



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

**MARIANA DE OLIVEIRA VIANA VERAS**

**AVALIAÇÃO DE FITAS DE MAGNÉSIO, COM OU SEM REVESTIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO, E SUA INFLUÊNCIA NA VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO E ATIVAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS MURINOS, ALÉM DA BIOCOMPATIBILIDADE EM DORSO DE RATOS WISTAR**

**Fortaleza**

**2021**

**MARIANA DE OLIVEIRA VIANA VERAS**

**AVALIAÇÃO DE FITAS DE MAGNÉSIO, COM OU SEM REVSTIMENTO COM FOSFATO DE CÁLCIO, E SUA INFLUÊNCIA NA VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO E ATIVAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS MURINOS, ALÉM DA BIÓCOMPABILIDADE EM DORSO DE RATOS WISTAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Morfofuncionais.  
Área de concentração: Morfofisiologia óssea e articular.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão  
Co-orientadora: Prof. Dra. Conceição da Silva Martins

**Fortaleza**

**2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

V584a Veras, Mariana de Oliveira Viana.

Avaliação de fitas de magnésio, com ou sem revestimento com fosfato de cálcio, e sua influência na viabilidade, proliferação e ativação de osteoblastos murinos, além da biocompatibilidade em dorso de ratos wistar / Mariana de Oliveira Viana Veras. – 2021.

70 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

Coorientação: Profa. Dra. Conceição da Silva Martins.

1. Osteoblastos. 2. Magnésio. 3. Fosfatos. 4. Teste de materiais. I. Título.

CDD 611

---

MARIANA DE OLIVEIRA VIANA VERAS

Avaliação de fitas de magnésio, com ou sem revestimento de fosfato de cálcio, e sua influência na viabilidade, proliferação e ativação de osteoblastos murinos, além da biocompatibilidade em dorso de ratos wistar

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Morfofuncionais.  
Área de concentração: Morfofisiologia óssea e articular.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão  
Co-orientadora: Prof. Dra. Conceição da Silva Martins

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Renata Ferreira Carvalho Leitão  
Orientadora (UFC)

---

Profa. Dra. Ana Beatriz Duarte Graça  
Examinadora externa ao Programa

---

Prof. Dr. Abrahão Cavalcante Gomes de Souza Carvalho  
Examinador externo ao Programa

---

Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fachine  
Examinador externo ao Programa

---

Profa. Dra. Fátima Regina Nunes de Sousa  
Examinadora externa à Instituição

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus por me provar que tudo é possível quando temos fé.

Á meus pais, Fernando e Maruzza, que sempre foram incentivadores dos meus estudos e crescimento profissional.

Á meus filhos, Lucas e Daniel (ainda na barriga), que sempre foram minha alegria e renovação nos momentos de desânimo. Á meu marido, Roberto, parceiro de profissão e de vida, que nunca deixou que eu desistisse.

Á minha orientadora Profa. Dra. Renata Ferreira Carvalho Leitão, por todos os ensinamentos, não apenas acadêmicos, mas também de vida. Uma grande inspiração como profissional e pessoa.

Á minha co-orientadora, e agora amiga, Profa Dra Conceição da Silva Martins por todos os ensinamentos e generosidade. Por sempre se mostrar uma pessoa íntegra e disposta a ajudar.

Ao Dr Sílvio Albuquerque (que infelizmente nos deixou de forma precoce e não pôde presenciar a conclusão desse estudo), por ter fabricado e fornecido o biomaterial utilizado nessa pesquisa juntamente com seu vasto conhecimento sobre o assunto.

Á meu grande amigo, Gildênio Estevam Freire, por ter me apresentado ao mundo da pesquisa, ter me acompanhado e torcido por mim durante essa trajetória.

Ás colegas de laboratório Luciana, Tâmara, Theídes, Andréia, Luana, Vanessa que sempre estiveram dispostas a ajudar dentro e fora do laboratório.

Ás profas Dras Ana Beatriz e Fátima Regina a quem eu tive o prazer de acompanhar enquanto eram pós-graduandas no laboratório e agora seguem um brilhante caminho na vida acadêmica.

Aos estudantes de Iniciação Científica, Mateus, Stephanie e Yves, pela disponibilidade e ajuda na execução dos experimentos.

Ao laboratório NEMPI e seus colaboradores Sr. Marcos, Laísa, Júnior, Flávia e Sr. Ivan e a todos os professores, agradeço pela disponibilidade e ajuda.

## RESUMO

Os biomateriais para enxertia óssea são utilizados como arcabouços para favorecer o processo de osteogênese nos casos em que os mecanismos fisiológicos não são suficientes para reparar o dano tecidual. Diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de buscar técnicas e substitutos ósseos adequados. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de fitas de magnésio (Mg1) e Mg revestidas com fosfato de cálcio (Mg2), desenvolvidas e caracterizadas por nosso grupo de pesquisa, na viabilidade e ativação de osteoblastos murinos *in vitro*, assim como a sua biocompatibilidade, através da implantação em tecido subcutâneo de ratos Wistar. A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas através do ensaio MTT e MTS respectivamente, após 24 e 48 horas de incubação dos osteoblastos com as fitas de magnésio. A quantificação dos níveis de fosfatase alcalina óssea (FAO) no meio de cultura após 24 horas, 7 e 15 dias de incubação foi um dos parâmetros utilizados para investigar a atividade dos osteoblastos, além do ensaio de mineralização pela coloração de Von Kossa, após 21 dias de cultivo celular. A morfologia e morte celular também foram investigadas por microscopia óptica de fluorescência e imunomarcagem para caspase 3 e 9, respectivamente. Para a investigação dos mecanismos envolvidos na ativação celular, as expressões proteicas de BMP-2, OPG e RANK-L foram investigadas por imunomarcagem. Nos estudos *in vivo*, para a avaliação da biocompatibilidade, investigou-se a resposta inflamatória induzida pela implantação das fitas no dorso de ratos Wistar em diferentes tempos de observação, considerando o infiltrado de células inflamatórias ao redor do local ocupado pelo biomaterial e número e área dos vasos sanguíneos. Os resultados mostraram que após 24 e 48h horas de incubação, observou-se, nos grupos Mg1 e Mg2, aumento significativo do número de células viáveis. Não foram observadas, no entanto, diferenças significativas na proliferação celular entre os grupos. O grupo Mg2 apresentou mineralização mais intensa comparado aos grupos Controle e Mg, além de aumento significativo da atividade da FAO. As células cultivadas em ambos os tipos de tira de magnésio apresentaram maior expressão de BMP-2 e OPG, em comparação com as células cultivadas sem a presença de biomaterial. Não houve diferença na expressão de RANK-L entre os três grupos. As tiras Mg2 mostraram-se biocompatíveis. Os resultados sugerem um efeito positivo das fitas Mg1 e Mg2 na proliferação, viabilidade e ativação de osteoblastos, com participação de BMP-2 e OPG. A associação dos dados *in vitro* e da biocompatibilidade constatada no estudo *in vivo*, sugere fortemente o uso desse biomaterial na regeneração de defeitos ósseos, especialmente defeitos críticos.

**Palavras-chave:** Osteoblastos, Magnésio, Fosfatos, Teste de materiais.

## ABSTRACT

Biomaterials for bone grafting are used as scaffolds to promote the osteogenesis process in cases where physiological mechanisms are not sufficient to repair tissue damage. Several academic studies carried out in order to seek techniques and adequate bone substitutes. Therefore, the objective of this study was evaluate the effect of magnesium (Mg1) and Mg tapes coated with calcium phosphate (Mg2), developed and characterized by our research group, on the viability and activation of murine osteoblasts *in vitro*, as well as their biocompatibility through its application on the back of Wistar rats. Cell viability and proliferation were assessed using the MTT and MTS assay, respectively, after 24 and 48 hours of osteoblast incubation with magnesium tapes. Quantification of bone alkaline phosphatase (FAO) levels in the culture medium after 24 hours, 7 and 15 days of incubation was one of the parameters used to investigate osteoblast activity, in addition to the mineralization assay by Von Kossa staining, after 21 cell culture days. Cell morphology and death were also investigated by fluorescence optical microscopy and immunostaining for caspase 3 and 9, respectively. For the investigation of the mechanisms involved in cell activation, the protein expressions of BMP-2, OPG and RANK-L were investigated by immunostaining. In *in vivo* studies, for the evaluation of biocompatibility, the inflammatory response induced by the implantation of the tapes on the back of Wistar rats was investigated at different observation times, considering the infiltration of inflammatory cells around the site occupied by the biomaterial, and area and number of the vessels blood. The results showed that after 24 and 48 hours of incubation, a significant increase in the number of viable cells was observed in the Mg1 and Mg2 groups. The MgF group presented more intense mineralization compared to the Control and Mg groups, in addition to a significant increase in FAO activity. Cells cultured on both types of magnesium tape generate greater expression of BMP-2 and OPG, compared to cells cultured without the presence of biomaterial. There was no difference in the expression of RANK-L between the three groups. As Mg2 tapes, biocompatibles are differentiated. The results obtained a positive effect of Mg1 and Mg2 tapes on the proliferation, viability and participation of osteoblasts, with BMP-2 and OPG. The association of *in vitro* data and biocompatibility found in the *in vivo* study, strongly strongly with the use of biomaterial in the regeneration of bone defects, especially basic defects.

**Keywords:** Osteoblasts, Magnesium, Phosphate, Materials tests,

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A estrutura hierárquica do osso típico em várias escalas de comprimento.....	10
<b>Figura 2.</b> Esquema representando a via RANK/RANK-L/OPG.....	12
<b>Figura 3.</b> Cultivo dos osteoblastos (OFCOL II) .....	25
<b>Figura 4.</b> Padrões de DRX das amostras de magnésio revestidas com fosfato de cálcio. ....	36
<b>Figura 5.</b> Micrografias eletrônicas de varredura da amostra de magnésio revestida com fosfato de cálcio. ....	37
<b>Figura 6.</b> Valores de pH do meio de imersão de Mg1 e Mg2 em três diferentes períodos de tempo: 1 dia, 7 dias e 15 dias.....	38
<b>Figura 7.</b> Imagens fotográficas padronizadas das amostras dos grupos Mg1 e Mg2 após o teste de imersão nos três períodos de tempo diferentes: 1 dia, 7 dias e 15 dias .....	39
<b>Figura 8.</b> Medida em mm da área de degradação das amostras dos grupos Mg1 e Mg2 .....	39
<b>Figura 9.</b> Efeito das tiras de magnésio, com ou sem revestimento com fosfato de cálcio, sobre a viabilidade de osteoblastos murinos (OFCOL II) após 24 horas e 48 horas de cultivo celular.....	38
<b>Figura 10.</b> Efeito das tiras de magnésio, com ou sem revestimento com fosfato de cálcio sobre a proliferação de osteoblastos murinos (OFCOL II) após 24 horas e 48 horas de cultivo celular .....	41
<b>Figura 11.</b> Efeito das tiras de magnésio, com ou sem revestimento com fosfato de cálcio, sobre os níveis de fosfatase alcalina produzida pelos osteoblastos murinos (OFCOL II) após 24 horas, 7 dias e 15 dias de cultivo celular.....	42
<b>Figura 12.</b> Imagens representativas do ensaio de mineralização .....	42
<b>Figura 13.</b> Quantificação dos depósitos de cálcio no ensaio de mineralização descrito por Von Kossa em osteoblastos OFCOL II após o período de 21 dias de cultivo .....	43
<b>Figura 14.</b> Imagens representativas do ensaio de imunofluorescência. ....	<b>Erro!</b>
<b>Indicador não definido.</b>	
<b>Figura 15.</b> Imagens de imunofluorescência para caspase 3.....	45

<b>Figuras 16.</b> Imagens de imunofluorescência para caspase 9.....	46
<b>Figura 17.</b> Imagens representativas de imunofluorescência. Figuras 17A, 17D e 17G) Expressão das proteínas BMP-2, OPG e Rank-L ..... <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
<b>Figura 18.</b> Análise quantitativa de percentual de imunofluorescência para BMP-2, OPG e RANK-L.....	48
<b>Figura 19.</b> Fotomicrografia do tecido subcutâneo adjacente às membranas corada por H&E .....	50
<b>Figura 20.</b> Fotomicrografia do tecido subcutâneo adjacente às membranas corada por Tricômio de Mallory. ....	51
<b>Figura 21.</b> Quantificação da área dos vasos sanguíneos .....	52

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	9
1.1 Osteoimunologia .....	9
1.2 Biomateriais .....	13
1.3 Magnésio .....	16
2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA .....	18
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Preparação do biomaterial.....	21
4.1.1 Protocolo de revestimento.....	22
4.2 Caracterização do biomaterial.....	22
4.2.1 Microestrutura.....	22
4.2.2 Propriedades mecânicas.....	22
4.2.3 Biodegradação.....	23
4.3 Testes in vitro.....	24
4.3.1 Cultura secundária.....	24
4.3.2 Grupos experimentais dos testes in vitro.....	25
4.3.3 Teste de viabilidade celular pelo método direto (MTT).....	26
4.3.4 Teste de proliferação (MTS).....	27
4.3.5 Dosagem de fosfatase alcalina óssea (FAO).....	27
4.3.6 Formação de nódulos minerais (ensaio de Von Kossa).....	28
4.3.7 Avaliação da morfologia celular por confocal.....	29
4.3.8 Apoptose celular.....	30

4.3.9	Efeito na via RANK/RANKL/OPG e produção de BMP-2.....	30
4.4	Testes in vivo.....	32
4.4.1	Aspectos éticos.....	32
4.4.2	Animais.....	32
4.4.3	Teste de biocompatibilidade.....	32
4.4.4	Parâmetros avaliados.....	34
4.4.4.1	Análise histológica.....	34
4.5	Análise estatística.....	35
5	RESULTADOS.....	36
5.1	Caracterização do biomaterial.....	36
5.1.2	Microestrutura.....	36
5.1.3	Teste de tração.....	37
5.1.4	Biodegradação.....	37
5.2	Cultura secundária.....	39
5.2.1	Avaliação da viabilidade celular.....	39
5.2.2	Avaliação da proliferação celular.....	40
5.2.3	Avaliação dos níveis de fosfatase alcalina óssea.....	41
5.2.4	Avaliação da mineralização produzida por osteoblastos.....	42
5.2.5	Avaliação da morfologia e adesão celular.....	43
5.2.6	Participação da via RANK/RANK-L/OPG e produção de BMP-2 na ativação de osteoblastos.....	47
5.2.7	Biocompatibilidade.....	48
6	Discussão.....	53
7	Conclusão.....	62
	Referências.....	63
	Anexo 1 .....	68

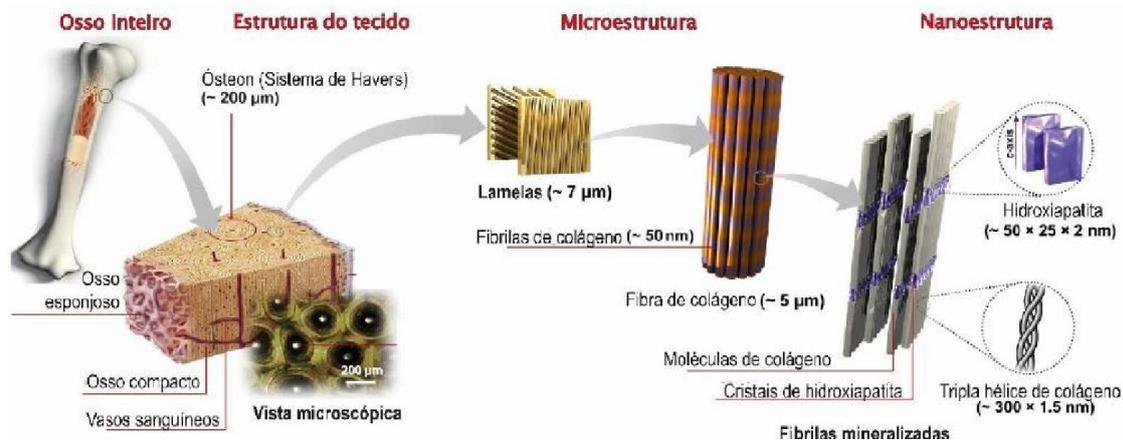


# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 OSTEOIMUNOLOGIA

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea (Figura 1). As funções do tecido ósseo incluem regulação dos níveis de cálcio no sangue, locomoção, armazenamento de fosfato, suporte e proteção de tecidos moles, incluindo proteção de células da medula óssea (DOWNEY; SIEGEL, 2006). Trata-se de um tecido altamente dinâmico, que possui, como uma das principais características, alto grau de remodelamento, o que permite a renovação do esqueleto por meio da remoção do osso antigo e formação de novo osso (CLARKE, 2008). Dentre as células que caracterizam esse tecido estão os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoblastos, produtores de matriz orgânica; e os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas que reabsorvem o tecido ósseo, participando do processo de remodelação óssea (LEIBBRANDT *et al.*, 2008). A matriz orgânica é extremamente organizada, constituída em sua maior parte por colágeno tipo I, e uma fase mineral formada essencialmente por cristais de fosfato de cálcio, sob a forma de hidroxiapatita. A combinação da fase mineral e da fase orgânica confere ao tecido ósseo propriedades únicas que o tornam muito resistente às solicitações mecânicas (WEITZMANN, 2013).

Figura 1. A estrutura hierárquica do osso típico em várias escalas de comprimento.



Fonte: Carvalho, 2017

Os osteoblastos maduros são células sem capacidade de divisão, mas metabolicamente ativas. Dentre as proteínas sintetizadas pelos osteoblastos estão o colágeno tipo I e proteínas não-colágenas como a osteonectina e a osteocalcina (MATTHEW *et al.*, 2013). Estas proteínas têm uma importância fundamental no processo de mineralização, ou seja, na ligação dos cristais à matriz colágena de hidroxiapatita. Além disso, os osteoblastos sintetizam diversos fatores de crescimento, que ficam incorporados na matriz óssea, desempenhando um papel determinante, tanto na formação do tecido ósseo como na diferenciação e na atividade dos osteoclastos. Essas células também participam da calcificação da matriz, através da secreção de pequenas vesículas ricas em fosfatase alcalina, liberadas no interior da matriz extracelular (TSAY *et al.*, 2010).

Em condições fisiológicas, o tecido ósseo é periodicamente reabsorvido pelos osteoclastos, enquanto novo osso é formado pelos osteoblastos. Há evidências de que os osteócitos, células da linhagem osteoblástica, alojadas em lacunas da matriz óssea, atuam como mecanossensores e orquestradores do

processo de remodelação óssea (BONEWALD, 2011; CLARKE, 2008). A capacidade de remodelação confere ao osso, um ótimo potencial de reparação de fraturas, reconstruindo a estrutura original do tecido ósseo perdido. Como estão funcionalmente interligadas, as alterações que ocorrem na remodelação óssea interferem de forma decisiva na qualidade e quantidade do reparo ósseo. (TAKAYNAGI, 2005; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; KEARNS; KHOSLA; KOSTENUIK, 2008).

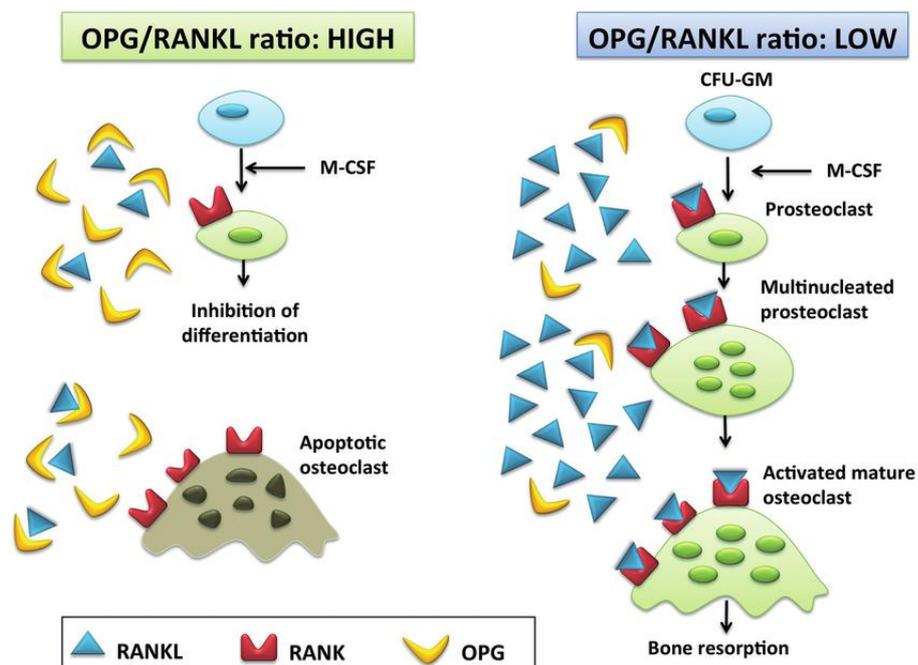
O remodelamento ósseo, portanto, é o processo metabólico predominante na regulação da estrutura e função do osso durante a vida adulta, com a participação chave de osteoblastos e osteoclastos. As células osteoprogenitoras, de origem mesodérmica, exercem importante função na formação óssea, considerando sua capacidade de diferenciação em osteoblastos (EVERTS *et al.*, 2002).

A regulação do remodelamento ósseo ocorre por meio de fatores locais e sistêmicos, que exercem seus efeitos sobre a replicação de células indiferenciadas, recrutamento e ativação das células ósseas (CHEN *et al.*, 2008). Entre os fatores locais que participam da regulação do remodelamento ósseo, a via RANK/RANKL/OPG (Figura 2) prova que o processo de reabsorção e formação são acoplados, tendo como objetivo manter a integridade esquelética (HADJIDAKIS; ADROULAKIS, 2006). A proteína transmembrana RANKL, conhecida como ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B é sintetizada pelos osteoblastos, e ao se ligar ao seu receptor RANK, conhecido como receptor ativador do fator nuclear kappa B (NFK-B), expresso por pré-osteoclastos, estimula a diferenciação dos osteoclastos dando início a reabsorção óssea, além de inibir a apoptose de osteoclastos maduros (PEREIRA

*et al.*, 2011). Os osteoblastos sintetizam ainda, a osteoprotegerina (OPG), proteína que apresenta alta afinidade por RANK e compete, portanto, com o RANKL pelo sítio de ligação. (BAUD'HUIN *et al.*, 2007). A proporção entre RANKL e OPG, é portanto, determinante, para regular a atividade osteoclástica e a reabsorção óssea.

**Figura 2. Esquema representando a via RANK/RANK-L/OPG.**

Via RANK/RANKL/OPG na remodelação óssea. Os osteoblastos produzem RANKL e OPG, reguladores da remodelação óssea. RANKL induz a proliferação e diferenciação de osteoclastos maduros. OPG inibe a ligação da diferenciação de osteoclastos ao RANKL, consequentemente, bloqueando a ligação entre o receptor RANKL e RANK presente no precursor de osteoclastos



Fonte: Adaptado de Castrogiovanni *et al.*, 2016

Desse modo, as células da linha osteoblástica podem controlar o desenvolvimento e a atividade osteoclástica em resposta a diferentes estímulos mecânicos, hormonais e inflamatórios. A presença de altos níveis de RANKL promove, portanto, a osteoclastogênese, enquanto que uma maior expressão de OPG resulta em sua diminuição, ou mesmo na apoptose dos osteoclastos

(GINALDI; DE MARTINIS, 2016).

As BMPs são um grupo de proteínas osteoindutoras, com aminoácidos e polipeptídeos arranjados sequencialmente, as quais são capazes de estimular as células-tronco mesenquimais a se diferenciarem em osteoblastos e formarem osso (ALONSO *et al.*, 2010). A atividade osteoindutiva das proteínas ósseas morfogenéticas somado à sua presença no tecido ósseo sugerem que elas são importantes reguladores no processo de reparação óssea e podem estar envolvidas na manutenção destes tecidos (JAMES *et al.*, 2016). Elas fazem parte da família de fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e inclui uma subfamília baseada em suas seqüências de aminoácidos. E relatou que as BMPs podem se apresentar sob duas formas: a) proteínas morfogenéticas ósseas derivadas do osso; b) proteínas morfogenéticas ósseas humanas recombinantes (rhBMP) (SWEENEY *et al.*, 2012).

## 1.2 BIOMATERIAIS

É imprescindível para o bom funcionamento do organismo que os processos de formação e reabsorção óssea ocorram em equilíbrio. Nas situações em que os mecanismos fisiológicos não são suficientes para reparar o dano tecidual, os biomateriais para enxertia óssea são utilizados como arcabouços para favorecer o processo de osteogênese (BANORIYA *et al.*, 2017).

A Sociedade Europeia de Biomateriais define biomateriais como “Qualquer substância, excluindo fármacos, ou combinação de substâncias sintética ou natural, que pode ser usada em qualquer período, como tratamento total ou parcial, aumento ou reposição de qualquer tecido ou órgão ou função do corpo” (TOREZAN; FONSECA, 2010);

O enxerto ósseo autólogo é considerado o padrão ouro em termos de regeneração, sendo o tratamento mais seguro e eficaz, pois utiliza osso do próprio paciente, fornecendo um substrato natural para novas células osteogênicas no local do enxerto, permitindo a cicatrização e remodelagem do osso lesado (GOMEZ-BARRENA *et al.*, 2011). No entanto, uma grande desvantagem dos auto-enxertos envolve dor e infecção ao redor da área óssea doadora, limitação da disponibilidade óssea para doação, especialmente em crianças ou adultos previamente submetidos a procedimentos cirúrgicos no local e integração incompleta do osso enxertado (DELLOVE *et al.*, 2007). Diferentemente do osso autólogo, os enxertos ósseos alogênicos, quando doador e receptor são da mesma espécie, e xenogênicos, quando doador e receptor são de espécies diferentes; estão amplamente disponíveis e não necessitam de cirurgia adicional. Entretanto, apresentam limitações importantes, como risco de rejeição ou transmissão de doenças. A fim de evitar o risco de uma reação imunológica do hospedeiro a estes enxertos, técnicas de processamento tais como liofilização e irradiação são necessárias para remover todas as propriedades imunogênicas (DAMADZADEH *et al.*, 2010). No entanto, acredita-se que essas técnicas influenciam negativamente a sua osteoindutividade e condutividade. As desvantagens acima mencionadas estabeleceram espaço para o desenvolvimento de biomateriais sintéticos na regeneração do tecido ósseo, como uma alternativa aos enxertos ósseos (TIAN *et al.*, 2012).

Os biomateriais usados para enxertia óssea participam de processos de modelagem, remodelagem e reparação do tecido a ser formado e estimulado. São três os processos envolvidos na obtenção do osso neoformado: osteogênese,

osteoidução e osteocondução e qualquer tipo de enxerto ósseo deve possuir uma das três características para exercer a função regenerativa. O processo de osteogênese é responsável pela formação e desenvolvimento do osso a partir da diferenciação das células mesenquimais, que levam à formação de osso em tecido mole ou à ativação mais rápida de crescimento ósseo em osso pré-existente. A osteoidução estimula o processo de osteogênese, formando e expandindo tecido ósseo para regiões além do sítio receptor. Já a osteocondução é a capacidade que o biomaterial tem de servir de arcabouço para a migração de células ósseas (KRICHELDORF, 2009).

O tecido ósseo apresenta geometria tridimensional complexa (3D) com arquiteturas internas altamente organizadas e características específicas como porosidade, viscoelasticidade e alta resistência (ALVAREZ; NAKAJIMA, 2009). O arcabouço a ser utilizado como matriz acelular desempenha um papel central na neoformação óssea e, para isso, necessita compor alguns requisitos básicos, como alta porosidade; propriedades de superfície que permitam adesão celular, diferenciação e proliferação; biocompatibilidade e integridade para manter a estrutura de tecido pré-concebida. Além disso, ele deve ser reabsorvível, evitando, assim, uma segunda cirurgia. (WANG *et al.*, 2007).

Os requisitos estruturais dos biomateriais para enxertia óssea são numerosos devido às funções e características específicas desse tecido. O tamanho dos poros e a interconectividade são importantes, pois devem permitir a semeadura e migração celular, deposição de matriz, vascularização e transporte de nutrientes para as células (KIMELMAN *et al.*, 2007). Pesquisas anteriores (FREYMAN; YANNAS; GIBSON, 2001; MISHRA; KNOTHE-TATE, 2003) afirmaram que o tamanho ideal dos poros para promover o crescimento

ósseo está na faixa de 100-500 micrômetros, entretanto parece não haver um consenso. Além disso, os biomateriais para enxertia óssea devem fornecer suporte mecânico para preservar o volume do tecido e facilitar a regeneração, sendo as principais propriedades mecânicas: rigidez, força e resistência à fadiga. Quando a rigidez do arcabouço excede a do osso natural, a concentração de tensão no osso circundante pode causar falha óssea. Por outro lado, quando essa rigidez é menor, pode causar falha do implante bem como atrofia óssea. O arcabouço também deve possuir força e resistência à fadiga suficiente para atuar até crescimento *in vivo* do tecido (ALVAREZ E NAKAJIMA, 2009).

Existem vários materiais metálicos que preenchem esses requisitos e que são frequentemente utilizados como biomateriais em cirurgia dentária e ortopédica para substituir ossos danificados ou para fornecer suporte para a regeneração de defeitos ósseos, a exemplo do aço inoxidável, ligas à base de cobalto-cromo e ligas de titânio (SHISHKOVSKY *et al.*, 2008). No entanto, a principal desvantagem dos biomateriais metálicos é sua falta de reconhecimento biológico na superfície do material. Outra limitação é a possível liberação de íons metálicos tóxicos através da corrosão ou desgaste que podem levar a inflamações e reações alérgicas, que reduzem a biocompatibilidade e causam perda de tecido. Um adequado tratamento da superfície do material pode ajudar a evitar este problema e criar uma ligação direta com o tecido (ORINAKOVÁ *et al.*, 2020).

### 1.3 MAGNÉSIO

O uso do magnésio e suas ligas para aplicações cirúrgicas em casos de defeitos ósseos tem ganhado destaque nos últimos anos. Estas ligas têm grande

potencial, pois são totalmente biodegradáveis, têm propriedades mecânicas semelhantes ao osso (densidade de 1,74 g/cm<sup>3</sup>, enquanto a do osso cortical humano é de 1,75 g/cm<sup>3</sup>), não induzem resposta inflamatória ou sistêmica, são osteocondutoras e estimulam o crescimento ósseo (CHENG *et al.*, 2016). Além disso, devido à sua biodegradabilidade, uma segunda cirurgia para a remoção do arcabouço, quando necessário, pode ser evitada. Todos esses fatos sugerem que o Mg tem um potencial significativo como biomaterial de carga, sendo preferível em relação ao aço inoxidável e titânio (SEZER *et al.*, 2018).

É de fundamental importância que a velocidade de degradação (corrosão) dessas ligas seja controlada para elas possam ser usadas como aparelhos ortopédicos e parafusos e placas de fixação em cirurgias de reconstrução óssea. Se essa degradação ocorrer de forma rápida e imprevisível pode causar perda da integridade mecânica (WONG *et al.*, 2013).

Quando uma liga de Mg é imersa em um meio fisiológico, o contato entre a superfície e um eletrólito contendo meio aquoso leva a maiores taxas iniciais de corrosão. Este processo envolve a liberação de hidrogênio e a alcalinização do ambiente como mostra a reação:



Geração rápida de produtos de corrosão, tais como H<sup>2</sup> gasoso e íons OH<sup>-</sup> e Mg<sup>2+</sup>, podem causar a formação de cavidades, inflamação e uma resposta de corpo estranho severa (GONZALEZ *et al.*, 2018).

Para controlar adequadamente a velocidade de corrosão das ligas de magnésio, vários revestimentos de superfície foram desenvolvidos, incluindo fluoretos, fosfatos de cálcio e polímeros biodegradáveis, utilizando técnicas

como anodização, eletrodeposição e tratamentos térmicos (ISKANDAR *et al.*, 2015).

Os revestimentos com fosfato de cálcio servem como barreiras que retardam a penetração de água e outros íons no substrato de Mg, diminuindo assim a taxa de degradação e alcalinidade do meio. Além disso, os íons fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) auxiliam na precipitação dos fosfatos de magnésio que diminuem a formação de manchas de corrosão (XIN *et al.*, 2008). A fase mineral do osso natural é composta por fosfato de cálcio, portanto, este componente é um excelente material de revestimento devido à sua capacidade de melhorar a resposta dos osteoblastos e também a integração óssea (SONG *et al.*, 2010).

## **2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA**

Defeitos ósseos são um desafio para diversas áreas da Medicina e da Odontologia, por isso, diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de buscar técnicas e substitutos ósseos adequados.

Nos últimos anos o magnésio tem se destacado devido ao seu grande

potencial para substituir os biomateriais metálicos utilizados atualmente, a exemplo do titânio. Diferentemente do titânio, o magnésio é biodegradável e estudos *in vitro* sugerem que os íons Mg, produto dessa biodegradação, podem promover proliferação osteoblástica, diferenciação e expressão de marcadores osteogênicos (STAIGER; PIETAK; HUADMAI, 2006). Além disso, numerosos estudos *in vivo* demonstraram que os arcabouços porosos de magnésio ao se degradarem induzem a neoformação óssea e estimulam a angiogênese (FU-ZHAI *et al.*, 2008).

O fosfato de cálcio é um osteocondutor bem definido e que, em condições fisiológicas, degradam-se a uma taxa significativamente mais lenta em comparação com o magnésio (SHADANBAZ; DIAS, 2012), sendo, portanto, bastante utilizados como revestimento para controlar a velocidade de degradação desse metal.

Diante do exposto, investigamos no presente estudo, o potencial das fitas de magnésio, revestidas ou não com fosfato de cálcio, como biomaterial para regeneração óssea através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Esperamos que as propriedades biodegradáveis desse biomaterial o tornem apto para ser utilizado em defeitos ósseos críticos, especialmente em cirurgias de reconstrução óssea em pacientes pediátricos, evitando a necessidade de novas cirurgias para substituição do biomaterial.

Esperamos dessa forma, contribuir substancialmente com a área da saúde oral e biomateriais, com a geração de conhecimento científico de qualidade em um tema de relevância para saúde pública do nosso país. Os resultados podem contribuir ainda para a geração de produtos e patentes de

biomateriais para regeneração óssea.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL:**

Avaliar as propriedades osteogênicas e a biocompatibilidade das fitas de magnésio revestidas ou não com fosfato de cálcio e seu potencial como biomaterial para regeneração óssea.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1 – Investigar, por meio de ensaios *in vitro*, a influência das fitas de magnésio, revestidas ou não com fosfato de cálcio, na viabilidade, proliferação e ativação de osteoblastos maduros, avaliando seu papel na via RANK/RANKL/OPG e produção de BMP-2.

2 – Investigar a biocompatibilidade, por meio de ensaios *in vivo*, das fitas de magnésio, revestidas ou não com fosfato de cálcio.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Síntese do biomaterial**

O revestimento com fosfato de cálcio foi realizado de acordo com a rota de precipitação em meio aquoso. A técnica envolve reações entre os precursores do cálcio e do fosfato com controle da temperatura e do pH da solução. A solução do precursor foi preparada pela mistura de 50 mL de hidróxido de cálcio (0,5 mM), 50 mL de ácido orto-fosfórico (0,3 mM) e 50 mL de ácido láctico (1,6 mM).

#### **4.1.1 Protocolo de revestimento**

Magnésio puro (99,99%) foi usado para a produção do revestimento. A amostra foi limpa por ultrassom em detergente neutro, acetona e água destilada por 10 min cada. As amostras limpas foram submetidas a tratamento hidrotérmico de uma etapa por imersão em solução precursora a 80 °C.

### **4.2 Caracterização do biomaterial:**

#### **4.2.1 Microestrutura:**

O material obtido foi caracterizado por Difração de Raios-X e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As análises de difração de raios-X foram

realizadas em um difratômetro de raios-X (XPERT Pro MPD, PANanalytical), utilizando radiação  $\text{CoK}\alpha$ . Os dados de difração foram coletados na faixa  $2\theta$  de  $20^\circ$  a  $60^\circ$  a uma tensão de 40 kV e uma corrente de 40 mA. As espécies cristalinas foram identificadas usando o X'Pert HighScore Plus e foi feita a comparação do padrão de cada amostra no banco de dados JCPDS (Joint Committee Powder Diffraction Standards). A morfologia da superfície das amostras foi analisada por MEV em um microscópio eletrônico de varredura (Quanta 450FEG-FEI, FEI-Company). Antes da análise em MEV, as amostras foram fixadas em suporte com fita dupla-face de carbono e posteriormente recobertas com fina camada de carbono por sistema de deposição a vácuo Bal-Tec (CHENG *et al.*, 2016). As análises foram realizadas na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará (UFC).

#### **4.2.2 Propriedades mecânicas**

As propriedades mecânicas das fitas de magnésio (curva tensão-tensão) foram analisadas por meio de ensaios de tração uniaxial, em máquina de ensaio universal (Instron 3345), com velocidade de deslocamento de  $0,5 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ , célula de carga 500 e distância entre os ganchos de 10 cm. Os corpos de prova foram cortados em formato retangular (10cm x 4mm), sendo avaliadas 15 amostras para cada teste. Esse procedimento foi realizado de acordo com a norma ASTM E517-18 para materiais metálicos (CHERKAEV; BONIFASI-LISTA, 2011).

#### **4.2.3 Biodegradação**

O teste de imersão foi realizado para determinar as taxas de biodegradação sofridas pelo biomaterial. As fitas de magnésio foram esterilizadas em autoclave de 12 L (Cristófoli), cortadas em pedaços de 1 cm de

comprimento e 4 mm de largura e imersas em placa de 12 poços com 5 ml de DMEM (Dulbencoo's Modified Essential Medium) por poço, com volume mínimo de solução para área de amostra de acordo com American Society of Testing Materials (ASTM) G31-72 (GONZALEZ *et al.*, 2018). A placa foi colocada em incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> para simular as condições fisiológicas sofridas pelo biomaterial e os valores de pH do meio foram medidos com pHmetro (Kasvi) em três períodos de tempo distintos: após 1 dia, após 7 dias e após 15 dias (CUI *et al.*, 2008).

As amostras foram divididas em 2 grupos, cada grupo contendo 4 amostras:

**Mg1** – Fitas de magnésio imersas em DMEM

**Mg2** – Fitas de magnésio revestido com fosfato de cálcio imersas em DMEM

Após 1, 7 ou 15 dias, os biomateriais foram removidos do poço e, quando estavam secos, foram fotografados. As fotografias foram realizadas em máquina fotográfica semi-profissional Nikon L840 sempre na mesma distância para permitir a comparação da área degradada. As imagens foram analisadas e as áreas de degradação foram mensuradas por meio do software ImageJ. O software calcula a área de degradação do biomaterial de cada grupo sendo essa área calculada inicialmente em pixels e, em seguida, convertida em mm. Essa conversão é possível devido ao uso de um padrão milimetrado fixado na lateral do biomaterial (SALEH *et al.*, 2016).

### **4.3 Testes *in vitro***

#### **4.3.1 Caracterização do estudo**

Foi realizado estudo *in vitro* experimental analítico quantitativo e qualitativo através de ensaios de viabilidade, proliferação e ativação e estudo *in vivo* caso/controle através de ensaios de biocompatibilidade em ratos Wistar.

#### **4.3.2 Cultura secundária**

Foram utilizados osteoblastos murinos (OFCOL II) adquiridos no banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), mantidos em meio de cultura DMEM (Dulbencoo's Modified Essential Medium) acrescido de glutamina, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), e antibióticos (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina), mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 3). As células foram utilizadas entre as passagens 16° e 30° e seu crescimento foi acompanhado diariamente por meio de observação em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100). A troca do meio foi realizada de acordo com o metabolismo celular.

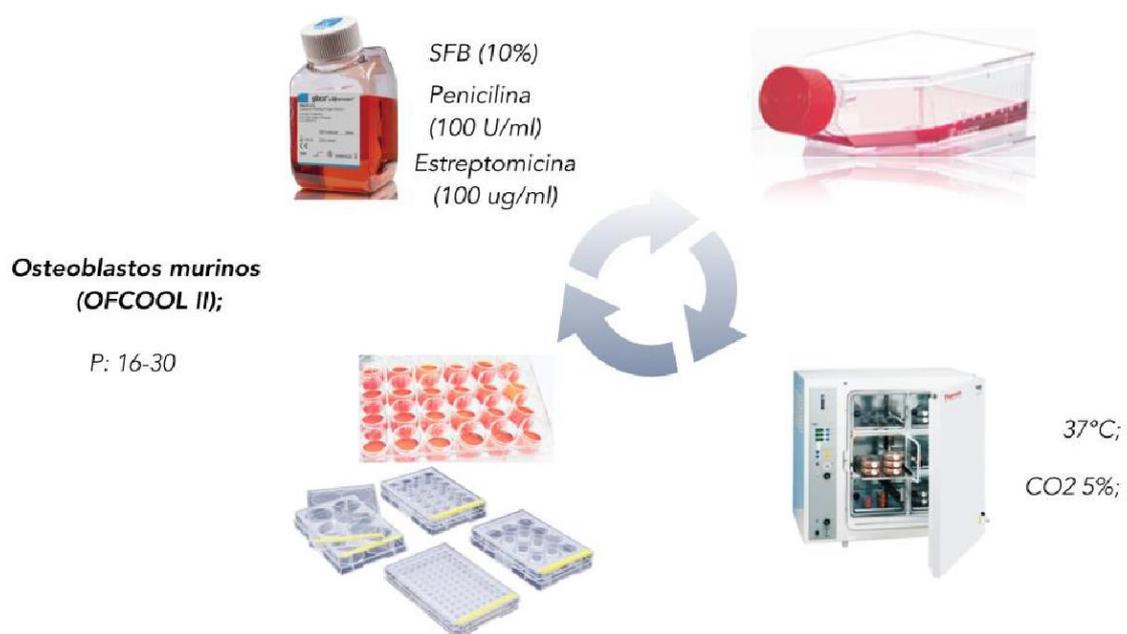
Após a subconfluência, as células foram subcultivadas. Nesse processo o meio foi removido e a monocamada celular lavada com solução tampão (PBS) e, em seguida, as células foram dissociadas com tripsiniza. Para isso, as células foram mantidas por 3 minutos imersas em 2ml de tripsina a 0,05% e, após esse período, foram retiradas, adicionando-se 6 ml de meio de cultura DMEM suplementado. Em seguida as células foram transferidas para um tubo falcon de 15 ml, centrifugadas (SOLAB SL-701) a 1200 rpm, 4°C por 5 minutos. Após este período, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas com adição de 4ml de meio completo. Deste volume foram retiradas alíquotas de, no mínimo, 1 ml e passadas para novas garrafas.

Cada procedimento de subcultivo deu origem a uma nova passagem celular. De cada passagem, amostras das células crioprotegidas em 10% de

dimetilsulfóxido (DMSO) foram congeladas e mantidas em tambor de nitrogênio líquido.

**Figura 3. Cultivo dos osteoblastos (OFCOL II).**

Meio de cultura específico para o cultivo de osteoblastos enriquecido com soro fetal bovino e antibiótico/antimicótico. As células foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> enquanto crescem e se aderem às garrafas de cultivo, a partir desse momento são transferidas para placas de 96, 24 ou 12 poços, a depender do experimento que será realizado.



Fonte: Freire, 2018

### 4.3.3 Grupos experimentais dos testes *in vitro*

**DMEM:** Células incubadas apenas com o meio de cultura DMEM suplementado (Controle)

**Mg1:** Células cultivadas sobre fitas de magnésio imersas em DMEM suplementado

**Mg2:** Células incubadas sobre fitas de magnésio revestidas com fosfato de cálcio imersas em DMEM suplementado

### 4.3.4 Teste viabilidade celular pelo método direto (MTT)

O teste de citotoxicidade tem como objetivo avaliar os efeitos letais ou subletais de uma substância ou produto a nível celular. Para esse trabalho, foi utilizado o teste de citotoxicidade pelo método direto com MTT. Esse teste avalia de forma quantitativa a função mitocondrial através da redução do tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide; Sigma) em cristais de formazana. Essa reação de redução ocorre dentro da mitocôndria através da enzima succinato-desidrogenase, portanto, a quantidade de cristais de formazana está diretamente relacionada com o potencial de redução do tetrazolium MTT nas mitocôndrias.

Para a realização desse teste foram plaqueadas  $3 \times 10^3$  células por poço em placas de cultura de 96 poços contendo 100µl do meio de cultura suplementado, nos períodos de 24 e 48 horas e mantidas em incubadora, overnight, para completa adesão. As células foram plaqueadas diretamente sobre as fitas de magnésio (dos grupos Mg e MgF), sendo essas fitas padronizadas no tamanho 2mm x 2mm em todos os poços para que não houvesse interferência nos resultados. Após os períodos mencionados, adicionou-se 20µl por poço de MTT (Sigma Aldrich) diluído com PBS em uma

concentração de 5mg/ml. O MTT foi incubado por 3 horas a uma temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, foi removido todo o conteúdo dos poços e adicionado 100 µl de DMSO em cada poço sob agitação de 30 segundos para solubilizar os cristais de formazana. A solução foi aspirada e transferida para uma nova placa de 96 poços e as leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Biotek) no comprimento de onda de 590nm (HIROMOTO; YAMAZAKI, 2017).

#### **4.3.5 Teste de proliferação celular (MTS)**

Os osteoblastos foram cultivados em uma placa de 96 poços contendo 100µl de DMEM e 3x10<sup>3</sup> células por poço em 24 e 48 horas. Após a incubação, a proliferação celular foi avaliada usando ensaio de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H de tetrazólio (CellTiter 96 AQueous, Promega). O acúmulo de formazan foi quantificado pela absorbância a 490 nm em espectrofotômetro (Biotek) (PARK *et al.*, 2013).

#### **4.3.6 Dosagem de fosfatase alcalina óssea (FAO) pelos osteoblastos**

A dosagem de fosfatase alcalina óssea foi realizada com intuito de avaliar a atividade dos osteoblastos, visto que esse é um marcador celular bem estabelecido na literatura (Vieira, 1999). Para avaliação deste parâmetro, amostras dos sobrenadantes do meio de todos os poços foram coletados das placas de cultura de 24 poços após os períodos: 1 dia, 7 dias e 15 dias de todos os grupos de estudo. Após a coleta, as amostras dos sobrenadantes foram utilizadas para a dosagem de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO), utilizando um *Kit*

comercial para essa finalidade, cuja metodologia segue orientação do laboratório fabricante (LABTEST®).

O método é baseado na labilidade da isoforma óssea da fosfatase alcalina ao calor. Alíquotas de 100 µL da amostra foram incubadas em banho-maria a 56 °C por 10 minutos e então transferidas para um banho de gelo. A atividade da fosfatase alcalina não óssea (termoestável) foi limitada diretamente no espectrofotômetro a uma temperatura de 30°C com leitura de absorbâncias a 405 nm, tendo como substrato p-nitrofenilfosfato. A fração óssea foi subtraída indiretamente da atividade da fosfatase alcalina termoestável da fosfatase alcalina total (MOSS; WHITBY, 1975).

#### **4.3.7 Formação de nódulos minerais (ensaio de Von Kossa)**

Para confirmar a atividade dos osteoblastos, foi analisada a presença de nódulos de mineralização para confirmar a atividade dos osteoblastos, sendo essa análise realizada através do ensaio de Von Kossa. Nesse ensaio, as trocas do meio de cultura aconteciam a cada 48 horas. Os grupos analisados foram cultivados em placas de 12 poços, a uma concentração de  $3 \times 10^4$  células por poço, mantidas em meio de cultura padrão. A análise de mineralização foi realizada no período de 21 dias. Ao final, o meio de cultura foi removido, cada poço foi lavado com PBS em temperatura ambiente e as células foram fixadas com etanol 100% (1mL/poço) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram reidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100% até 50%, por 5 minutos em cada solução), e lavadas em água destilada por duas vezes. Em seguida, 1mL de solução de 5% de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) foi colocado em cada poço e as células foram exposta a luz UV por 1 hora. As

análises foram feitas a partir de fotografias utilizando o microscópio invertido no aumento de 40x (CASTRO-SILVA *et al.*, 2011).

A análise morfométrica quantitativa foi realizada conforme relatado anteriormente (ARGANDA-CARRERAS *et al.*, 2017). Para isso, cinco seções aleatórias de slides de Von Kossa foram digitalizadas eletronicamente em uma imagem RGB que posteriormente foi analisada usando o software ImageJ (versão 1.32j). A quantidade de depósito de cálcio foi então estimada a partir das imagens convertendo pixels da imagem com intensidade substancialmente maior (>120%) azul do que vermelho para ter a nova amplitude da escala de cinza = 1, deixando outros pixels como com amplitude = 0.

#### **4.3.8 Morfologia celular por imunofluorescência**

Os osteoblastos foram cultivados a uma concentração de  $5 \times 10^4$  células por poço em uma placa de cultura de células (35 mm x 10 mm) de 4 poços. Após 24 horas, o meio foi removido e as células juntamente com as fitas de magnésio foram fixadas com 500 $\mu$ L de paraformoldeído (PFA) 4% por poço por 30 minutos. Em seguida, 500 $\mu$ L de solução bloqueadora foram usados por 1h, seguido de incubação com faloidina (1:400) (Santa Cruz), para coloração do citoesqueleto, e mantida por 2 horas. Após esse período, foram adicionados 100  $\mu$ L do anticorpo primário Alexa Fluor 594 (Invitrogen) diluído na solução de lavagem por 30 minutos. Em seguida, o núcleo da célula foi corado com DAPI (1:2000) diluído em 1x PBS por 5 minutos. Todas as etapas foram intercaladas com lavagens sucessivas com tampão de lavagem. As preparações foram observadas em microscópio confocal (LM710-Confocal-Zeiss), utilizando filtros seletivos para cada fluoróforo, as imagens foram capturadas com câmera

integrada e processador de imagens (ISKANDAR *et al.*, 2015). Para melhor análise das imagens, foram criados dois subgrupos:

- Células aderidas ao biomaterial
- Células aderidas à placa de cultura ao redor do biomaterial

#### **4.3.9 Apoptose de osteoblastos por imunofluorescência**

Os osteoblastos foram cultivados a uma concentração de  $5 \times 10^4$  células por poço em uma placa de cultura de células (35 mm x 10 mm) de 4 poços.

Após 24 horas, o meio foi removido e as células, juntamente com as fitas de magnésio, foram fixadas com 500 $\mu$ L de paraformaldeído (PFA) a 4% por poço por 30 minutos. Em seguida, 500 $\mu$ L de solução de bloqueio foi usada por 1 hora, seguido de incubação com os anticorpos primários diluídos para Caspase 3 (1:100) e Caspase 9 (1:100) (SANTA CRUZ) que foram mantidos por 4 horas. Após esse período, foram adicionados 100 $\mu$ L do anticorpo secundário Alexa Fluor 594 (Invitrogen) diluído na solução de lavagem por 30 minutos. Em seguida, o núcleo da célula foi corado com DAPI (1: 2000) diluído em 1x PBS por 5 minutos. Todas as etapas foram intercaladas com lavagens sucessivas com tampão de lavagem. As preparações foram observadas em microscópio confocal (LM710-Confocal-Zeiss), utilizando filtros seletivos para cada fluoróforo, as imagens foram capturadas com câmera integrada e processador de imagens (KOHLENER; ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY, 2002).

#### **4.3.10 Via RANK/RANKL/OPG e Produção de BMP-2 pelos osteoblastos**

Os osteoblastos foram cultivados a uma concentração de  $5 \times 10^4$  células por poço em um prato de cultura de células (35 mm x 10 mm).

Após 24 horas, o meio foi removido e as células juntamente com as fitas de magnésio foram fixadas com 500µL de paraformaldeído (PFA) 4% por poço por 30 minutos. Em seguida, 500µL de solução de bloqueio foi usado por 1h, seguido pela incubação com os anticorpos primários diluídos para RANK-L (1:100), OPG (1:100) e BMP-2 (1:200) (SANTA CRUZ) que foram mantidos por 4 horas. Após este período, foram adicionados 100µL do anticorpo secundário Alexa Fluor 594 anti-rabbit (Invitrogen) diluído em solução de lavagem por 30 minutos. Em seguida, o núcleo da célula foi corado com DAPI (1: 2000) diluído em 1x PBS por 5 minutos. Todas as etapas foram intercaladas com lavagens sucessivas. As preparações foram observadas em microscópio confocal (LM710-Confocal-Zeiss), utilizando filtros seletivos para cada fluoróforo, as imagens foram capturadas com câmera integrada e processador de imagens.

Para quantificar o número de células positivas marcadas com RANK-L, OPG e BMP-2, o programa Image J foi usado para obter o número de células imunomarcadas por campo. Dez campos por slide foram fotografados com um total de 4 slides por grupo. (VERÍSSIMO *et al.*, 2012).

Posteriormente, foi realizada análise quantitativa dessas imagens por meio de uma pontuação, com modificações (RYCKE *et al.*, 2009). Para isso, as células foram categorizadas de acordo com a intensidade da coloração do núcleo (corado com DAPI) e do citoesqueleto (corado com os anticorpos: BMP-2, OPG e RANK-L). As células que apresentam marcação difusa, granulada e de baixa intensidade foram denominadas fracas (+) e conforme a marcação tornou-se mais evidente e mais intensa foram denominadas moderadas (++) e fortes (+++). As imagens foram analisadas por 3 avaliadores por meio de um estudo cego e

os escores foram expressos em valores mediano, mínimo e máximo (FEDCHENKO; REIFENRATH, 2014).

#### **4.4 Testes *in vivo***

##### **4.4.1 Aspectos éticos**

O estudo segue os aspectos que envolvem pesquisa com animais para cuidado e uso de animais de laboratório publicados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) que foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (protocolo nº 8526290319, ANEXO 1). Além disso, todos os esforços foram feitos para reduzir o número de animais usados, sua dor, sofrimento e estresse.

##### **4.4.2 Animais**

Os protocolos experimentais foram executados de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Universidade Federal do Ceará (UFC) para uso de animais experimentais. Os animais, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC), foram mantidos sob condições de temperatura ambiente e ciclos claro-escuros controlados durante os experimentos. Estes foram alojados em gaiolas apropriadas, em número de seis animais em cada uma delas, com alimentação balanceada à base de ração. A água e ração foram disponibilizadas à vontade. Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

##### **4.4.3 Modelo experimental**

Ratos Wistar (18 animais) foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina na dose de 75mg/kg e xilazina 5mg/kg. Somente ratos machos foram utilizados para evitar a influência hormonal no processo inflamatório. A tricotomia foi realizada na região dorsal escapular e pélvica seguida de antissepsia com solução alcoólica iodada. Incisões horizontais de aproximadamente 1 cm foram feitas em 2 locais na superfície dorsal no sentido lateral-lateral. Com tesouras cirúrgicas rombas, penetrando pela incisão no sentido caudal, o tecido subcutâneo foi divulsionado para permitir a implantação dos biomateriais, magnésio (Mg) e magnésio revestido com fosfato de cálcio (fitas de 4mm por largura por 4 mm de comprimento). As incisões foram suturadas com fio de seda 4.0 (Ethicon - Johnson & Johnson, Brasil), seguida de assepsia com álcool iodado. Os animais foram mantidos em observação em gaiolas unitárias, por 24 horas, para evitar lesões e dores. Após 24 horas, 7 dias e 15 dias, os animais foram sacrificados por injeção intraperitoneal por meio de alta dose de anestésico (cetamina, 75 mg/kg) e relaxante muscular (xilazina, 5mg/kg), correspondente a três vezes o valor do peso do animal. A pele dorsal foi raspada e os biomateriais removidos cirurgicamente junto com uma porção do tecido circundante (VERISSIMO *et al.*, 2012). O número de animais, os tempos de análise e os parâmetros avaliados foram determinados de acordo com estudos prévios (VERISSIMO *et al.*, 2012; FREIRE, 2018).

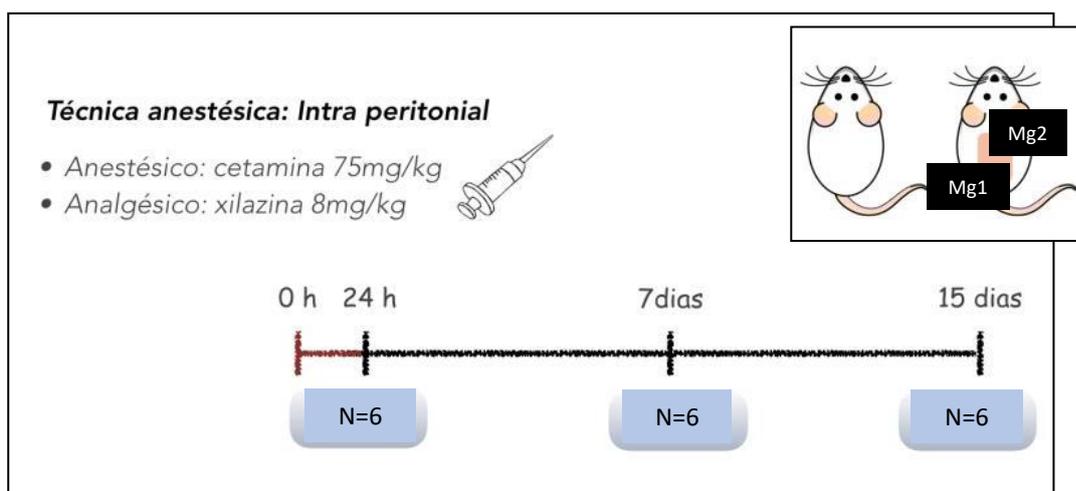
#### **4.4.4 Grupos experimentais**

Os animais foram divididos em 3 grupos (n=6) de acordo com os períodos de observação: 24 horas, 7 dias e 15 dias. Considerando que, cada animal recebeu a implantação subcutânea dos dois biomateriais avaliados, 36 fragmentos de pele contendo um dos biomateriais foram coletados e divididos

nos seguintes subgrupos (n=6): 1. Peles com fitas de magnésio coletadas após 24 horas; 2. Peles com fitas de magnésio coletadas após 7 dias; 3. Peles com fitas de magnésio coletadas após 15 dias; 4. Peles com fitas de magnésio revestidas com fosfato de cálcio coletadas após 24 horas; 5. Peles com fitas de magnésio revestidas com fosfato de cálcio coletadas após 7 dias e 6. Peles com fitas de magnésio revestidas com fosfato de cálcio coletadas após 15 dias. Conforme ilustrado na figura 4.

**Figura 4. Modelo experimental do teste de biocompatibilidade.**

36 fragmentos de pele contendo um dos biomateriais foram coletados e divididos nos seguintes subgrupos (n=6): 1. Peles com fitas de magnésio coletadas após 24 horas; 2. Peles com fitas de magnésio coletadas após 7 dias; 3. Peles com fitas de magnésio revestidas com fosfato de cálcio coletadas após 24 horas; 4. Peles com fitas de magnésio revestidas com fosfato de cálcio coletadas após 7 dias e 6. Peles com fitas de magnésio revestidas com fosfato de cálcio coletadas após 15 dias



Fonte: Veríssimo et al., 2012; Freire, 2018

#### 4.4.5 Análise histopatológica

Amostras de cada fita, com os tecidos de pele circunvizinhos foram removidas para análise histológica nos períodos de 24 horas, 7 ou 15 dias. Os espécimes foram fixados em solução de formol tamponado por 24 horas, desidratados em etanol, clarificados com xilol e embebidos em parafina. Os blocos de parafina foram submetidos a cortes longitudinais, com 4 $\mu$ m de

espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE) ou Tricrômio de Mallory para avaliação em microscópio óptico (LEICA DM-4000B).

As secções histológicas coradas em HE foram visualizadas no microscópio óptico com câmera acoplada (LEICA DFC-280), ligada ao computador utilizando o software LAS (Leica Application Suite) para captura das imagens. Foi realizada uma análise qualitativa cega com dois avaliadores, considerando os seguintes parâmetros: presença de infiltrado inflamatório, tipo celular predominante, integridade do tecido (deposição de colágeno) e presença de edema e/ou hemorragia.

A quantificação da área dos vasos sanguíneos foi realizada nos tecidos corados com Tricômio de Mallory, no qual se destacam vasos sanguíneos e fibras colágenas. Em cada lâmina histológica, considerando 6 amostras por grupo, foram identificadas as áreas de maior vascularização (*hot spot*) próximas à região previamente ocupada pelo biomaterial, para a delimitação e medição das áreas dos dez maiores vasos sanguíneos, considerando o diâmetro transversal, a partir de imagens digitalizadas. As imagens foram capturadas através de uma câmera digital acoplada a um microscópio Leica, em aumento de 400x, e analisadas com o Software LAS V3.7.0, conforme descrito anteriormente (LEITÃO *et al.*, 2007; BOMFIM *et al.*, 2017).

#### **4.5 Análise estatística**

Foi empregada a análise da variância (ANOVA) one ou two-way seguida pelo teste de Bonferroni para a comparação das médias obtidas. Os valores foram expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão Médio. Shapiro Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade. Foi considerado o nível de significância para  $p < 0,05$ .

As análises foram executadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 7 (Graph-Pad Software, USA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização do biomaterial

#### 5.1.2 Microestrutura

A Figura 5 mostra os espectros de DRX das amostras de magnésio revestidas com fosfato de cálcio. Os resultados de DRX indicaram que o revestimento depositado nas amostras de magnésio consistia principalmente de fase fosfato de cálcio dihidratado ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (JCDPS No. 072-0713) com uma razão molar F/Ca teórica de 1 e picos de Mg (JCDPS No. 004-0770). Os revestimentos de fosfato de cálcio em substratos de magnésio foram analisados previamente usando DRX (ISKANDAR *et al.*, 2013), que também mostrou a presença de fase DCPD, principalmente, com alguns picos de magnésio.

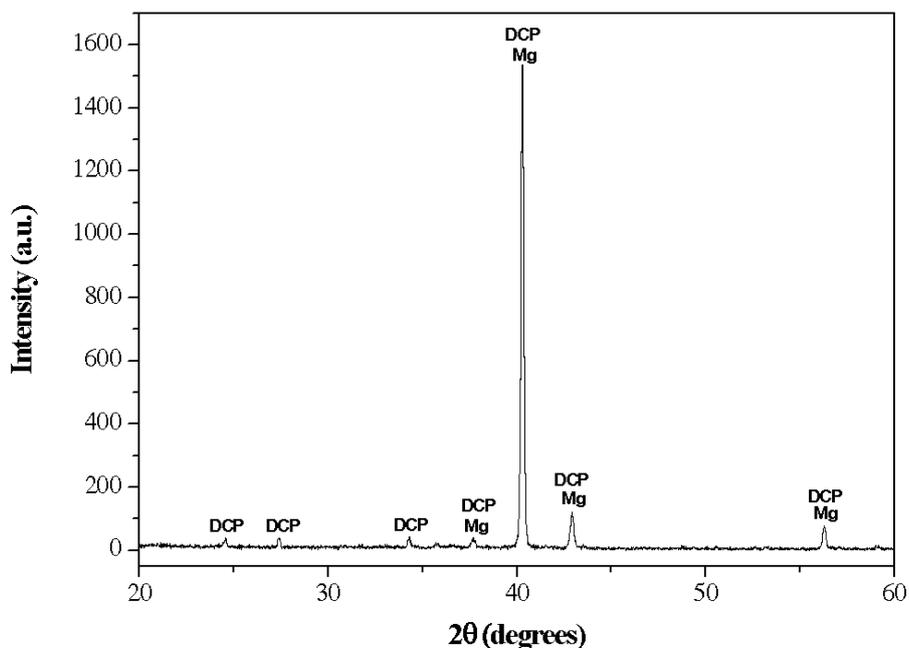


Figura 5. Padrões de DRX das amostras de magnésio revestidas com fosfato de cálcio.

A Figura 6 mostra micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do revestimento de brushita (DCP) com magnificação de 3646x. O revestimento era predominantemente composto por grandes cristais em forma de placa. Nenhum substrato era visível nas micrografias MEV e o revestimento parecia homogêneo.

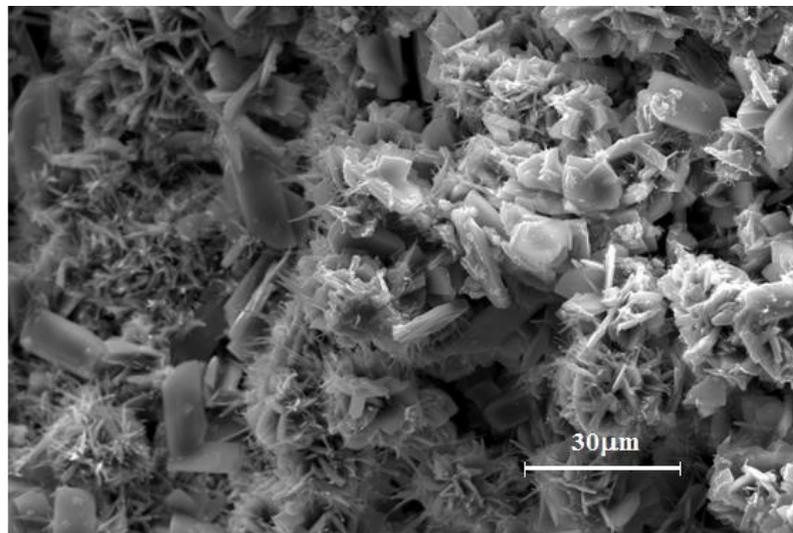


Figura 6. Micrografias eletrônicas de varredura da amostra de magnésio revestida com fosfato de cálcio.

### 5.1.3 Teste de tração

As fitas de magnésio apresentam resistência à tração de 147 MPa.

### 5.1.4 Biodegradação

Em ambos os grupos, fitas de magnésio (Mg1) e fitas de magnésio revestidas com fosfato de cálcio (Mg2), sofreram degradação progressiva durante o teste de imersão, porém, é notável, tanto pela observação visual

quanto pela mensuração da área superficial, que o grupo Mg2 apresenta menor área de degradação. O valor do pH também foi obtido, mas não foram observadas diferenças significativas nesse parâmetro entre os grupos Mg1 e Mg2, conforme ilustra a figura 7.

Também foi realizada a medição da área de superfície de degradação dos dois grupos nos seguintes períodos: 1, 7 e 15 dias. As imagens, obtidas com distância padronizada, evidenciaram que o grupo que não possui revestimento com fosfato de cálcio (Mg1) apresentou maiores índices de degradação em todos os períodos de tempo, sendo essa degradação ainda mais evidente após 15 dias (Figura 8), período em que se observa claramente diminuição do tamanho do biomaterial devido à absorção das extremidades. Essa informação foi confirmada através de análise quantitativa realizada no software Image J, para a medição e comparação entre as áreas dos biomateriais. Os resultados mostram que a área de superfície do grupo Mg2 é significativamente maior do que o grupo Mg1 nos períodos de 1 dia e 7 dias e que essa diferença se torna ainda mais significativa após 15 dias de avaliação, como mostra a figura 9.

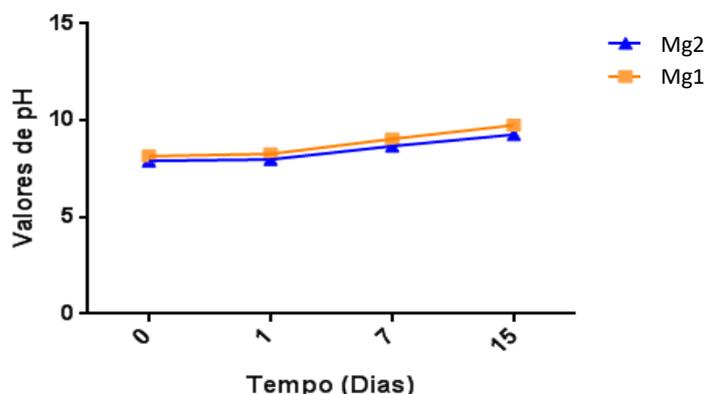
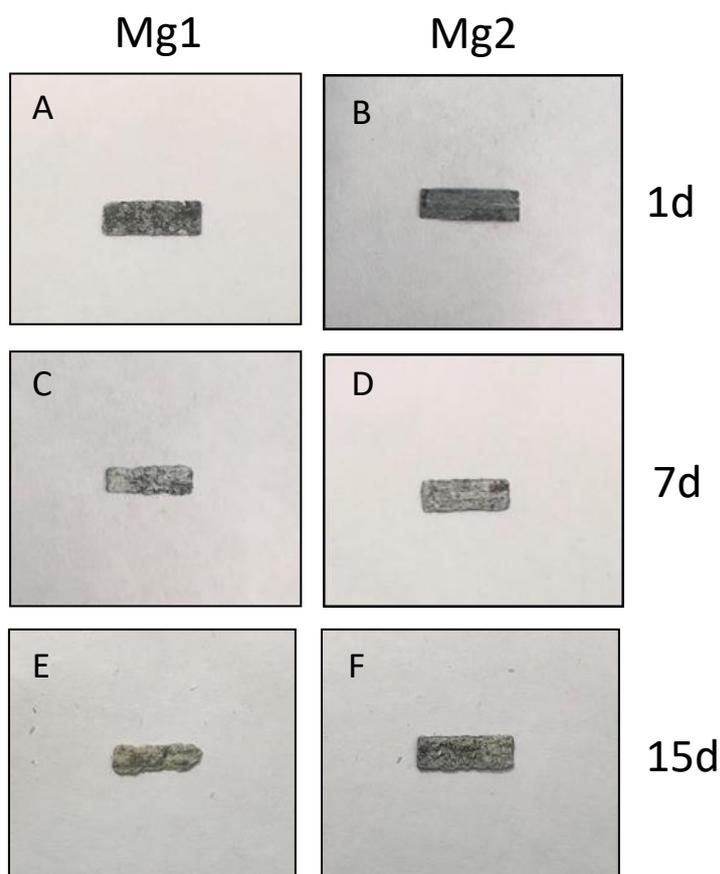
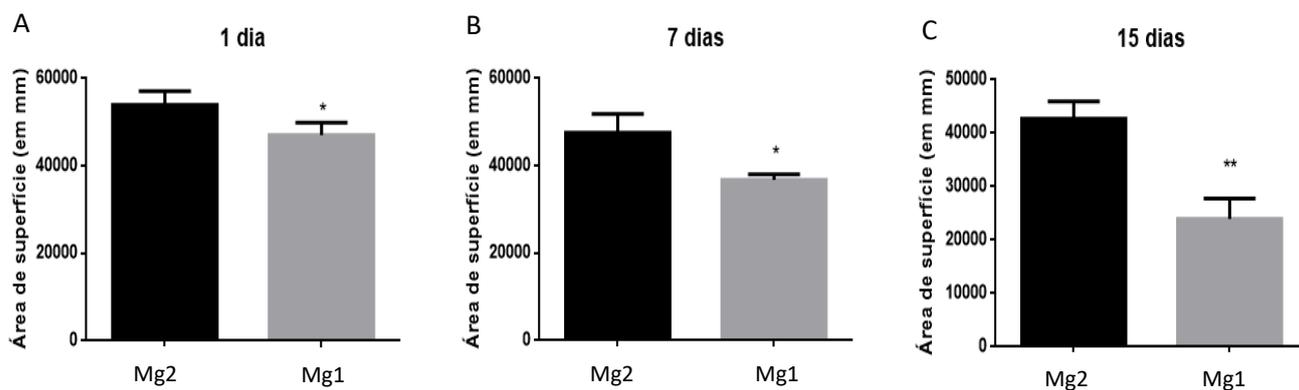


Figura 7. Valores de pH ao longo do tempo: 1 dia, 7 dias e 15 dias.

períodos de



**Figura 8. Imagens fotográficas padronizadas das amostras dos grupos Mg1 e Mg2 após o teste de imersão nos três períodos de tempo diferentes: 1 dia, 7 dias e 15 dias.** Figuras 7A, 7C e 7E) Amostras do grupo magnésio (Mg1) 1 dia, 7 dias e 15 dias após o teste de imersão, respectivamente; Figuras 7B, 7D e 7F) Amostras do grupo magnésio revestido com fosfato de cálcio (Mg2) 1 dia, 7 dias e 15 dias após o teste de imersão, respectivamente.



**Figura 9. Medida em mm da área de degradação das amostras dos grupos Mg1 e Mg2.** Medidas realizadas após os períodos: 1 dia (8A), 7 dias (8B) e 15 dias (8C).

## 5.2 Testes *in vitro*

### 5.2.1 Avaliação da viabilidade celular

Todas as fitas de magnésio testadas (com ou sem revestimento de fosfato de cálcio) não apresentaram toxicidade em nenhum período de tempo, mantendo, portanto, os osteoblastos viáveis (Figura 10). Ambos os grupos Mg1 e Mg2 apresentaram percentual significativamente maior de células viáveis quando comparados ao grupo DMEM (\* $p < 0,05$ ).

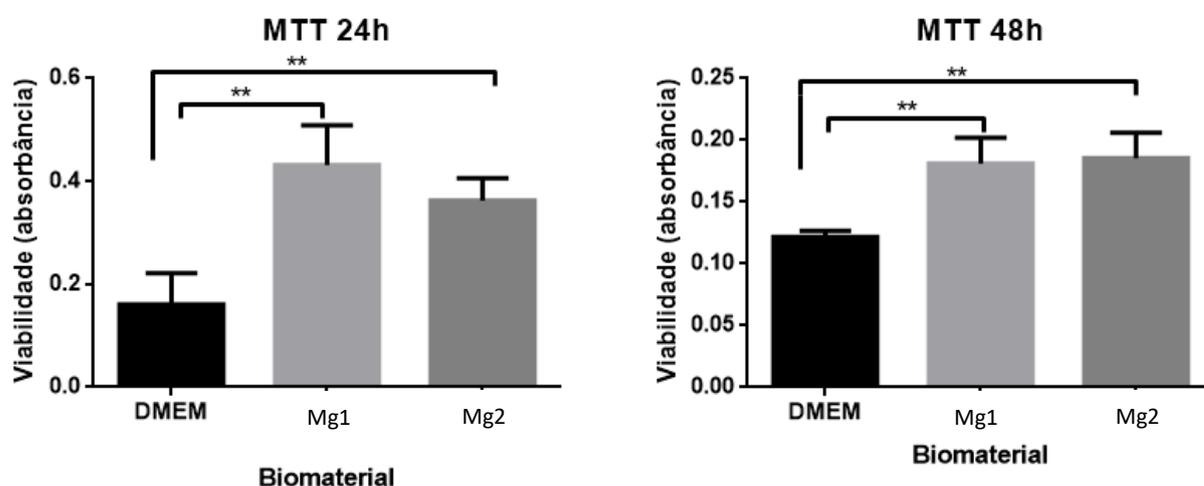
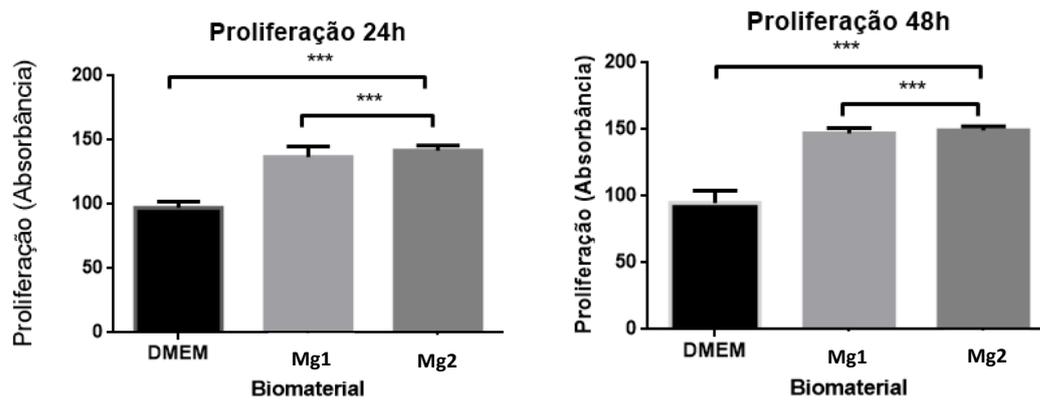


Figura 10. Efeito das fitas de magnésio, com ou sem revestimento com fosfato de cálcio sobre a viabilidade de osteoblastos murinos (OFCOL II) após 24 horas e 48 horas de cultivo celular. Grupo DMEM (células cultivadas sem biomaterial); grupo Mg1 (células cultivadas sobre fitas de magnésio); grupo Mg2 (células cultivadas sobre fitas de magnésio revestidas com fosfato de cálcio) com (\* $p < 0,05$ ) comparadas ao grupo DMEM.

### 5.2.2 Avaliação da proliferação celular

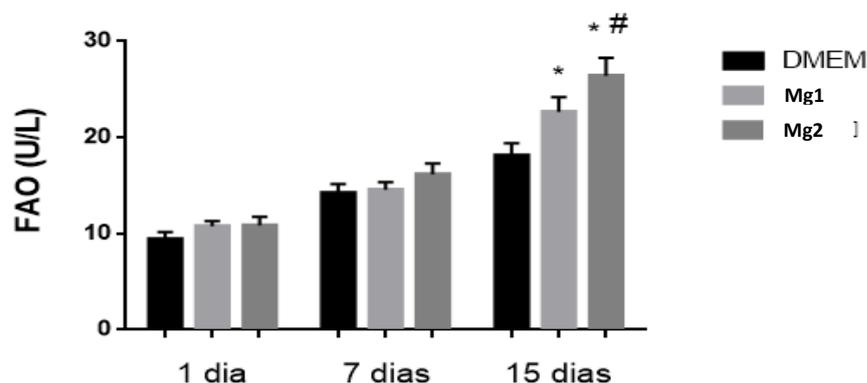
Não foram observadas diferenças significativas no percentual de proliferação celular entre os grupos Mg1 e Mg2 nos períodos de 24 e 48 horas (Figura 11). Ambos os grupos (Mg1 e Mg2), no entanto, apresentaram aumento significativo na proliferação celular quando comparados com o grupo controle (DMEM) nos dois períodos de tempo avaliados (\* $p < 0,05$ ).



**Figura 11.** Efeito das fitas de magnésio, com ou sem revestimento com fosfato de cálcio sobre a proliferação de osteoblastos murinos (OFCOL II) após 24 horas e 48 horas de cultivo celular. Grupo DMEM (células cultivadas sem biomaterial); grupo Mg1 (células cultivadas sobre fitas de magnésio); grupo Mg2 (células cultivadas sobre fitas de magnésio revestidas com fosfato de cálcio com (\* $p < 0,05$ ) comparadas ao grupo DMEM).

### 5.2.3 Avaliação dos níveis de fosfatase alcalina óssea:

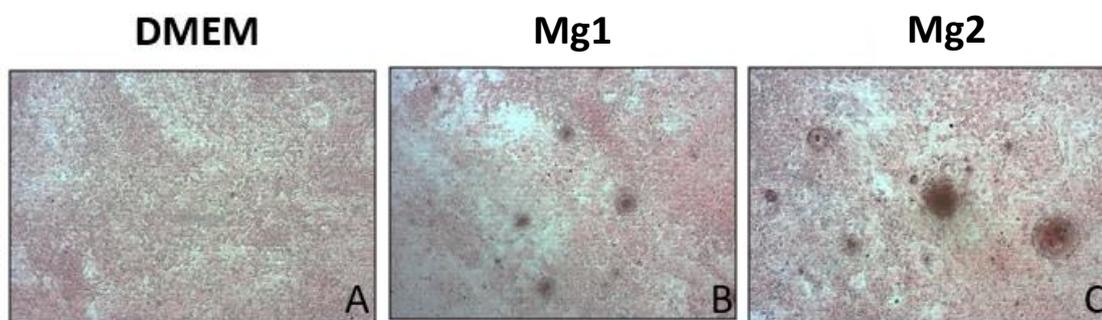
As concentrações de fosfatase alcalina aumentaram gradualmente nos três grupos experimentais ao longo dos períodos avaliados (1 dia, 7 dias e 15 dias). Ambos os grupos Mg1 e Mg2 mostraram um aumento significativo na atividade de fosfatase alcalina óssea quando comparados ao grupo DMEM no período de 15 dias. Observou-se diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos Mg2 e Mg no 15º dia de avaliação (Figura 12).



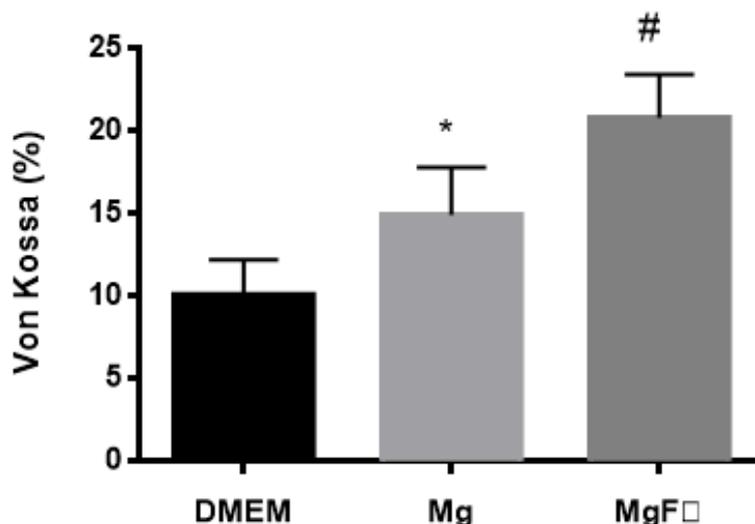
**Figura 12.** Efeito das fitas de magnésio, com ou sem revestimento com fosfato de cálcio sobre a atividade da fosfatase alcalina óssea produzida pelos osteoblastos murinos (OFCOL II) após 1 dia, 7 dias e 15 dias de cultivo celular. Grupo DMEM (células cultivadas sem biomaterial); grupo Mg1 (células cultivadas sobre fitas de magnésio); grupo Mg2 (células cultivadas sobre fitas de magnésio revestidas com fosfato de cálcio) com \* $p < 0,05$  comparados ao DMEM e # $p < 0,05$  comparado ao grupo Mg1).

#### 5.2.4 Avaliação da mineralização produzida por osteoblastos:

O ensaio de Von Kossa sugere que o cultivo de osteoblastos incubados com fitas de magnésio (revestidas, ou não, com fosfato de cálcio) favorece a formação de nódulos minerais quando comparado ao grupo DMEM, sem biomaterial (Figura 13 e 14) após 21 dias de incubação. Observou-se que o número e o tamanho dos nódulos são maiores no grupo Mg2 (Figura 12C) quando comparados ao grupo Mg1 (Figura 12B). A análise quantitativa realizada no software Image J confirma esse resultado.



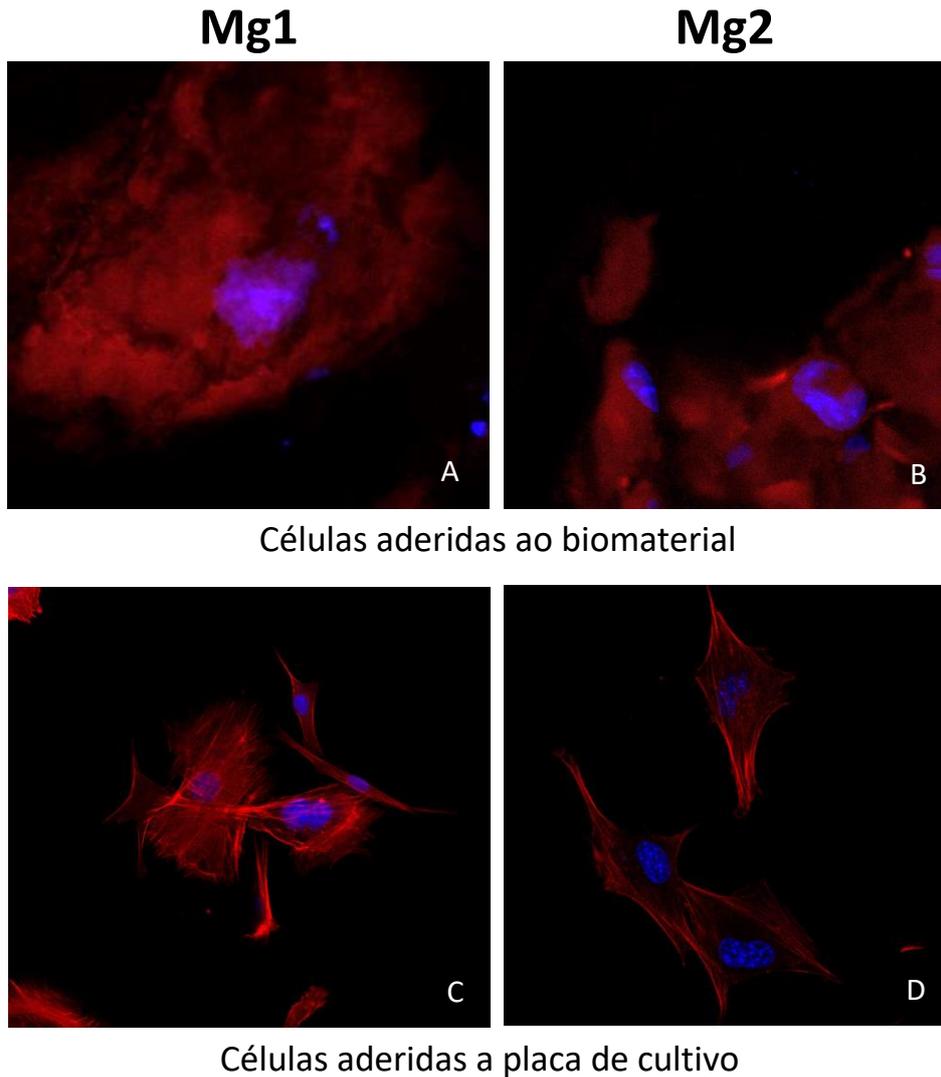
**Figura 13. Imagens representativas do ensaio de mineralização descrito por Von Kossa.** A mineralização é observada a partir da presença de pontos negros após 21 dias de incubação. 12A) Presença de nódulos de mineralização no grupo DMEM após 21 dias de teste; 12B) Presença de nódulos de mineralização no grupo magnésio (Mg1) após 21 dias de teste; 12C) Presença de nódulos de mineralização no grupo magnésio revestido com fosfato de cálcio (Mg2) após 21 dias de teste.



**Figura 14.** Quantificação dos depósitos de cálcio no ensaio de mineralização descrito por Von Kossa em osteoblastos OFCOL II após o período de 21 dias de cultivo. O resultado é expresso como percentual de ocupação pelos nódulos minerais. Grupo DMEM (células cultivadas sem biomaterial); grupo Mg1 (células cultivadas sobre fitas de magnésio); grupo Mg2 (células cultivadas sobre fitas de magnésio revestidas com fosfato de cálcio). com (\* $p < 0,05$ ) comparadas ao grupo DMEM e # $p < 0,05$  comparados entre si (Mg1 e Mg2).

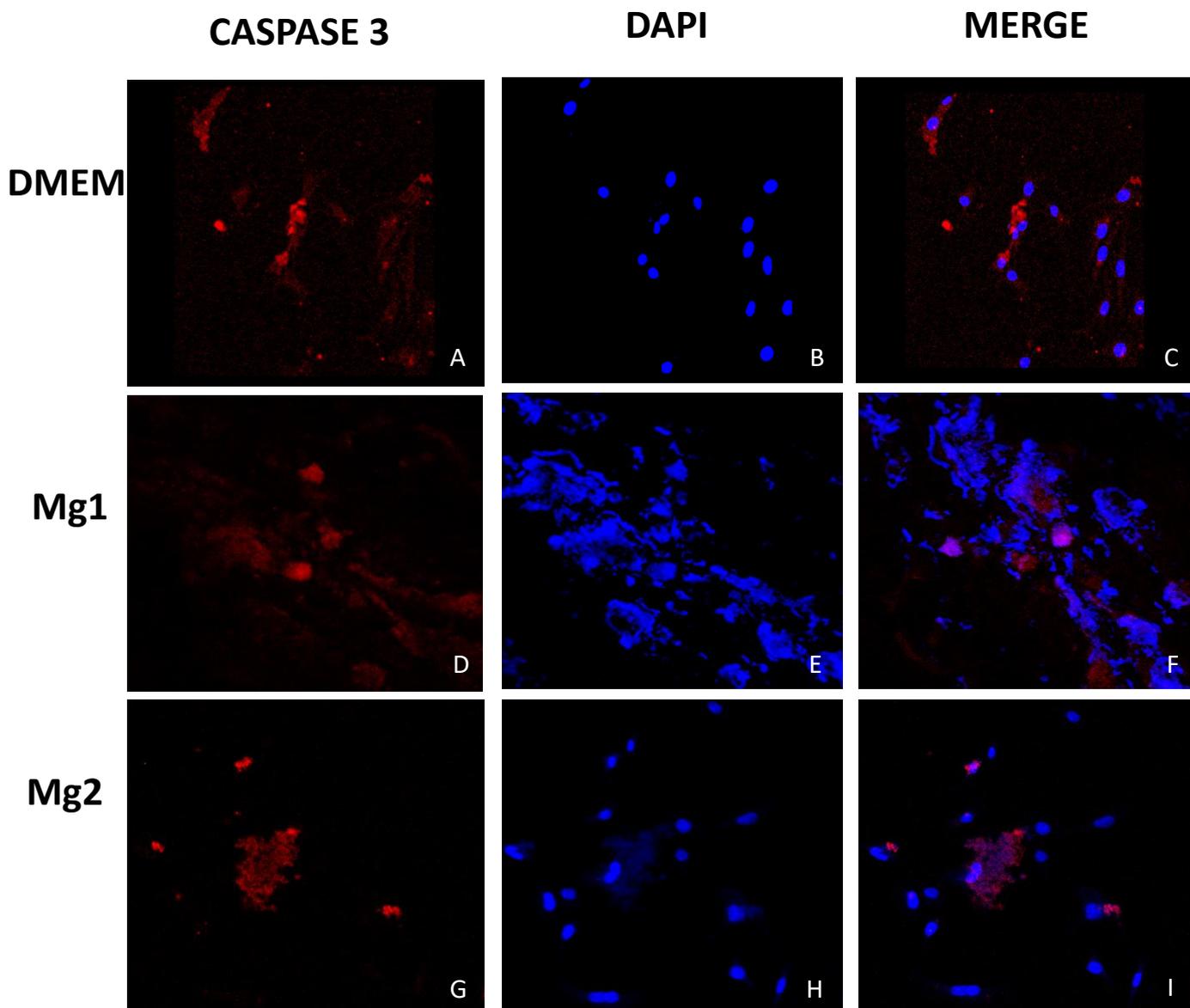
### 5.2.5 Avaliação da morfologia e adesão celular

A Figura 15 mostra claramente o aspecto estrelado (espraiado), característico de osteoblastos ativos, das células aderidas ao redor dos biomateriais (15C e 15D). Não é possível observar, no entanto, a morfologia das células cultivadas diretamente sobre as fitas de magnésio (com ou sem revestimento de fosfato de cálcio) (15A e 15B). Esse achado, provavelmente, deve-se às rugosidades características dos biomateriais, que pode estar interferindo na morfologia celular. No entanto, para excluir morte celular, foi realizado imunoenensaio com as caspases 3 e 9, marcadores de morte celular por apoptose (Figuras 16 e 17).

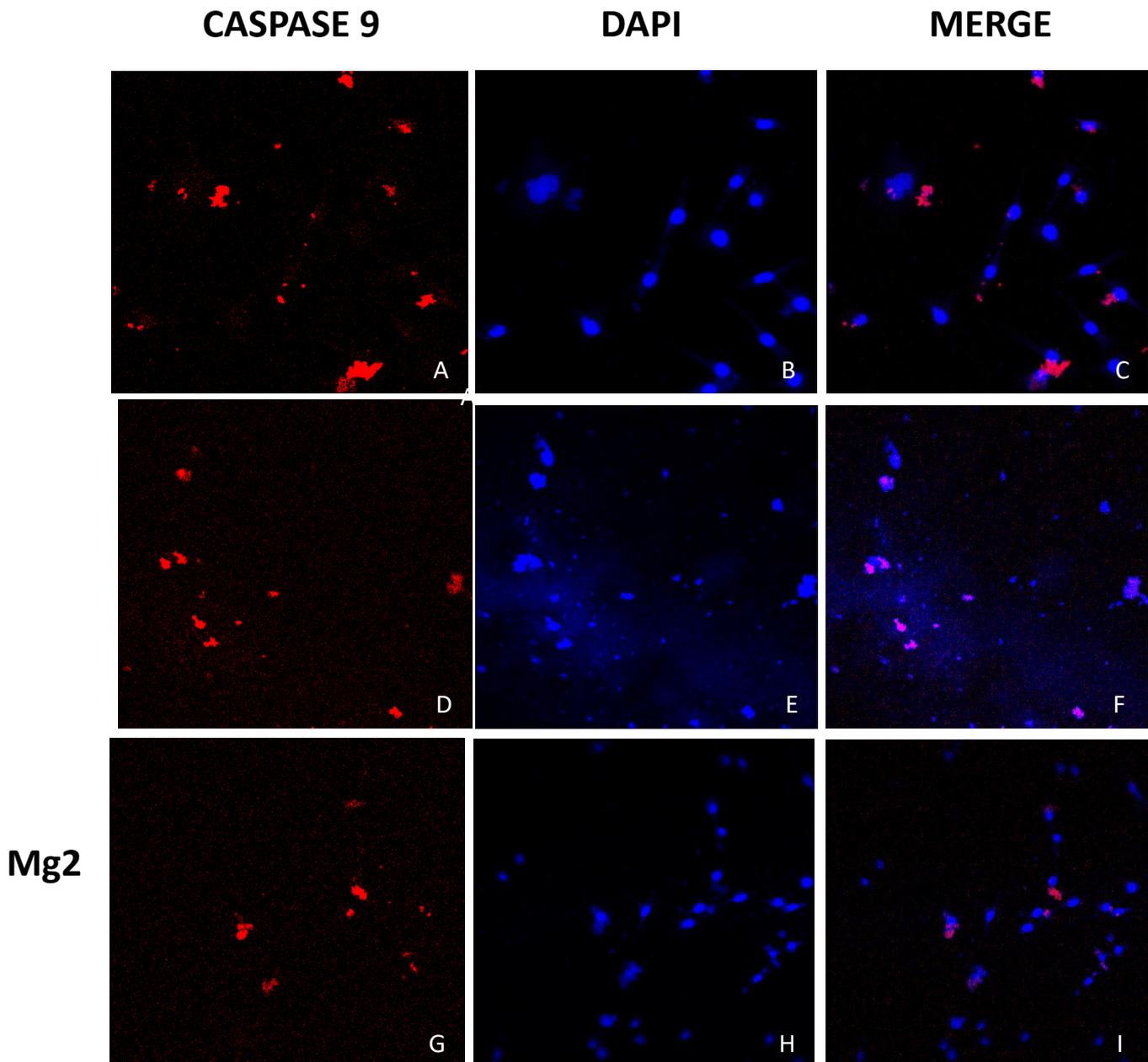


**Figuras 15. Imagens representativas do ensaio de imunofluorescência.** Figura 15A) Osteoblastos aderidos diretamente no grupo Mg1 (magnésio); Figura 15B) Osteoblastos aderidos diretamente no grupo Mg2 (magnésio revestido com fosfato de cálcio); Figura 15C) Osteoblastos aderidos na placa de cultura ao redor do grupo Mg1; 15D) Osteoblastos aderidos na placa de cultura ao redor do grupo Mg2.

Não foram observadas diferenças de imunomarcacão entre os grupos DMEM, Mg1 e Mg2, sugerindo que o biomaterial não compromete a viabilidade celular, conforme ilustram as figuras 16 e 17.



**Figura 16. Imagens de imunofluorescência para caspase 3.** Figuras 16 A, 16D e 16G) Imunomarcacão apenas de caspase 3 (vermelho) nos grupos DMEM, Mg1 e Mg2, respectivamente. Figuras 16B, 16E e 16H) Imunomarcacão do núcleo celular com DAPI (azul) nos grupos DMEM, Mg1 e Mg2, respectivamente. Figuras 16C, 16F e 16I) Imunomarcacão citoplasmática de caspase 3 (vermelho) e DAPI (azul) nos grupos DMEM, Mg1 e Mg2, respectivamente.

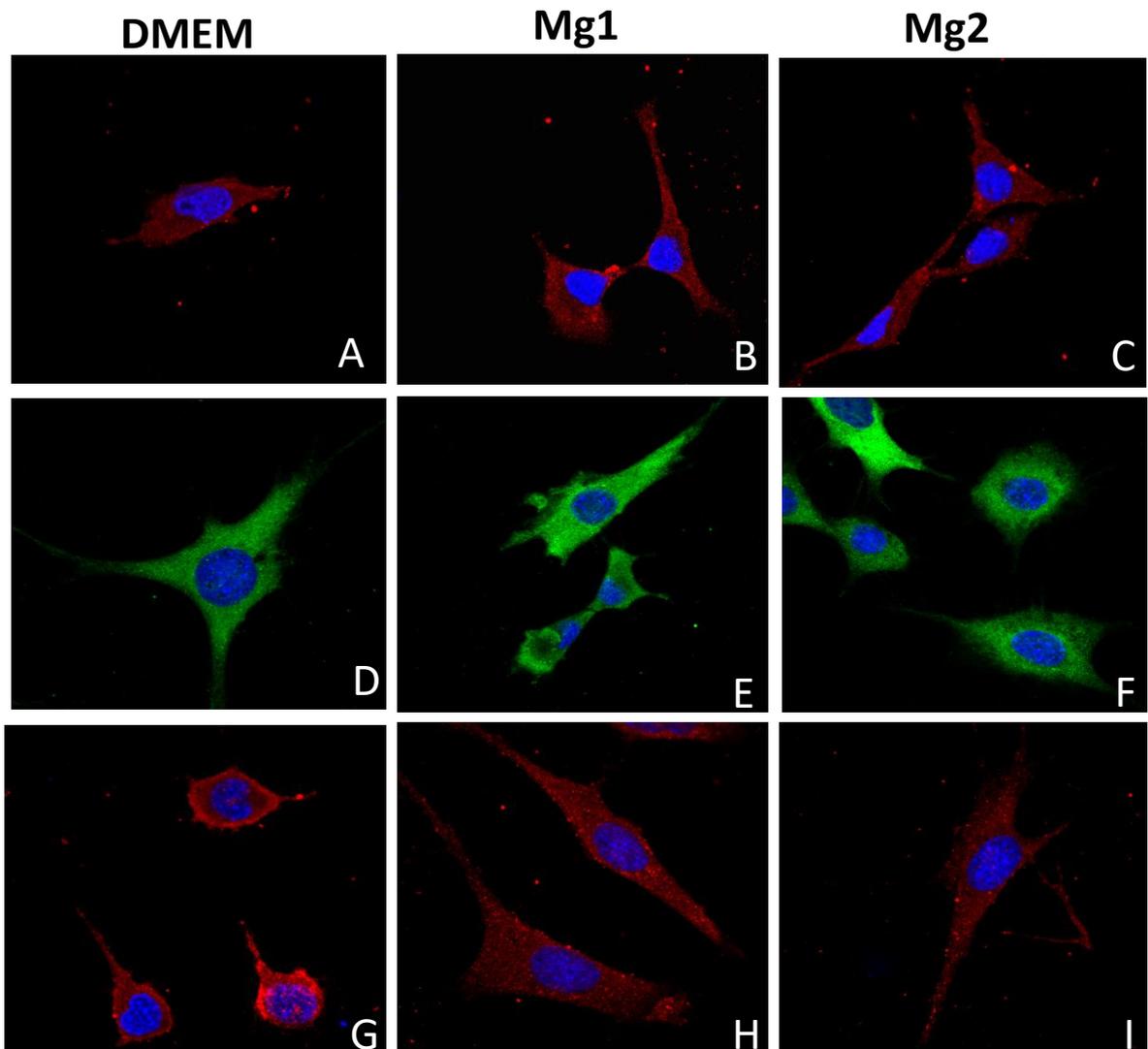


**Figura 17. Imagens de imunofluorescência para caspase 9.** Figuras 17 A, 17D e 17G) Imunomarcacão apenas de caspase 9 (vermelho) nos grupos DMEM, Mg1 e Mg2, respectivamente. Figuras 17B, 17E e 17H) Imunomarcacão do núcleo celular com DAPI (azul) nos grupos DMEM, Mg1 e Mg2, respectivamente. Figuras 17C, 17F e 17I). Imunomarcacão citoplasmática de caspase 3 (vermelho) e DAPI (azul) nos grupos DMEM, Mg1 e Mg2, respectivamente.

### 5.2.6 Participação da via RANK/RANKL/OPG e produção de BMP-2 na ativação de osteoblastos

As células cultivadas na presença de fitas de magnésio (18B, 18E e 18H) ou fitas de magnésio revestidas com fosfato de cálcio (18D, 18F e 18I)

apresentaram maior expressão de BMP-2 e OPG, em comparação ao grupo DMEM (18A, 18D e 18G). Não foram observadas diferenças na expressão de RANK-L entre os três grupos experimentais, conforme ilustra a figura 18.



**Figura 18. Imagens representativas de imunofluorescência.** Figuras 18A, 18D e 18G) Expressão das proteínas BMP-2, OPG e Rank-L no grupo DMEM, respectivamente; Figuras 18B, 18E e 18H) Expressão das proteínas BMP-2, OPG e Rank-L no grupo magnésio (Mg1), respectivamente; Figuras 18C, 18F e 18I) Expressão das proteínas BMP-2, OPG e Rank-L no grupo magnésio revestido com fosfato de cálcio (Mg2), respectivamente.

Os resultados mostram que foi identificado um maior número de células marcadas para BMP-2 e OPG com marcação considerada forte ou moderada nos grupos Mg1 e Mg2, quando comparadas com o grupo DMEM e que essa

diferença não foi observada nas células marcadas para RANK-L (Tabela 1).

**Tabela 1. Análise quantitativa da intensidade da imunomarcagem de BMP-2, OPG, RANK-L com valores expresso em mediano.**

	<b>DMEM</b>	<b>MG1</b>	<b>MG2</b>
BMP-2	1 (1-2)	2 (2-3) *	2 (2-3)*
OPG	2 (1-3)	3 (2-3)*	3 (2-3)*
RANK-L	2 (1-3)	2 (1-3)	2 (1-3)

As pontuações são expressas em valor mediano, mínimo e máximo. Todos os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. \*p<0,05 vs grupo DMEM

### **5.3 Testes *in vivo***

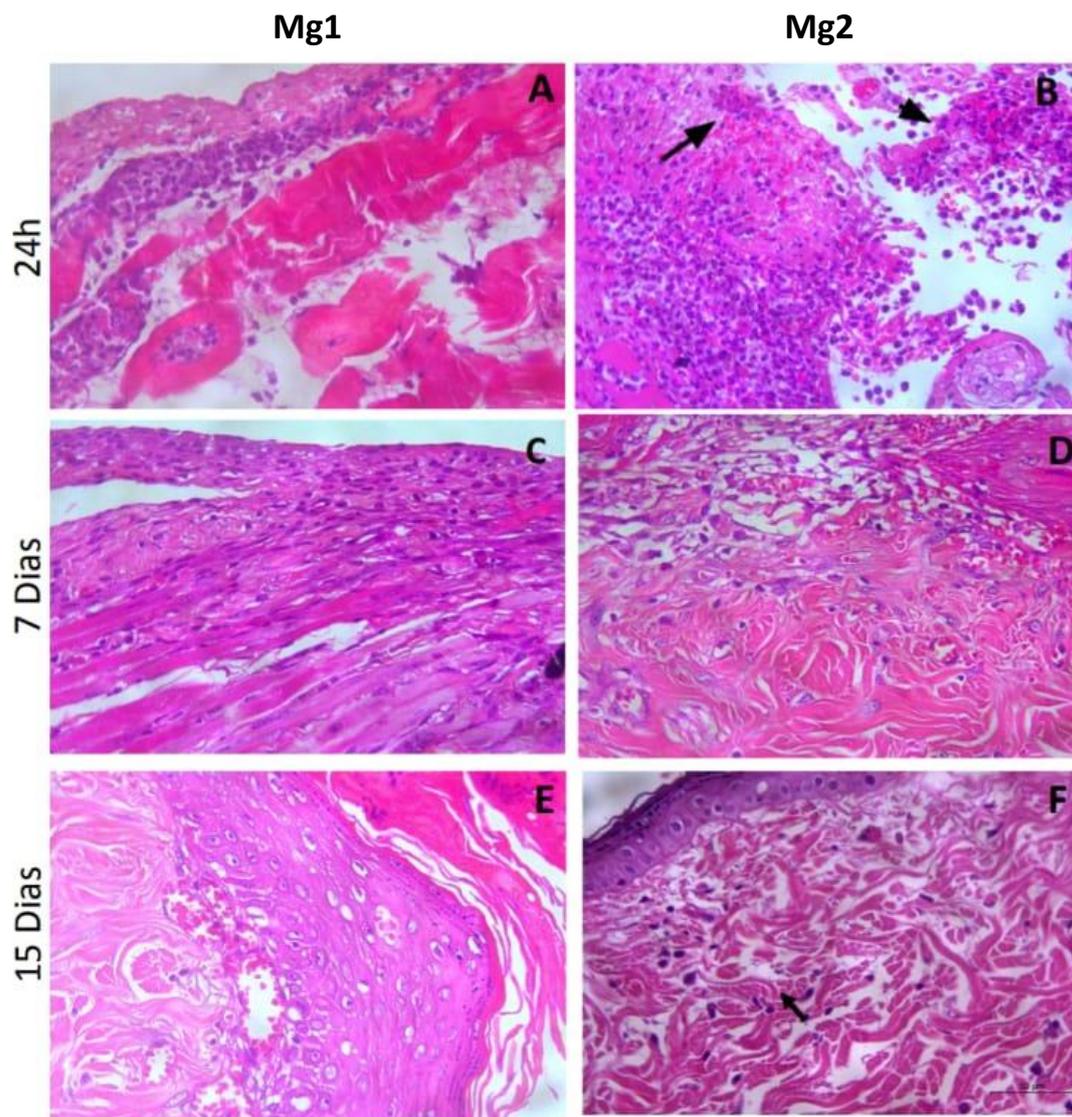
#### **5.3.1 Avaliação da biocompatibilidade**

A análise macroscópica revelou presença de edema no local da incisão especialmente após 24 horas, com redução após 7 dias e ausência de edema no 15º dia. Não foram observadas diferenças no aspecto macroscópico da ferida entre os dois grupos, em nenhum dos períodos avaliados. Os animais estavam totalmente recuperados 15 dias após a implantação das fitas, apresentando pelos no local.

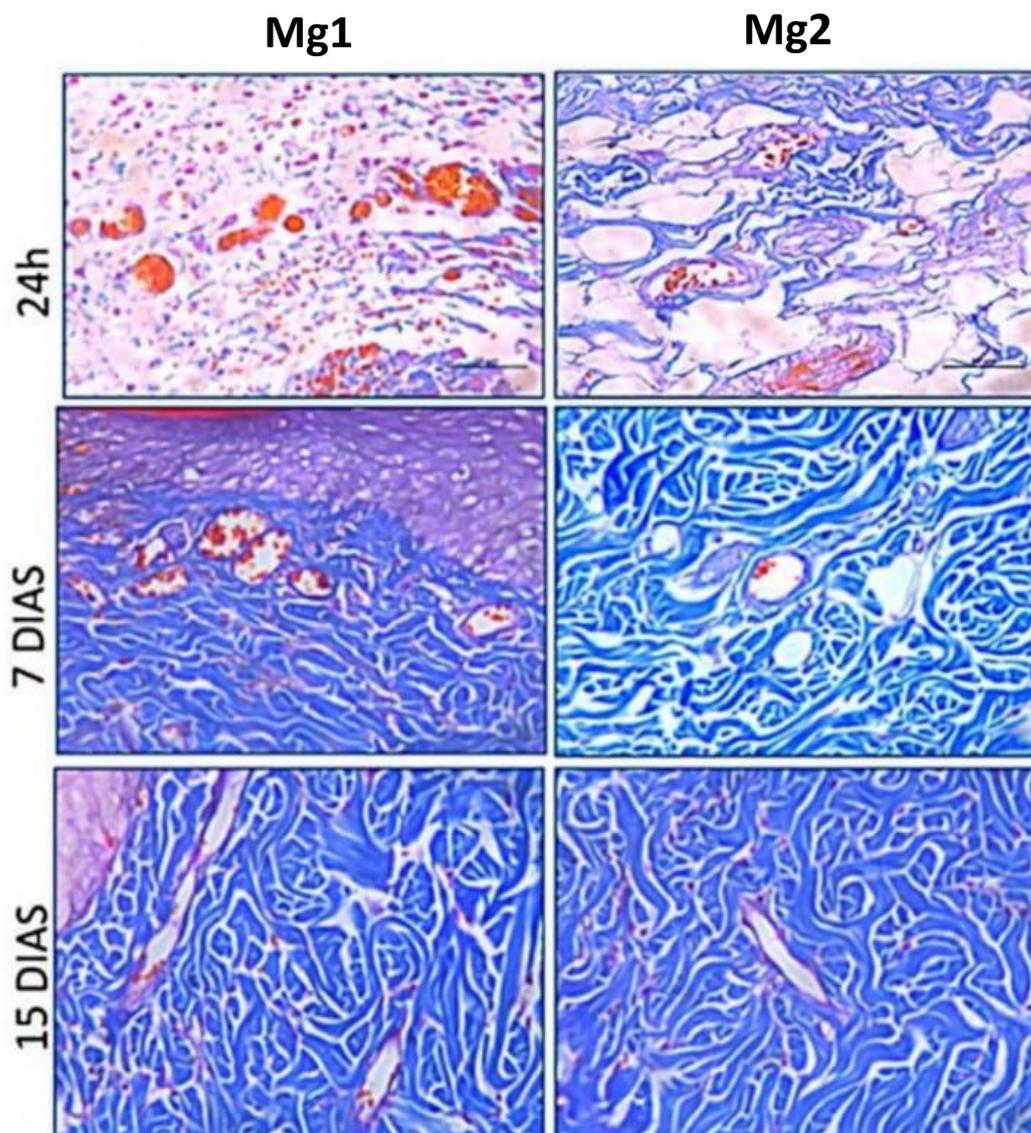
A avaliação das regiões subcutâneas adjacentes aos locais de

implantação dos biomateriais coradas com H&E reforçam os achados macroscópicos, mostrando que os grupos Mg1 e Mg2 apresentaram comportamentos cicatriciais semelhantes. Vinte e quatro horas após o implante das fitas observou-se extenso infiltrado inflamatório constituído predominantemente por neutrófilos (Figura 19). Após 7 dias, em ambos os grupos (Mg1 e Mg2) observou-se redução considerável das células inflamatórias (com predomínio de macrófagos e linfócitos) e aumento do número de vasos sanguíneos e após 15 dias não se observou a presença de infiltrado inflamatório importante. As imagens coradas com Tricômio de Mallory mostram a evolução da produção de matriz extracelular, especialmente de fibras colágenas (Figura 20).

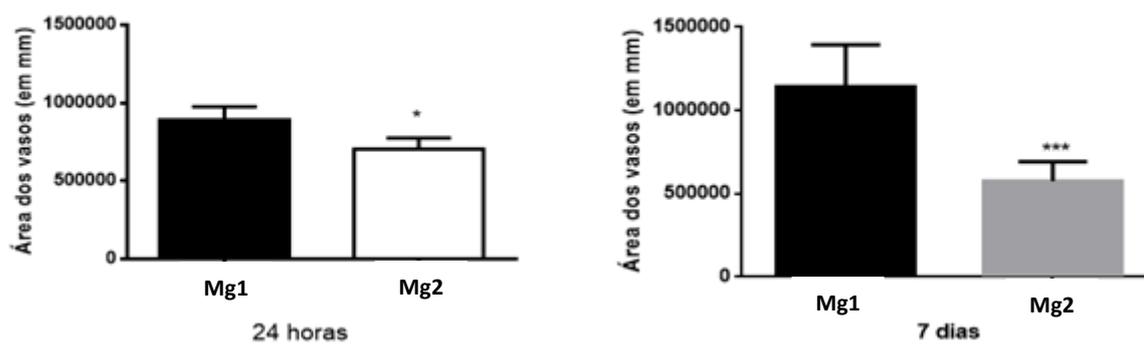
A quantificação da área dos vasos, realizada no software ImageJ, mostra um aumento significativo na área dos vasos no grupo Mg1, mas não no grupo Mg2, 7 dias após a cirurgia quando comparado com o período de 24 horas (Figura 21).



**Figura 5. Fotomicrografia do tecido subcutâneo adjacente às membranas corada por H&E.** O infiltrado inflamatório é observado pela presença de células mononucleares e polimorfonucleares presentes nas diferentes imagens (seta). A figura representa os grupos Mg1 e Mg2 em três períodos de tempo diferentes: 24h (Figuras 19A e 19B, respectivamente), 7 dias (Figuras 19C e 19D, respectivamente) e 15 dias (19 E e 19F, respectivamente) após a implantação do biomaterial. As setas pretas no período de 24 horas evidenciam o extenso infiltrado inflamatório. A seta preta no período de 7 dias evidencia o aumento na quantidade de vasos sanguíneos. A seta preta no período de 15 dias evidencia a boa recuperação do fragmento subcutâneo.



**Figura 6. Fotomicrografia do tecido subcutâneo adjacente às membranas corada por Tricômio de Mallory.** A Figura representa os grupos Mg1 e Mg2 em três períodos de tempo diferentes: 24h (Figuras 20A e 20B, respectivamente), 7 dias (Figuras 20C e 20D, respectivamente) e 15 dias (20E e 20F, respectivamente) após a implantação do biomaterial.



**Figura 7. Quantificação da área dos vasos sanguíneos nos grupos Mg1 e Mg2. Medidas realizadas nos períodos de tempo de 24 horas (21A) e 7 dias (21B). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão. \*P < 0,05, em relação ao magnésio revestido com fosfato.**

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra a potencialidade de fitas de magnésio, revestidas ou não, com fosfato de cálcio para serem utilizadas no reparo ósseo por possuir certas características, incluindo propriedades mecânicas semelhantes as do osso humano. Demonstramos que as fitas de magnésio avaliadas apresentam resistência à tração de 147 Mpa, valor muito próximo ao observado em osso cortical humano saudável, que corresponde a 150 MPa (COWING, 2001). A literatura relata que biomateriais com valores de resistência muito inferiores ao do osso humano, não são resistentes o suficiente para suportar as pressões sofridas rotineiramente, o que pode resultar em fraturas prematuras. Valores muito elevados, por outro lado, podem levar a um forte acúmulo de estresse na região entre o biomaterial e o osso (VIVACQUA, 2011).

Os nossos achados evidenciam, ainda, que as ligas de magnésio apresentam taxa de degradação mais lenta do que o colágeno, material já consagrado para essa finalidade (VERÍSSIMO *et al.*, 2012). Observamos que as fitas de magnésio, com ou sem revestimento de fosfato de cálcio, não apresentaram reabsorção significativa nos testes de biocompatibilidade em tecido subcutâneo de ratos, mesmo após 15 dias. Estudos prévios de nosso grupo, seguindo protocolo semelhante, mostram que o processo de absorção de membranas de colágeno implantadas em tecido subcutâneo inicia-se precocemente, estando completamente reabsorvidas no 15º dia. (VERÍSSIMO *et al.*, 2012). Outros estudos apontam que a degradação das membranas de colágeno pode concluir-se entre 4 e 28 dias após o seu posicionamento em tecido subcutâneo (ZHAO *et al.*, 2000; OWENS; YUKNA 2001). Os testes de imersão realizados no presente trabalho confirmam os nossos achados *in vivo*,

uma vez que as tiras de magnésio, especialmente quando recobertas com fosfato de cálcio, mostraram-se pouco reabsorvidas, mesmo após 15 dias de imersão em meio de cultivo.

O uso de biomateriais revestidos com fosfato de cálcio, portanto, é vantajoso em defeitos ósseos mais extensos, quando se faz necessário a sua permanência por um período maior de tempo, para servir como suporte temporário, estimulando a regeneração do tecido ósseo, enquanto é degradado gradualmente e substituído por novo tecido, permitindo o preenchimento completo do defeito ósseo. Esse perfil de reabsorção mais lenta é importante, especialmente, em cirurgias de reconstrução óssea em pacientes pediátricos, evitando a necessidade de novas cirurgias para substituição do biomaterial à medida que ocorre o crescimento dos ossos. Outra vantagem do magnésio em relação aos biomateriais à base de colágeno, normalmente obtido a partir do intestino bovino (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015), é o fato do magnésio ser um material totalmente sintético, sem o risco de transmissão de doenças (ALVAREZ; NAKAJIMA, 2009). Ademais, é cada vez mais comum os pacientes optarem por não utilizar produtos de origem animal por motivos diversos.

Várias pesquisas sugerem o uso de ligas de magnésio como materiais biodegradáveis para o reparo ósseo, devido a algumas propriedades essenciais, como biocompatibilidade, osteocondução e osteoindução (CUI *et al.*, 2008, CHENG *et al.*, 2015; HIROMOTO; YAMAZAKI, 2017). Essas pesquisas ressaltam, no entanto, que a liberação de hidrogênio e a alcalinização do meio causada pela corrosão *in vivo* de ligas de magnésio são os obstáculos mais críticos para o uso desse metal como material para implantes biodegradáveis. No presente trabalho, não foram observadas alterações de pH do meio de cultura

DMEM, mesmo após 15 dias de exposição às tiras de magnésio, revestidas ou não com fosfato de cálcio.

O revestimento das fitas de magnésio com fosfato de cálcio está relacionado à diminuição das taxas de corrosão do magnésio, o que resulta na modificação dos valores de pH e liberação de Mg e de hidrogênio, além de impurezas eletroquímicas, que podem interferir com o processo de formação de tecido ósseo (MARCO *et al.*, 2017). Em outras palavras, a incorporação do fosfato de cálcio impede o contato do meio fisiológico com o magnésio evitando assim a possível liberação de íons metálicos tóxicos por corrosão ou desgaste que podem levar à inflamação e reações alérgicas (CUI *et al.*, 2008; GONZALEZ *et al.*, 2018). O tratamento adequado da superfície do material pode ajudar a prevenir esse problema e criar uma ligação direta com o tecido (ORINAKOVÁ *et al.*, 2020), ademais, o revestimento de superfície também é uma forma eficaz de melhorar a bioatividade da tira de magnésio (ZHANG *et al.*, 2018). Baseado nesses estudos e considerando a similaridade química e estrutural do fosfato de cálcio com a apatita biológica, presente em grandes proporções na fase mineral dos ossos e dentes, decidimos investigar o efeito da impregnação de fitas de magnésio com o fosfato de cálcio.

Observamos a partir de micrografias de fitas de magnésio impregnadas com fosfato de cálcio, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, que o revestimento era predominantemente composto por grandes cristais em forma de placa. Nenhum substrato era visível nas micrografias e o revestimento parecia homogêneo. O fosfato de cálcio dihidratado, presente no revestimento do biomaterial testado em nosso estudo, foi usado em investigações anteriores

como um fosfato de cálcio de baixo custo e relativamente fácil de ser depositado em um determinado substrato metálico (YOUNGSHENG, 2011).

Estudos *in vitro* anteriores demonstraram que o fosfato de cálcio dihidratado é um revestimento promissor para uso clínico (XIE *et al.*, 2002). Sua biocompatibilidade tem sido demonstrada com várias linhagens celulares, incluindo macrófagos murinos pré-osteoblásticos e células fibroblásticas murinas (KLAMMERT *et al.*, 2009). Nossos resultados corroboram que esses estudos, uma vez que os osteoblastos incubados com fitas de magnésio e magnésio revestido com fosfato de cálcio apresentaram-se viáveis, sem indícios de toxicidade nos diferentes intervalos de tempo observados. O segundo grupo (Mg2) apresentou resultados ainda melhores quanto à viabilidade e proliferação celular, o que é consistente com os resultados obtidos no teste de imersão que mostra que o grupo Mg2 (magnésio revestido com fosfato de cálcio) foi mais resistente à corrosão ao longo dos dias, quando comparado ao grupo do magnésio, resultando em melhor adesão e proliferação celular. Esses resultados estão de acordo com outros estudos (WONG *et al.*, 2013; CHENG *et al.*, 2016) e também podem ser atribuídos à menor liberação de gás H<sup>2</sup> de íons Mg<sup>2+</sup> (HIROMOTO; YAMAZAKI, 2017).

Os nossos estudos para investigar a biocompatibilidade *in vivo* das fitas de magnésio e magnésio/fosfato foram baseados na análise da resposta inflamatória e da cicatrização tecidual desencadeada pela implantação subcutânea dos materiais. Parâmetros inflamatórios, como infiltrado inflamatório, presença de edema e/ou hemorragia, presença de vasos sanguíneos e deposição de colágeno foram analisados em conjunto no presente estudo. Ao contrário do que se pensava anteriormente, um material biocompatível não

precisa ser necessariamente inerte ou inócuo ao organismo. O biomaterial biocompatível ideal, utilizado como indutor de cicatrização/reparo, deve ser bioativo, capaz de desencadear uma resposta tecidual de uma forma controlada, favorecendo a cicatrização, além de ser reabsorvível para evitar uma segunda cirurgia para sua remoção. Vale ressaltar ainda, que os produtos de sua degradação não devem interferir no processo de cicatrização.

Observamos, 24h após a implantação, a presença de células inflamatórias, com predomínio de neutrófilos ao redor dos biomateriais. O processo de cicatrização, já bem descrito na literatura, inicia-se com a resposta inflamatória que se caracteriza pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a migração de neutrófilos para a ferida. Os neutrófilos são as primeiras células a atingirem o local da lesão, com maior concentração 24 horas após a lesão. Essas células são atraídas por substâncias quimiotáticas liberadas pelas plaquetas e produzem radicais livres que promovem a destruição bacteriana, sendo então gradativamente substituídas por macrófagos. Os macrófagos migram para a ferida após 48-96 horas do início da lesão e têm papel fundamental na conclusão do debridamento iniciado pelos neutrófilos. Sua maior contribuição é a secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuir para a angiogênese, fibroplasia e síntese da matriz extracelular (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). De fato, observamos aumento no número de vasos sanguíneos, especialmente nos tecidos circunvizinhos às tiras de magnésio sem recobrimento com fosfato, 7 dias após a implantação dos materiais. Observamos nesse período uma redução considerável do número de células inflamatórias, além de deposição irregular de fibras de colágeno. De fato, a literatura relata que por volta do 4º dia após a lesão, inicia-se a angiogênese e

a deposição de colágeno. Essa fase dura até o final da segunda semana. A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e é caracterizada pela migração de células endoteliais e pela formação de capilares, essenciais para uma boa cicatrização. Além disso, os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida e, após serem ativados, iniciam a produção de colágeno. O colágeno produzido inicialmente é mais fino que o colágeno presente na pele normal e tem orientação paralela à pele. Com o tempo, o colágeno inicial (colágeno tipo III) é reabsorvido e um colágeno mais espesso é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão, sendo denominado colágeno tipo I (ATTOPADHYAY; RAINES, 2014). De fato, após 15 dias, o tecido estava completamente recuperado. O processo de reparo seguiu o curso normal, resultando na cicatrização em um período de tempo adequado. O comportamento biológico das tiras de magnésio e magnésio/fosfato sugere que esses materiais são biocompatíveis e potencialmente podem ser utilizados para regeneração óssea guiada.

Observamos ainda que os biomateriais avaliados no presente estudo, além de servirem como um arcabouço para a ancoragem de osteoblastos, têm ainda a capacidade de ativar essas células. Níveis crescentes de fosfatase alcalina no meio de cultivo foram observados nos grupos Mg1 e Mg2, em comparação com o grupo controle e esse aumento foi significativamente mais evidente no grupo revestido com fosfato de cálcio (Mg2). A atividade da fosfatase alcalina tem sido usada como um marcador precoce para a funcionalidade e diferenciação de osteoblastos em experimentos *in vitro* (BENOIT *et al.* 2008).

A maior atividade dos osteoblastos incubados com as fitas de magnésio e magnésio/fosfato foi confirmada no presente estudo através da coloração

histológica de Von Kossa, usada para quantificar a mineralização em culturas de células ou cortes histológicos. Observamos que ambos os grupos (Mg1 e Mg2) desenvolveram mais nódulos de mineralização quando comparados ao grupo controle. Esse aumento ocorre tanto no tamanho quanto no número de nódulos e foi ainda maior no grupo revestido com fosfato de cálcio. Isso significa que os osteoblastos estão ativos quando incubados com os biomateriais e exercendo sua função biológica (WENNERBERG *et al.*, 2000).

A adesão dos osteoblastos ao biomaterial também é fundamental para comprovar sua eficácia como material para regeneração óssea. Ensaios de imunofluorescência analisados em confocal, foram realizados para comprovar a adesão celular no biomaterial e na área ao seu redor. Os resultados mostraram que as células ao redor do biomaterial estavam espalhadas, o que indica que estão viáveis e ativas. No entanto, as células cultivadas diretamente na superfície do biomaterial não apresentaram o formato estrelado característico, provavelmente devido à superfície irregular do biomaterial, principalmente no grupo coberto com fosfato de cálcio. Hiromoto *et al.*, 2016 estudaram o comportamento de osteoblastos cultivados em um material coberto com fosfato de cálcio e descobriram que o espaçamento entre as pontas dos cristais era muito grande para que essas células estendessem seus pseudópodes até a ponta do cristal adjacente. Isso explica porque as células cultivadas diretamente no biomaterial, nos grupos Mg1 e Mg2, apresentaram morfologia atípica apesar de estarem viáveis. As células aderidas ao redor do biomaterial, isto é, na placa de cultivo, apresentaram morfologia e comportamento idênticos aos das células cultivadas apenas em meio de cultura. Esse é mais um indício de que as células aderidas às amostras encontram-se viáveis, pois o meio de cultura da placa

também sofre influência do biomaterial, por mais que esse não ocupe toda a extensão da placa.

Por fim, avaliamos no presente estudo a influência das fitas de magnésio e magnésio fosfato na expressão de BMP-2 e na via RANK/RANKL/OPG, investigando a imunomarcagem de RANKL e OPG em osteoblastos incubados com esses biomateriais.

BMPs são um grupo de proteínas osteoindutoras, com aminoácidos e polipeptídeos arranjados sequencialmente, que são capazes de estimular as células-tronco mesenquimais a se diferenciarem em osteoblastos e formarem osso (ALONSO *et al.*, 2010). Esta proteína também atua como uma estrutura para ácidos nucleicos e fatores regulatórios envolvidos na expressão do gene esquelético (CHEUNG *et al.*, 2006).

A importância da via RANK/RANKL/OPG na modulação da osteoclastogênese tem sido bastante discutida na literatura (BAUD'HUIN *et al.*, 2007). A proteína transmembrana RANKL, conhecida como ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B, é sintetizada pelos osteoblastos, e quando se liga ao seu receptor RANK, conhecido como receptor ativador do fator nuclear kappa (expresso pelos pré-osteoclastos), ativa os osteoclastos de maturação, iniciando os processos reabsortivos, além de inibir a apoptose de osteoclastos maduros. Os osteoblastos também sintetizam osteoprotegerina (OPG), uma proteína que tem alta afinidade para RANK e, portanto, compete com RANKL pelo sítio de ligação. A relação entre RANKL e OPG, portanto, é fundamental para regular a atividade osteoclástica e a reabsorção óssea (PEREIRA *et al.*, 2011).

Para analisar a participação da via RANK/RANKL/OPG e da produção de BMP-2 no processo de ativação dos osteoblastos, foram realizados testes para investigar a expressão dessas proteínas. Os resultados mostraram um aumento significativo na marcação de OPG e BMP-2 nas células cultivadas com o biomaterial quando comparadas ao grupo controle, o que comprova a capacidade osteoindutiva do biomaterial. Também foi observado que não houve aumento da expressão de RANK-L, o que sugere osteogênese.

## 7 CONCLUSÃO

Os nossos resultados apontam para o potencial das fitas de magnésio, especialmente quando recobertas com fosfato de cálcio, na regeneração óssea, principalmente em defeitos mais extensos ou quando se deseja uma permanência maior do biomaterial por motivos diversos.

Nosso estudo demonstra vantagens da impregnação/revestimento de fitas de magnésio com fosfato de cálcio, apresentando resultados superiores na viabilidade, proliferação e ativação de osteoblastos, quando comparadas ao grupo sem revestimento.

Acreditamos que as fitas de magnésio revestidas com fosfato de cálcio são promissoras para serem utilizadas clinicamente como arcabouço em casos de defeitos ósseos críticos, como reconstrução da crista óssea, ou levantamento de seio maxilar, sugerimos, para isso, a realização de mais estudos *in vivo* abordando principalmente seu papel na regeneração óssea.

## Referências

ALONSO, N; TANIKAWA, D.; FREITAS, R.D.A.S; CANAN L, J.R; OZAWA, T.O; ROCHA, D.L. Evaluation of maxillary alveolar reconstruction using a resorbable collagen sponge with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in cleft lip and palate patients. *Tissue Eng Part C Methods*. V.16, p.1183-1189, 2010.

ALVAREZ, K.; NAKAJIMA, H. Metallic Scaffolds for Bone Regeneration. *Materials* 2009, 2, 790-832.

ARGANDA-CARRERAS I. Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics*. 2017 Aug 1;33(15):2424-2426.

BANORIYA, D., PUROHIT, R., DWIVEDI, R.K. Advanced Application of Polymer based Biomaterials. *Materials Today: Proceedings*. v.4, p.3534–3541, 2017.

BAUD'HUIN, M.; LAMOUREUX, F; DUPLOMB, L; RÉDINI, F; HEYMANN, D. RANKL, RANKL and Osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64:2334-50.

BENOIT, D.S.W; SCHWARTZ, M.P; DURNEY, A.R; ANSETH, K.S. Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells. *Nat. Mater*. 2008;7, 816–823.

BOMFIN LE, BRAGA CM, OLIVEIRA TA, MARTINS CS, FOSCHETTI DA, SANTOS AAQA, COSTA DVS, LEITÃO RFC, BRITO GAC. 5-Fluorouracil induces inflammation and oxidative stress in the major salivary glands affecting salivary flow and saliva composition. *Biochemical Pharmacology*. 2017;145: 34–45

BONEWALD L.F. The amazing osteocyte. Volume 26, Issue 2 February 2011. Pages 229-238.

CAMPOS A.C.L, BORGES-BRANCO A, GROTH A.K. Wound Healing . *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 2007;20(1):51-8

CARVALHO, EV, Apatitas nanoparticuladas incorporadas a matrizes poliméricas para aplicação odontológica. 2011, 135f. tese (doutorado) – universidade federal do ceará. faculdade de química. programa de pós-graduação em química, Fortaleza, Ceará, 2017.

CASTROGIOVANNI P; TROVALO FM; SZYCHLINSKA MA; NSIR H; IMBESI R; MUSUMECI G. The importance of physical activity in osteoporosis. From the molecular pathways to clinical evidence. *Histology and hytopathology*. 2016;31(11):11793

CASTRO-SILVA I.I.; CASTRO L.O; MACHADO J.J.D.S; Nicola M.H.A; Granjeiro JM. Isolamento de células osteoprogenitoras derivadas de sangue de cordão umbilical humano: um candidato promissor para terapias celulares para o reparo ósseo. *Einstein*. 2011;9(4 Pt 1):449-55

CHATTOPADHYAY S; RAINES R.T. Collagen-Based Biomaterials for Wound Healing. *Biopolymers*. 2014 August ; 101(8): 821–833.

CHEN Y; SHAO J.Z; XIANG L.X; DONG X.J; ZHANG G.R Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol* 2008.40(5) 815-20.

CHENG, M.Q; *et al.* A novel open-porous magnesium scaffold with controllable microstructures and properties for bone regeneration. *Sci. Rep.* 6, 24134; (2016).

CHERKAEV, E.; BONIFASI-LISTA, C. Characterization of structure and properties of bone by spectral measure method. *Journal of Biomechanics*. 2011, 44:345-351.

CHEUNG L.K; ZHENG L.W; MA L: Effect of distraction rates on expression of bone morphogenetic proteins in rabbit mandibular distraction osteogenesis. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac. Surg* 2006, 34:263–269.

CLARKE B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 Nov;3 Suppl 3(Suppl 3):S131-9.

COWIN S.C. Bone mechanics handbook, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, FL. 2001.

CUI F. Calcium phosphate coating on magnesium alloy for modification of degradation behavior. *Front. Mater. Sci. China* 2008, 2(2): 143–148.

DAMADZADEH, B., JABARI, H., SKRIFVARS, M., AIROLA, K., MORITZ, N., VALLITTU, P.K. Effect of ceramic filler content on the mechanical and thermal behaviour of poly-L-lactic acid and poly-L-lactic-co-glycolic acid composites for medical applications. *J Mater Sci Mater Med*. v.21, n.9, p.2523-2531, 2010.

DE RYCKE MS, ANDERSEN JD, HARRINGTON KM, PAMBUCCIAN SE, KALLOGER SE, BOYLAN KL, ARGENTA PA, SKUBITZ AP: S100A1 expression in ovarian and endometrial endometrioid carcinomas is a prognostic indicator of relapse-free survival. *Am J Clin Pathol*. 2009

DELLOYE, C; CORNU, O; DRUEZ, V; BARBIER, O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *J Bone Joint Surg Br*. v.89, n.5, p.574-579, 2007.

DOWNEY P.A; SIEGEL M.I. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther*. 2006 Jan;86(1):77-91.

EVERTS V; *et al*/The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res*. 2002 Jan;17(1):77-90.

FEDCHENKO; REIFENRATH: Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagnostic Pathology* 2014 9:221.

FREIRE, GE. Efeito do tratamento hidrotérmico com esponja de colágeno impregnadas com nanopartículas de hidroxiapatita na proliferação e ativação de osteoblastos e avaliação de sua biocompatibilidade (*in vitro/in vivo*). dissertação (mestrado) – universidade federal do ceará. faculdade de medicina. programa de pós-graduação em ciências morfofuncionais, Fortaleza, Ceará, 2018

FREYMAN T.M.Y; YANNAS I.V; GIBSON L.J. Cellular Materials as Porous Scaffolds for Tissue Engineering. December 2001. Progress in Materials Science. 46(3-4):273-282.

FU-ZHAI C, *et al.* Calcium phosphate coating on magnesium alloy for modification of degradation behavior. Front. Mater. Sci. China 2008, 2(2): 143–148.

GINALDI, L; MARTINIS, M. Osteoimmunology and Beyond. Current Medicinal Chemistry. v.23, n.33, p.3754-3774, 2016.

GÓMEZ-BARRENA, E. Bone regeneration: stem cell therapies and clinical studies in orthopaedics and traumatology. J Cell Mol Med. 2011. v.15, n.6, p.1266-86, 2011.

GONZALEZ J; HOU R.Q; ESHWARA P.S; NIDADAVOLU; WILLUMEIT-REOMER R, FEYERABEND F. Magnesium degradation under physiological conditions e Best Practice. Bioactive Materials 3 (2018) 174e185

HADJIDAKIS D.J; ANDROULAKIS. Bone Remodeling. Volume 1092, Issue 1. Women's Health and Disease: Gynecologic, Endocrine, and Reproductive Issues. December 2006:385-396.

HIROMOTOA S; YAMAZAKI T. Micromorphological effect of calcium phosphate coating on compatibility of magnesium alloy with osteoblast. Science and Technology of Advanced Materials, 2017 Vol.18, n.1,96–109.

ISKANDAR M.E; ASLANI A; LIU H. The effects of nanostructured hydroxyapatite coating on the biodegradation and cytocompatibility of magnesium implants. J Biomed Mater Res Part A. 2013;101A:2340–54.

ISKANDAR M.E; ASLANI A; TIAN Q; LIU H. Nanostructured calcium phosphate coatings on magnesium alloys: characterization and cytocompatibility with mesenchymal stem cells. J Mater Sci: Mater Med (2015) 26:189

JAMES, A.W. *et al.* A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. Tissue Eng Part B Rev. v.22, n.4, p.284-97, 2016.

KEARNS A.E; KHOSLA S; KOSTENNIK P.J. Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. May 2008. Endocrine Reviews 29(2):155-92.

KIMELMAN N; PELLERED G; GAZIT D. Tissue eng. 2007;13:1135-1150

KLAMMERT U; REUTHER T; JAHN C; KRASKI B; KBLER A; GBURECK U. Cytocompatibility of brushite and monetite cell culture scaffolds made by three-dimensional powder printing. Acta Biomater 2009; 5(2):727.

KÖHLER C; ORRENIUS S; ZHIVOTOVSKY B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. J Immunol Methods. 2002 Jul 1;265(1-2):97-110.

KRICHELDORF, F. Substitutos ósseos-Quando utilizá-los? In: CARVALHO, P.S.P. (Ed.). Osseointegração 20 anos, Visão contemporânea da implantodontia. São Paulo: Quintessence, p.97-122, 2009.

LEIBBRANDT, A.; PENNIGER, J.M. Rank/rankl: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann n yacadsci.* 2008;1143:123-50.

LEITAO RF, RIBEIRO RA, BELLAGUARDA EA, MACEDO FD, SILVA LR, ORIA RB, VALE ML, CUNHA FQ, BRITO GA. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5- fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. *Cancer Chemother Pharmacol.*, v. 59, n. 5, p.603-12, 2007.

MARCO I; *et al.* In vivo and in vitro degradation comparison of pure Mg, Mg-10Gd and Mg-2Ag: a short term study. *Eur. Cells Mater* 2017. 33:90-104

MATTHEW, B.; GREENBLATT M.B.; SHIM, J-H. Osteoimmunology: A Brief Introduction. *Immune Network.* v.13, n.4, p.111-115, 2013.

MISHRA S; KNOTHE-TATE M.L.K. Effect of lacunocanalicular architecture on hydraulic conductance in bone tissue: Implications for bone health and evolution. *The anatomic record.* Volume 273, Issue 2August 2003:752-762.

MOSS, D.W; WHITBY, L.G.A. Alkaline phosphatase isoenzymes. Technical and clinical aspects. *Enzyme.* v. 20, n. 1, p. 20-34, 1975.

ORINAKOVÁ R; GOREJOVÁ R; KRÁLOVÁ Z.O; NAK O.A. Surface Modifications of Biodegradable Metallic Foams for Medical Applications. *Coatings* 2020,10:819.

OWENS, K.W.; YUKNA, R.A. Collagen membrane resorption in dogs: a comparative study. *Implant. Dent.*, v. 10, p.49-56, 2001.

PARK K.D; *et al.* Effect of magnesium and calcium phosphate coatings on osteoblastic responses to the titanium surface. *J Adv Prosthodont* 2013;5:402-8

PEREIRA, A.; VAZ, P.; ROCHA, G.; FELINO, A.; TAVARES, P. Engenharia genética em implantologia – O RANKL. *Rev port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.* 2011;52(3):170-174.

PIRES A.L.R; ANDRÉA C.K; BIERHALZ E ÂNGELA M. MORAES. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quim. Nova*, Vol. 38, No. 7, 957-971, 2015.

SALEH MM, TOUNY AH, AL-OMAIR MA, SALEH MM. Biodegradable/biocompatible coated metal implants for orthopedic applications. *Biomed Mater Eng.* 2016 May

SEZER N; EVIS Z; KAYHAN S.M; TAHMASEBIFAR A; KOÇ M. Review of magnesium-based biomaterials and their applications. *Journal of Magnesium and Alloys* 6 (2018) 23–43.

SHADANBAZ S; DIAS G.J. Calcium phosphate coatings on magnesium alloys for biomedical applications: a review. *Acta Biomater.* 2012;8:20–30.

SHISHKOVSKY, L.T; VOLOVA, M.V; KUZNETSOV, Y.U.G; MOROZOV L.P. Porous biocompatible implants and tissue scaffolds synthesized by selective laser sintering from Ti and NiTi. *Journal of Materials Chemistry.* Issue 12. 2008.

SONG Y; ZHANG S.X; LI J.A, ZHAO C.L; ZHANG X.N. Electrodeposition of Ca-P coatings on biodegradable Mg alloy: in vitro biomineralization behavior. *Acta Biomater.* 2010;6:1736–42.

STAIGER M.P; PIETAK A.M; HUADMAI J. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials*, 2006,27:1728–1734.

SWEENEY, L.; LANCASTER, W.P.; DEAN, N.R.; MAGNUSON, J.S.; CARROLL, W.R.; LOUIS, P.J.; ROSENTHAL, E.L. Use of recombinant bone morphogenetic protein 2 in 73 free flap reconstruction for osteonecrosis of the mandible. *J Oral Maxillofac Surg.* V.70, p.1991-1996, 2012.

TAKAYANAGI H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. September 2005. *Journal of periodontal*;40(4):287-93.

TIAN H; TANG Z; ZHUANG X; CHEN X; JING X. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science.* v.37, n.2, p.237-280, 2012.

TOREZAN J.R.F; FONSECA A.P.Z. Biomateriais em implantodontia. *Implantodontia Clínica Abross.* São Paulo: Quintessence Editora, 2010. P 17-25.

TSAY, J. et al. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood.* v.116, n.14, p.2582-2589, 2010.

VERÍSSIMO, D.M. Avaliação da biocompatibilidade e bioatividade de membranas colágeno polianiónico mineralizadas e reticuladas em modelos de animais. 2012. 168 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, 2012.

VIVACQUA C.F.P.P. Propriedades mecânicas em flexão e torção do osso cortical bovino. Cristiane Ferreira Pinto Paterlini Vivacqua - Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2011.

WANG, H; LI, Y; ZUO, Y; LI, J; MA, S; CHENG, L. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* v.28, n., p.3338-3348, 2007.

WEITZMANN, M.N. The Role of Inflammatory Cytokines, the RANKL/OPG Axis, and the Immun skeletal Interface in Physiological Bone Turnover and Osteoporosis. *Scientifica* (Cairo). 2013.

WENBERG C; HESSLE L; LUNDBERG P; MAURO S; NARISAWA S; ULF H. LERNER, MILLA J.L. Functional Characterization of Osteoblasts and Osteoclasts from Alkaline Phosphatase Knockout Mice. *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH* Volume 15, Number 10, 2000

WONG, H. M. *et al.* In vivo stimulation of bone formation by aluminum and oxygen plasma surface-modified magnesium implants. *Biomaterials* 34, 9863–9876 (2013)

WONG, H. M. *et al.* Low-modulus Mg/PCL hybrid bone substitute for osteoporotic fracture fixation. *Biomaterials* 34, 7016–7032 (2013).

Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 1992; 32:160-7

XIE J; RILEY C; KUMAR M; CHITTUR K. FTIR/ATR study of protein adsorption and brushite transformation to hydroxyapatite. *Biomaterials* 2002;23(17):3609–16.

XIN Y.C; HUO K.F; TAO H; TANG G.Y; CHU P.K. Influence of aggressive ions on the degradation behavior of biomedical magnesium alloy in physiological environment. *Acta Biomater.* 2008;4:2008–15.

YONGSHENG W. Sol–gel derived hydroxyapatite coatings on metallic implants: characterization, in vitro and in vivo analysis. *Biol Biomed Coat: Appl* 2011;1(1000):1.

ZHANG, K.; *et al.* Advanced smart biomaterials and constructs for hard tissue engineering and regeneration. *Bone Res.* 2018, 6,1–15.

ZHAO, S.; PINHOLT, E. M.; MADSEN, J. E.; DONATH, K. Histological evaluation of different biodegradable and nonbiodegradable membranes implanted subcutaneously in rats. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, v.28, p.116–122, 2000.

## ANEXO 1



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES OSTEOGÊNICAS DE TIRAS DE MAGNÉSIO REVESTIDAS COM FOSFATO DE CÁLCIO E SEU USO COMO BIOMATERIAL PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA", protocolada sob o CEUA nº 8526290319 (ID 001022), sob a responsabilidade de **Renata Ferreira de Carvalho Leitão** e equipe; *Mariana de Oliveira Viana Veras* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 21/05/2019.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE OSTEOGENIC PROPERTIES OF MAGNESIUM STRIPS COATED WITH CALCIUM PHOSPHATE AND ITS USE AS BIOMATERIAL FOR BONE REGENERATION", utilizing 54 Heterogenics rats (54 males), protocol number CEUA 8526290319 (ID 001022), under the responsibility of **Renata Ferreira de Carvalho Leitão** and team; *Mariana de Oliveira Viana Veras* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 05/21/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 04/2019 a 12/2019

Área: Departamento de Morfologia

Origem: **Biotério Central da UFC**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **5 a 6 semanas**

N: **54**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **180 a 200 g**

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados no Biotério do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará

Fortaleza, 14 de julho de 2019

*Alexandre Havt Bindá*

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

*C. Roncari*

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

