratos mostram que doses de 500mg/Kg.dia e 1000mg/Kg.dia de ranelato de estrôncio aumentaram a osteointegração e a fixação de implantes, além de melhorarem a microestrutura trabecular peri-implantar (LI *et al.*, 2010;

MAÏMOUN *et al.*, 2010). Já doses entre 625mg/Kg.dia e 900mg/Kg.dia estão relacionadas a um aumento no nível plasmático do estrôncio, assim como a um aumento no volume ósseo e de sua resistência (MAÏMOUN *et al.*, 2010).

Os estudos experimentais de Teixeira (2009) & Yang (2005) demonstram que a HA, com alta cristalinidade implantada em defeito crítico na calvária de rato, produziu, após três meses da cirurgia, uma maior densidade de volume de osso neoformado na região periférica do que na intermediária e central, seguindo o princípio básico para cicatrização de feridas. Isso porque a cristalinidade é uma propriedade que altera o índice de dissolução do biomaterial além de ela ser dependente da temperatura de sinterização. Esta, acima de 1000°C e por um período de tempo de no mínimo seis horas, resulta na mais perfeita forma do cristal, tendo assim, uma menor bioatividade e uma degradação mais lenta (WANG & YE, 2008).

O grupo, no presente estudo, que fez apenas o uso de ranelato de estrôncio associado ao biomaterial HA apresentou menores concentrações plasmáticas de estrôncio, quando comparado ao GII, GIII e GV, em 15 e 45 dias, sendo ainda mais representativo no tempo biológico de 45 dias, no qual se evidenciou uma queda correlacional significativa de valores. Em 120 dias, não foi observada a relação de troca iônica entre o Sr^{+2} e o Ca^{+2} no grupo que fez apenas uso de hidroxiapatita, uma vez que as concentrações plasmáticas do Sr^{+2} , nesse grupo, não foram reduzidas em comparação com GII, GIII e GV. É provável que isso tenha ocorrido em função da presença da HA, o que permitiu ao estrôncio, por meio de trocas iônicas, em uma competição com o cálcio, se incorporar à sua estrutura (WANG & YE, 2008; TIAN *et al.*, 2009; QIU *et al.*, 2006). Possivelmente, o estrôncio, em contato com a HA presente na calvária do rato, possibilitou a liberação de cálcio para o sangue, ao ser substituído pelo estrôncio. Dessa forma, as concentrações plasmáticas de cálcio se elevaram e as concentrações de estrôncio diminuíram.

Metais, como o estrôncio, têm a capacidade de se incorporar ao tecido ósseo, tornando-o seu maior reservatório. Não obstante, 90% do estrôncio presente no organismo estão contidos nos ossos. Há várias possibilidades de o estrôncio se fixar nos ossos e, dentre elas, muitos autores pontuam que cálcio e estrôncio competem pelos mesmos sítios de ligação no osso (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007; PI & QAURLES, 2004). A incorporação do Sr^{+2} no osso está diretamente relacionada a seus níveis plasmáticos, ao tempo de exposição e à renovação óssea (DAHL *et al.*, 2001).

Acredita-se que o Sr^{+2} e o Ca^{+2} , devido a grande semelhança química e fisiológica que têm entre si, ocupam os mesmos sítios de ligação dos transportadores presentes na mucosa

intestinal, ao serem absorvidos. Dessa forma, o estrôncio inibe a absorção do cálcio no intestino, principalmente, quando o consumo de cálcio na dieta for baixo (CABRERA, 1999; NIELSEN, 2004).

O estrôncio, a depender da dose usada, apresenta vários efeitos no metabolismo ósseo. Em baixas doses, o estrôncio estável é de grande benefício para a formação óssea. No entanto, altas doses podem alterar o metabolismo do cálcio em animais experimentais. Pesquisas mostram que, em grupos de ratos que receberam menos de 175 μ mol/dia (153mg/Kg.dia), não foram afetados os parâmetros metabólicos do cálcio, aumentando o seu conteúdo no osso. No entanto, em grupo de ratos que receberam uma dose maior de estrôncio (875 μ mol/dia) (770 mg/Kg.dia), os parâmetros de cálcio foram marcadamente suprimidos (MOROHASHI; SANO & YAMADA, 1994).

No presente estudo, quando foi administrada uma dose de 900mg/Kg.d de ranelato de estrôncio, verificou-se que as concentrações do cálcio foram reduzidas com significância estatística em 15 dias, ao serem comparados com GII, GIII e GV a GI; e 45 dias, ao serem comparados com GII, GIII e GV. Com a administração do fármaco ranelato de estrôncio, as concentrações plasmáticas de cálcio diminuíram com o passar do tempo. Ao serem comparados os tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias, houve redução significativa nas concentrações de estrôncio, principalmente em 120 dias. O mesmo não foi observado nas concentrações do Ca^{+2} , que não foi estatisticamente significante, visto que, com o tempo, observou-se uma aproximação dos valores em comparação aos do grupo de controle – talvez em razão do seu potente mecanismo homeostático ou pela própria redução do estrôncio.

Após a administração de doses repetidas por um período de tempo (no mínimo quatro semanas, em ratos), a incorporação de Sr^{+2} no osso atinge seu patamar; entretanto, no plasma sanguíneo, onde os níveis de estrôncio são mais rapidamente alcançados, isso acontece dentro de 10 dias, em ratos. Com a administração de doses mais altas, o conteúdo do estrôncio, no osso, tende a atingir o patamar (DAHL *et al.*, 2001).

Como o resultado de 120 não foi igual aos de 15 e 45 dias, supõe-se que o organismo dos animais que fizeram uso de ranelato de estrôncio absorveu muito estrôncio, o que os levou a atingir um ponto de saturação e, conseqüentemente, esse elemento foi excretado. Outra hipótese é a de que o próprio metabolismo do rato seja fisiologicamente acelerado, principalmente quando se trata da linhagem *Wistar*. Estudos relatam que o estrôncio é lentamente absorvido pelo trato intestinal, e essa absorção diminui com a idade (CABRERA *et al.*, 1999; WHO, 2010). Apesar de o estrôncio ser um metal pesado, sua excreção é mais

rápida que a do cálcio (DAHL *et al.*, 2001). É Possível que essas hipóteses possam explicar a queda gradativa entre os diferentes tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias. Portanto, em 120 dias, as concentrações de estrôncio foram tão pequenas que dificilmente atingiriam o tecido – alvo, com repercussões ou efeitos benéficos.

A administração dessa dose de um mesmo fármaco produz, na maioria das vezes, um efeito esperado; porém, em alguns casos, respostas ineficazes ou pouco típicas podem ocorrer. Essa variabilidade na resposta dos fármacos depende de fatores farmacodinâmicos e farmacocinéticos. Em se tratando dos fatores farmacodinâmicos, eles envolvem a sensibilidade do organismo ao fármaco, como, por exemplo, na relação das concentrações plasmáticas com os efeitos da droga.

Os fatores farmacocinéticos alteram os processos de absorção, distribuição e eliminação, bem como a relação entre a dose que se administra e os níveis plasmáticos que se alcançam (FLÓREZ, 1998). A depender das diferentes vias de administração, o fármaco poderá atingir o sangue e os líquidos corporais. Portanto, é necessário possuir, também, o conhecimento dos métodos, vias e técnicas de administração. Várias são as vias de administração de fármacos utilizadas em animais: subcutânea, intramuscular, endovenosa, intraperitoneal e oral (PAIVA; MAFFILI & SANTOS, 2005). Dentre essas vias, destaca-se a oral aplicada neste estudo, considerando que a absorção do fármaco utilizado é realizada pelo trato gastrintestinal.

Durante a realização de um plano piloto, foi possível investigar se a administração de 900mg/Kg.dia de ranelato de estrôncio em 200mL de água, durante 30 dias, em ratos, estaria relacionada com o aumento na concentração de estrôncio no plasma. Nesse sentido, foi necessário validar e padronizar a técnica através GFAAS. Portanto, levantou-se uma discussão, além de um resultado. Verificou-se que as concentrações plasmáticas de estrôncio encontradas variaram de 0,04 a 0,05mmol/L, as quais se apresentaram inferiores ao descrito na literatura. Assim, uma possível hipótese pôde ser ressaltada, como o método de administração do fármaco. Foi averiguada grande perda da solução em suspensão que foi aplicada em recipientes que os animais usam rotineiramente para o consumo de água. Portanto, a maneira de administrar o fármaco foi alterada na pesquisa em si e, deu-se preferência à associação da dieta pastosa, conforme preconizam os estudos de Ammann; Robin & Shen (2004).

As drogas administradas por via oral (VO) em animais devem ser adicionadas junto à ração ou na água. Existem outras formas de administração como a orogástrica (gavagem), a

qual não foi aplicada neste estudo. Ela exige a introdução do medicamento por tubo metálico ou cânula plástica ligado a uma seringa. O ideal é que os tubos usados em ratos sejam de 8cm de comprimento. Outros aspectos – como as condições de pH, a viscosidade e os volumes específicos – devem ser observados e adequados para cada animal (PAIVA; MAFFILI & SANTOS, 2005).

A disposição do fármaco ranelato de estrôncio na dieta pastosa, apesar de apresentar melhores resultados, ainda não se mostrou adequada; o fato de o fármaco ser administrado em suspensão oral e em dose singular talvez possa responder por esse evento, visto que os animais não fizeram o consumo da referida dieta em uma dose única, mas a consumiram paulatinamente, durante todo o dia, principalmente, após o quarto dia pós-cirúrgico. Por isso, acredita-se que uma administração do fármaco por gavagem possa apresentar melhores resultados.

Em vários estudos, nos quais se administra ranelato de estrôncio em modelos experimentais em ratos, utiliza-se uma linhagem denominada *Sprague Dawley* ou *Fischer* (AMMANN; ROBIN & SHEN, 2004; MAÏMOUN *et al.*, 2010; OZTURAN *et al.*, 2010). Por se tratar de linhagens de fácil manipulação, os pesquisadores têm a preferência por ela. O presente estudo, no entanto, utilizou a linhagem *Wistar*, mais comumente usada em pesquisas no Brasil, mas que se mostra como uma linhagem mais difícil de lidar, quando se trata de trabalhos que exigem a contenção do animal.

A interação entre o selante de fibrina e o estrôncio, ou mesmo este elemento associado ao selante de fibrina e à hidroxiapatita, no metabolismo ósseo, ainda necessita de maiores informações. Contudo, esta pesquisa proporcionou conhecimentos técnicos e científicos acerca desse metabolismo, assim como dos biomateriais e suas aplicações. Foi possível um melhor entendimento das concentrações plasmáticas de cálcio e estrôncio e suas relações com a regeneração óssea associada a biomateriais. Entretanto, pelas limitações metodológicas, não foi possível determinar, de forma efetiva, se os biomateriais interagiram no metabolismo do cálcio e do estrôncio.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que:

- A administração de ranelato de estrôncio produziu variações na concentração plasmática dos elementos estrôncio e cálcio.
- A concentração plasmática de estrôncio aumentou após a administração de ranelato de estrôncio.
- Dentre os grupos em que houve administração de ranelato de estrôncio, a menor concentração plasmática do estrôncio foi observada no grupo com implantação de hidroxiapatita.
- A concentração plasmática do cálcio foi reduzida após a administração de ranelato de estrôncio.
- Dentre os grupos em que houve administração de ranelato de estrôncio, a maior concentração plasmática do cálcio foi observada no grupo com implantação de microesferas de hidroxiapatita.

REFERÊNCIAS

- AMMANN et al. Strontium ranelate treatment improves trabecular and cortical intrinsic bone tissue quality, a determinant of bone strength. **J. Bone and Miner. Res.**, v. 22, n. 7, p. 1419-1425, 2007.
- AMMANN, P.; ROBIN, B.; SHEN, V. Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. **J. Bone Miner. Res.**, v. 19, n. 12, p. 2012-2020, 2004.
- ANDRADE, A. L.; DOMINGUES, R. Z. Cerâmicas bioativas - estado de arte. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p 100-104, fev. 2006.
- ARMIJO, J. A. Absorción, distribución y eliminación de los fármacos. In: FLÓREZ, J; ARMIJO, J. A.; MEDIAVILLA. **Farmacol. hum.** 3ª ed. Barcelona: Masson, 1998. cap. 4, p. 47-72.
- ARRIBANÇA; CARDOSO. Aplicações da Bioengenharia em Medicina Dentária. **Rev. da Fac. de Ciênc. da Saúde.**, v.6, p. 40- 49, 2009.
- BASURTO et al. Eficacia del ranelato de estroncio para la mineralización ósea em mujeres posmenopáusicas. **Ginecol. Obstet. Mex.**, v. 77, n. 5, p. 227-230, 2009.
- BAZOT, D.; DELANNOY, P.; MARIE, P. J. Long-Term treatment with strontium ranelate increases vertebral bone mass without deleterious effect in mice. **Metab.: Clinical Experimental**, v. 51, n. 7, p. 906-911, 2002.
- BLAKE, G. M.; FOGELMAN, I. Long- term effect of strontium ranelate treatment on BMD. **J. Bone and Miner. Res.**, v. 20, n. 11, p. 1901- 1904, 2005.
- BOONEN, Steven. Addressing and meeting the needs of osteoporotic patients with strontium ranelate: a review. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 18, supl. 1, p. S21-S27, 2006.
- BROWN, E. M. Is the calcium receptor a molecular target for the actions of strontium on bone? **Osteoporos. Int.**, v. 14, supl. 3, p. S25-S34, 2003.
- BRUYERE, O et al. Relationship between bone mineral density changes and fracture risk reduction in patients treated with strontium ranelate. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 92, n. 8, p. 3076-3081, 2007.
- CABRERA et al. Strontium and Bone. **J. Bone and Miner. Res.**, v. 14, n. 5, 661-668, 1999.
- CEBESOY et al. Effect of strontium ranelate on fracture healing in rat tibia. **J. Bone Spine**, v. 74, n. 6, p. 590-593, 2007.
- CHATTOPADHYAY et al. The calcium sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate - induced osteoblast proliferation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 74, n. 3, p. 438-447, 2007.
- CORTINA, E. L.; LÓPEZ, M. G. El ranelato de estroncio en el tratamiento de la osteoporosis. **Actual. en Farmacol. y Terapêut.**, v. 6, n. 2, p. 99-103, 2008.
- COSTA et al. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. **Rev. Eletr. de Mat. e Proc.**, v. 4, n. 3, p. 29-38, 2009.

- COSTA et al. Preparation of hybrid biomaterials for bone tissue engineering. **Mat. Res.**, v.10, n. 1, p. 21-26, 2007.
- D'HAESE et al. Measurement of strontium in serum, urine, bone, and soft tissues by Zeeman atomic absorption spectrometry. **Clin. Chem.**, v. 43, n. 1, p. 121-128, 1997.
- DAGANG, G.; KEWEI, X.; YONG, H. The influence of Sr doses on the in vitro biocompatibility and in vivo degradability of single-phase Sr-incorporated HAP cement. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 86, n. 4, p. 947-958, 2008.
- DAHL et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. **Bone**, v. 28, nº 4, p. 446-453, 2001.
- DI BERNARDO et al. Valoración de niveles séricos y óseos de cálcio, cobre, estrôncio, hierro, magnésio y zinc en pacientes con osteoporosis. **VITAE Acad. Biom. Dig.**, n. 23, 2005.
- DUSSE et al. Plasma rico em plaquetas (PRP) e sua aplicação em odontologia. **RBAC**, v. 40, n. 3, p. 193-197, 2008.
- ESLAVA, A. T.; HERAS, C. B.; LÓPEZ, D. P. El ranelato de estroncio en el tratamiento de la osteoporosis. **Semin. Fund. Esp. Reumatol.**, v. 6, n. 2, p. 43-52, 2005.
- FUCHS et al. Calculating clinically relevant drug doses to use in animal studies. **Osteoporos Int.**, v. 19, n. 12, p. 1815-1817, 2008.
- GASPARINI et al. Homeostase do cálcio e marcadores do metabolismo ósseo no hipertireoidismo felino – revisão. **Arch. of Veterin. Scienc.**, v.12, n.1, p. 17-27, 2007.
- GEOFFROY et al. Strontium ranelate decreases the incidence of new caudal vertebral fractures in a growing mouse model with spontaneous fractures by improving bone microarchitecture. **Osteoporos. Int.**, 2010, DOI 10.1007/s00198-010-1193-6.
- GONZÁLEZ, Felix H. Diaz; SILVA, Sérgio Ceroni. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2006.
- GRYNPAS et al. Strontium increases vertebral bone volume in rats at a low dose that does not induce detectable mineralization defect. **Bone**, v. 18, n. 3, p. 253-259, 1996.
- GRYNPAS, M. D.; MARIE, P. J. Effects of low doses of strontium on bone quality and quantity in rats. **Bone**, v.11, n. 5, p. 313- 319, 1990.
- GUYTON, Arthur. **Fisiologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- INFARMED. Folheto informativo: informação para o utilizador - Tissucol duo 500. Portugal, 2007. Disponível em:
<http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=43748&tipo_doc=fi>
Acesso em: 20 ago. 2010.
- JANES, J. M.; McCASLIN, F. The effect of strontium lactate in the treatment of osteoporosis. **Proc. Mayo Clin.**, v. 34, p. 329- 334, 1959.

KAWACHI et al. Biocerâmicas: tendência e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quím. Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 395, p. 81-98, 2002.

LI et al. Strontium ranelate treatment enhances hydroxyapatite-coated titanium screws fixation in osteoporotic rats. **J. Orthop. Res.**, v. 28, n. 5, p. 578-582, 2010.

LI et al. Strontium-calcium coadministration stimulates bone matrix osteogenic factor expression and new bone formation in a large animal model. **J. Orthop. Res.**, v. 27, n. 6, p. 758-752, 2009.

LLINAS et al. Structural studies of human alkaline phosphatase in complex with strontium: implication for its secondary effect in bones. **Protein Sci.**, v. 15, n. 7, p. 1691-1700, 2006.

LÓPEZ, D. C. **Impacto del tratamiento con alendronato más cálcio y vitamina D versus calcio y vitamina D en pacientes osteoporóticos que han sufrido una fractura de cadera.** 2009. 206 f. Tese (Doutorado) – Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2009. Disponível em: < <http://eprints.ucm.es/9212/1/T31125.pdf>>. Acesso 2 jun. 2010.

MAÏMOUN et al. Strontium ranelate improves implant osseointegration. **Bone**, v. 46, n. 5, p. 1436-1441, 2010.

MARIE, Pierre. Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. **Curr. Opin. in Rheumatol.**, v. 18, Supl. 1, p. S11-S15, 2006.

MARIE et al. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. **Calcif Tissue Int.**, v. 69, n. 3, 2001.

MARIE et al. Effect of low doses of stable strontium on bone metabolism in rats. **Miner. Electrolyte Metab.**, v. 11, n. 1, p. 5-13, 1985.

MEROLLI, A.; THOMAS, J. **Biomaterials in Hand Surgery.** Milan: Springer, 2009.

MOROHASHI, T.; SANO, T.; YAMADA, S. Effects of strontium on calcium metabolism in rats. I. A distinction between the pharmacological and toxic doses. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 64, n. 3, p.155-162, 1994.

NAGEM FILHO et al. Engenharia tecidual dos biomateriais. **Innovations Implant. Journal: Biomaterials and Esthetics**, v. 2, n. 3, 2007.

NIELSEN, S. P. The role biological of strontium. **Bone**, v. 35, n. 3, p. 583-588, 2004.

OSATHANON et al. Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. **Biomat.**, v. 29, n. 30, p. 4091-4099, 2008.

OZTURAN et al. Effect of strontium ranelate on fracture healing in the osteoporotic rats. **J. Orthop. Res.**, 2010, DOI: 10.1002/jor.21204.

- PAIVA, F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. **Curso de manipulação de animais de laboratório**. Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Salvador, 2005. Disponível em: <http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf>. Acesso em: 02 ago. 2010.
- PAULA et al. Hydroxyapatite- alginate biocomposite promotes bone mineralization in different length scales in vivo. **Front. Mater. Sci.China.**, v. 3,n. 2, p. 145-153, 2009.
- PI, M.; QUARLES, L. D. A novel cation-sensing mechanism in osteoblasts is a molecular target for strontium. **J. Bone Miner. Res.**, v. 19, n. 5, p. 862-869, 2004.
- PINTO, N. G. V. **Estudo dos efeitos da irradiação em sangue total, matriz celular e plasma usando espalhamento coerente de raios X e fluorescência de raio X por reflexão total**. 2008. 116 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Nuclear) – Pós-graduação de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <<http://www.con.ufrj.br/DScTeses/teses2008/Tese%20de%20DSC%20Nivia%20Villela.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2010.
- QIU, K. et al. Effect of strontium ions on the growth of ROS 17/ 2.8 cells on porous calcium polyphosphate scaffolds. **Biomater.**, v. 27, p.1277-1286, 2006.
- ROCHA et al. Teores de estrôncio sérico em pacientes portadores de insuficiência renal crônica em tratamento hemodialítico. **J. Bras. Nefrol.**, v. 27, n. 1, 2005.
- RUIZ et al. The new frontier of bone formation: a breakthrough in postmenopausal osteoporosis?. **Climacteric.**, v. 12, n. 4: 286-300, 2009.
- SHARAN et al. Role of calcium-sensing receptor in bone biology. **Indian J. Med. Res.**, v. 127, n. 3, p. 274-286, 2008.
- SHORR, E.; CARTER, A. C. The usefulness of strontium as an adjuvant to calcium in the remineralization of the skeleton in osteoporosis in man. **Bull. Hosp. Jt. Dis.**, v. 13, p. 59-66, 1952.
- SKORYNA, S. C. Effects of oral supplementation with stable strontium. **CMA Journal.**, v. 125, p. 703-712, 1981.
- TAKAGI, K.; URIST, M. R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. **Ann. of Surg.**, v. 196, n. 1, p. 100-109, 1982.
- TEIXEIRA, L. J. C. **Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Escola de Ciências da Saúde, Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Duque de Caxias, 2009. Disponível em: <http://www.unigranrio.br/unidades_adm/pro_reitorias/propep/stricto_sensu/cursos/mestrado/pg_odontologia/galleries/download/Dissertacao_Leonardo_Jorge.pdf>. Acesso em: 9 abr. 2010.
- TERRA et al. The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v.11, n. 3, p. 568-577, 2009.

TIAN et al. In vivo study of porous strontium-doped calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v. 20, n. 7, p. 1505-1512, 2009.

TOURNIS, S. Improvement in bone strength parameters. The role of strontium ranelate. **J. Musculoskelet Neuronal Interact.**, v. 7, n. 3, p. 266- 267, 2007.

TOURNIS, S.; ECONOMOPOULOS, D.; LYRITIS, G. P. Strontium ranelate: a novel treatment in postmenopausal osteoporosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1092, p. 403-407, 2006.

TREDWELL et al. Use of fibrin sealants for the localized, controlled release of cefazolin. **Can. J. Surg.**, v. 49, n. 5, p. 347-352, 2006.

UNFER, T. C. **Influência da terapia de reposição hormonal sobre a atividade de enzimas antioxidantes, níveis de estrôncio e ferro, e metabolismo ósseo em mulheres.** 2006. 82 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) - Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006. Disponível em: <<http://www.ufsm.br/ppgbtox/Documentos/tese%20da%20tais.doc>>. Acesso em: 4 ago. 2009.

VERBERCKMOES, S. C.; BROE, M. E.; D'HAESE, P. C.; Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization. **Kidney Int.**, v. 64, p. 534-543, 2003.

VERONEZE, M. H. **Influência da suplementação de cálcio sobre os níveis e os indicadores da exposição ao chumbo em mulheres na pós-menopausa.** 2008. 129 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008. Disponível em: <<http://www.ufsm.br/ppgbtox/Documentos/marla.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2010.

WANG, X.; YE, J. Variation of crystal structure of hydroxyapatite in calcium phosphate cement by the substitution of strontium ions. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v. 19, n. 3, p. 1183-1186, 2008.

WELCH, W.; HAMAR, W.; FETTMAN, J. Method comparison for calcium determination by flame atomic absorption spectrophotometry in the presence of phosphate. **Clin. Chem.**, v. 36, n. 2, p. 351 -354, 1990.

World Health Organization (WHO). Strontium and strontium compounds. **Concise International Chemical Assessment Document 77.** 2010, 1- 35. Disponível em : <<http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad77.pdf>>. Acesso em : 10 jul. 2010.

YANG, Y.; DENNISON, D.; ONG, J. L. Protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to hydroxyapatite of different crystallinities. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 20, n. 2, p.187-192, 2005.

ZAMBURLINI, M.; PEJOVIC'-MILIC', A.; CHETTLE, D. R. Spectrometry methods for in vivo bone strontium measurements. **X-Ray Spectrom.**, v. 37, n. 1, p. 42-50, 2008.

ZAMBUZZI et al. Avaliação histológica do implante do osso fetal bovino acelular e desmineralizado em subcutâneo de ratos. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 41, n. 6, p. 227-232, 2006.

ANEXOS

**APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM ANIMAIS (CEUA) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE FEIRA DE SANTANA (UEFS)**



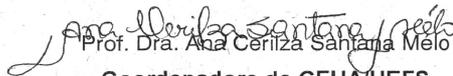
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**
Av. Universitária, S/N - Módulo I - 44.031-460 - Feira de Santana -Ba -
Fone: (75) 3224-8398

Feira de Santana, 26 de agosto de 2009.

PARECER

O projeto N° 003/2009, "AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA, RADIOGRÁFICA E BIOQUÍMICA DA UTILIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA NO REPARO DE DEFEITO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATO", de autoria dos estudantes: Ana Clara Alves de Carvalho, Isabela Cerqueira Barreto, Luciana Soares de Almeida Freitas Oliveira e Marion Alves do Nascimento, sob a orientação dos professores Dr. Aryon de Almeida Barbosa Junior e Dra. Fabiana Paim Rosa, incluiu na versão final as modificações e correções encaminhados pelo parecerista (1º e 2º pareceres), as quais foram aceitas pela autora no Item Objetivo Geral e no Formulário do Protocolo Experimental.

Diante do exposto, sou **favorável** à execução do projeto, conforme reunião de conselho do CEUA/UEFS do dia 26 Agosto de 2009.


Prof. Dra. Ana Cerilza Santana Melo

Coordenadora do CEUA/UEFS

Port. 497/2008

Prof.ª Dr.ª Ana Cerilza Santana Melo
Coordenadora do CEUA
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UEFS
Port. 497/2008