

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO XAVIER PERES

**META-ANÁLISE DA RESPOSTA BIOLÓGICA *IN VITRO* DE
BIOCERÂMICAS À BASE DE FOSFATOS DE CÁLCIO DOPADAS
COM BORO, ESTRÔNCIO E MAGNÉSIO E PRODUÇÃO DE
HIDROXIAPATITA DOPADA COM BORO E ESTRÔNCIO**

CURITIBA

2022

GUSTAVO XAVIER PERES

**META-ANÁLISE DA RESPOSTA BIOLÓGICA *IN VITRO* DE
BIOCERÂMICAS À BASE DE FOSFATOS DE CÁLCIO DOPADAS
COM BORO, ESTRÔNCIO E MAGNÉSIO E PRODUÇÃO DE
HIDROXIAPATITA DOPADA COM BORO E ESTRÔNCIO**

**Meta-analysis of in vitro biological response of boron, strontium and
magnesium doped calcium phosphate bioceramics and production of
hydroxyapatite doped with boron and strontium**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentada como requisito para obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Mecânica da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Orientador(a): Prof. Dr. Lucas Freitas Berti

Coorientador(a): Prof. Dr. Marco Augusto Stimamiglio

CURITIBA

2022



Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

GUSTAVO XAVIER PERES

**META-ANÁLISE DA RESPOSTA BIOLÓGICA *IN VITRO* DE
BIOCERÂMICAS À BASE DE FOSFATOS DE CÁLCIO DOPADAS
COM BORO, ESTRÔNCIO E MAGNÉSIO E PRODUÇÃO DE
HIDROXIAPATITA DOPADA COM BORO E ESTRÔNCIO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentada como requisito para obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Mecânica da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Data de aprovação: 22/junho/2022

Lucas Freitas Berti

Doutor

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba

Marjorie Benegra

Doutora

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba

Euclides Alexandre Bernardelli

Doutor

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba

CURITIBA

2022

AGRADECIMENTOS

Desejo agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Lucas Freitas Berti, pela amizade e pela sabedoria com que me guiou nesta trajetória.

Ao Prof Dr.. Marco Augusto Stimamiglio pelo auxílio que foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de graduação e de pesquisa.

Gostaria de deixar registrado também, o meu reconhecimento à minha família, pois sem o apoio deles seria muito difícil concluir essa etapa de minha vida.

Agradeço também ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Ferramentas para a Saúde-RPT – FIOCRUZ pela utilização da unidade de microscopia, RPT07C, do Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-Paraná.

Gostaria de agradecer ao Centro Multiuso de Caracterização de Materiais-CMCM da UTFPR-CT.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação Araucária FA - Paraná/Brasil.

RESUMO

A utilização de materiais biocerâmicos dopados com íons tem sido alvo de muitas pesquisas pela capacidade de melhorar o potencial de integração óssea de enxertos e implantes. Este trabalho tentou produzir amostras de hidroxiapatita não dopada e dopada com íons de estrôncio e boro utilizando a técnica de precipitação aquosa e coletou dados para um estudo preliminar de avaliação dos efeitos na resposta biológica de biocerâmicas baseadas em fosfatos de cálcio, provocados pela adição de íons de estrôncio, boro e magnésio. Este estudo preliminar visa a produção posterior de uma revisão sistemática de literatura (RSL). Palavras-chaves foram escolhidas para consultar nas seguintes bases de dados: Scopus, PubMed, Embase e Web of Science. Os resultados obtidos passaram por duas fases de triagem para selecionar os artigos que foram utilizados para a elaboração da meta-análise da RSL. A meta-análise foi realizada com dados de artigos selecionados utilizando o ensaio de fosfatase alcalina (ALP) como parâmetro de comparação. Este estudo preliminar permitiu tomar conhecimento da produção científica publicada acerca do tema de interesse e das dificuldades que estarão presentes para a elaboração futura de uma revisão sistemática e a produção de hidroxiapatita dopada e não dopada resultou em amostras satisfatórias.

Palavras-chave: Biomateriais cerâmicos, Dopagem, Boro, Estrôncio, Magnésio.

ABSTRACT

The use of ion-doped bioceramic materials has been the subject of much research due to its ability to improve the bone integration potential of grafts and implants. This work tried to produce samples of undoped and doped hydroxyapatite with strontium and boron ions using the aqueous precipitation technique and collected data for a preliminary study to evaluate the effects on the biological response of bioceramics based on calcium phosphates, caused by the addition of ions of strontium, boron and magnesium. This preliminary study aims at the further production of a systematic literature review (SRL). Keywords were chosen to be searched in the following databases: Scopus, PubMed, Embase and Web of Science. The results obtained went through two screening phases to select the articles that were used for the elaboration of the RSL meta-analysis. The meta-analysis was performed with data from selected articles using the alkaline phosphatase (ALP) assay as a benchmark. This preliminary study allowed us to get to know the scientific production published on the topic of interest and the difficulties that will be present for the future elaboration of a systematic review and the production of doped and non-doped hydroxyapatite resulted in satisfactory samples

Keywords: Ceramic Biomaterials, Doping, Boron, Strontium, Magnesium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|-----------|
| Figura 1 - Meta-análise do resultado do ensaio ALP em todas as amostras dopadas com estrôncio selecionadas..... | 24 |
| Figura 2 - Meta-análise do resultado do ensaio ALP em todas as amostras dopadas com magnésio selecionadas | 28 |
| Figura 3 - Gráfico de funil da meta-análise contendo a) todos os estudos que utilizaram estrôncio; b) todos os estudos que utilizaram magnésio | 30 |
| Figura 4 – Resultado de ensaio de DRX da amostra de hidroxiapatita sem dopagem | 31 |
| Figura 5 - Resultado de ensaio de DRX da amostra de hidroxiapatita dopada com estrôncio | 32 |
| Figura 6 - Resultado de ensaio de DRX da amostra de hidroxiapatita dopada com boro | 32 |
| Figura 7 – Imagem de MEV da amostra de HAp sem dopagem com a) ampliação de 5000x; b) ampliação de 10000x; c) ampliação de 15000x | 34 |
| Figura 8 – Imagem de MEV da amostra de HAp dopada com boro com a) ampliação de 5000x; b) ampliação de 10000x; c) ampliação de 15000x | 35 |
| Figura 9 – Imagem de MEV da amostra de HAp dopada com estrôncio com a) ampliação de 5000x; b) ampliação de 10000x; c) ampliação de 15000x..... | 35 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|-----------|
| Quadro 1 - Alguns tipos conhecidos de fosfatos de cálcio..... | 17 |
| Quadro 2 – Artigos com estrôncio selecionados para a coleta de dados..... | 23 |
| Quadro 3 – Artigos com magnésio selecionados para a coleta de dados | 27 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 | Objetivos gerais e específicos | 13 |
| 2 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 15 |
| 2.1 | Revisões sistemáticas | 15 |
| 2.2 | Diferenciação celular e osteogênese | 15 |
| 2.3 | Biocerâmicas baseadas em fosfato de cálcio | 16 |
| 2.4 | Dopagem de biocerâmicas | 17 |
| 2.4.1 | Estrôncio como agente dopante | 17 |
| 2.4.2 | Boro como agente dopante | 18 |
| 2.4.3 | Magnésio como agente dopante | 18 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 19 |
| 3.1 | Meta-análise | 19 |
| 3.1.1 | Definição do tema | 19 |
| 3.1.2 | Critérios de pesquisa | 19 |
| 3.1.3 | Seleção de artigos e extração de dados | 20 |
| 3.1.4 | Produção da meta-análise | 20 |
| 3.2 | Produção de hidroxiapatita | 21 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 22 |
| 4.1 | Meta-análise | 22 |
| 4.1.1 | Resultados da pesquisa com estrôncio | 22 |
| 4.1.2 | Meta-análise com artigos que utilizaram estrôncio | 23 |
| 4.1.3 | Amostras com 2% de estrôncio e 7 dias de experimento | 25 |
| 4.1.4 | Amostras com 5% de estrôncio e 7 dias de experimento | 25 |
| 4.1.5 | Amostras com 5% de estrôncio e 14 dias de experimento | 25 |
| 4.1.6 | Amostras com 10% de estrôncio e 7 dias de experimento | 25 |

| | | |
|----------------|--|----|
| 4.1.7 | Amostras com 10% de estrôncio e 14 dias de experimento..... | 26 |
| 4.1.8 | Resultados da pesquisa com magnésio..... | 26 |
| 4.1.9 | Meta-análise com artigos que utilizaram magnésio | 27 |
| 4.1.10 | Amostras com 5% de magnésio e 7 dias de experimento..... | 29 |
| 4.1.11 | Amostras com 10% de magnésio e 7 dias de experimento | 29 |
| 4.1.12 | Heterogeneidade estatística e viés de produção | 29 |
| 4.2 | Produção da hidroxiapatita | 31 |
| 4.2.1 | Análise de cristalografia por difração de raios-x..... | 31 |
| 4.2.2 | Análise de morfologia por microscopia eletrônica de varredura ... | 34 |
| 4.3 | Expectativas para resultados futuros e interação com entidade | |
| externa | | 36 |
| 5 | CONCLUSÕES | 37 |
| | REFERÊNCIAS | 38 |

1 INTRODUÇÃO

Anualmente ocorrem cerca de 2,2 milhões de transplantes de tecidos ósseos no mundo (VAN DER STOK, VAN LIESHOUT, *et al.*, 2011). O tecido considerado ideal para esses transplantes é chamado de autógeno, que é retirado do próprio paciente, porém esse tipo de tecido produz complicações como a necessidade de efetuar um procedimento cirúrgico para retirada do tecido e grande chance de complicações pós-operatórias (CANCEDDA, GIANNONI, *et al.*, 2007).

Como alternativa para tecidos autógenos, materiais biocerâmicos baseados em fosfatos de cálcio, como a hidroxiapatita, são estudados por sua grande capacidade de osteointegração, um fenômeno que se refere à capacidade de fusão entre um implante e ossos (JIN, CHU, 2019), (DOROZHKIN, 2009), e suas aplicações em implantes e enxertos ósseos (OLIVEIRA, BERTI, *et al.*, 2021). Além das propriedades biológicas inerentes desses biomateriais, existe a possibilidade de melhorar seu potencial de osteointegração através da introdução de íons inorgânicos, como estrôncio (Sr), boro (B) e magnésio (Mg), em sua composição (LODOSO-TORRECILLA, KLEIN GUNNEWIEK, *et al.*, 2020).

Dentro do contexto abordado, nas bases de dados Scopus, PubMed, Embase e Web of Science existem poucos estudos de revisão sistemática que avaliam a alteração do desempenho biológico provocado pela introdução de íons em biocerâmicas baseadas em fosfatos de cálcio. Um trabalho que aborda esse tema é o de Lodoso-Torrecilla e colaboradores onde foi desenvolvida a proposta de avaliação da alteração de desempenho causado pela dopagem, entretanto são avaliados artigos que utilizaram ensaios *in vivo* (LODOSO-TORRECILLA, KLEIN GUNNEWIEK, *et al.*, 2020), e não foi possível encontrar nenhum artigo que aborda o caso específico de ensaios *in vitro*. Portanto se observa a necessidade de avaliar os estudos que estão publicados na literatura que verificam a alteração do desempenho provocado pela dopagem em ensaios *in vitro*.

1.1 Objetivos gerais e específicos

Diante do contexto citado, este trabalho tem como objetivo fazer uma investigação preliminar do que está sendo produzido em termos de avaliação *in vitro*

do impacto da dopagem de materiais biocerâmicos baseados em fosfatos de cálcio com íons de estrôncio, magnésio e Boro com o intuito de examinar a possibilidade de produzir uma revisão sistemática sobre o tema anunciado.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) Pesquisar a produção científica sobre dopagem de materiais biocerâmicos baseados em fosfatos de cálcio com estrôncio, magnésio e boro nas bases de dados Scopus, PubMed, EmBase e Web of Science;
- b) Selecionar, a partir dos artigos encontrados, aqueles que são adequados ao tema abordado para a elaboração de uma revisão sistemática de literatura;
- c) Produzir uma meta-análise preliminar dos resultados obtidos com os ensaios *in vitro* de atividade ALP (fosfatase alcalina), pois a fosfatase alcalina é um importante indicador de formação de tecidos duros (YEDEKÇI, TEZCANER, *et al.*, 2021), nos artigos selecionados e;
- d) Produzir amostras de hidroxiapatita sem dopagem e dopada com íons de estrôncio e boro e analisar as amostras com auxílio de ensaios de difração de raios-x e com imagens de microscópio eletrônico de varredura.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nesta seção serão apresentadas as fundamentações teóricas que norteiam este projeto.

2.1 Revisões sistemáticas

Revisão sistemática da literatura (RSL) é um tipo de investigação científica que busca reunir evidências empíricas que se enquadram em critérios pré-estabelecidos para responder uma pergunta específica. (COCHRANE, 2021).

A principal diferença entre uma revisão sistemática e uma revisão narrativa está nas características desse tipo de investigação que busca, além, evitar vieses durante a pesquisa, também possui uma metodologia sistemática de elaboração da pesquisa, tornando-a reprodutível em termos das respostas encontradas (THOMA, EAVES, 2016).

Entre as características necessárias para revisões sistemáticas estão: um conjunto de objetivos claramente definidos com critérios de elegibilidade predefinidos para selecionar os estudos; ter uma metodologia explícita e reprodutível; efetuar uma busca sistemática para encontrar o máximo de artigos elegíveis; avaliar a validade de estudos incluídos e uma apresentação sistemática das características e descobertas dos estudos incluídos. (COCHRANE, 2021)

Para produzir uma pergunta clara e objetiva são utilizados critérios de pesquisa. Para revisões que buscam analisar a efetividade de algum tipo de intervenção geralmente é utilizado o critério PICOS, onde P (*population*) é a população de interesse, I (*intervention*) significa a intervenção aplicada, C (*control*) é o controle utilizado, O (*outcome*) e o desfecho obtido e S (*study type*) são os tipos de estudos analisados (POLLOCK, BERGE, 2018).

2.2 Diferenciação celular e osteogênese

A diferenciação celular é um processo no qual uma célula indiferenciada se modifica e se torna uma célula diferenciada, ou seja, capaz de exercer uma função específica em um organismo. Osteogênese é um processo de desenvolvimento

ósseo no qual células formadoras de ossos se desenvolvem à partir de células tronco mesenquimais através de processos biológicos regulados por vias de sinalização celular (THOMAS, JAGANATHAN, 2022). As células-tronco mesenquimais humanas são células multipotentes que podem se replicar como células indiferenciadas e possuem potencial de se diferenciar em diversas variedades de tecidos como ossos, cartilagem, gordura, tendões e músculos (PITTINGER, MACKAY, *et al.*, 1999). Entre as células que podem ser criadas à partir de células tronco mesenquimais estão os osteoblastos, que são células responsáveis pela produção de tecido ósseo e responsável também pela síntese de fosfatase alcalina, um marcador altamente específico da atividade de formação óssea dos osteoblastos (ROUDSARI, MAHJOUB, 2012).

2.3 Biocerâmicas baseadas em fosfato de cálcio

As biocerâmicas baseadas em fosfatos de cálcio possuem destaque entre os biomateriais utilizados para implantes/transplantes ósseos por possuírem uma fase cristalina semelhante àquela apresentada pela fase dos ossos humanos (LODOSO-TORRECILLA, KLEIN GUNNEWIEK, *et al.*, 2020).

Fosfatos de cálcio são conjuntos de materiais e minerais constituídos principalmente de íons de cálcio em conjunto com o íon poliatômico fosfato, porém possuem diferenças entre si causadas pela variação da razão entre Ca/P e pela presença de traços de outros elementos (DOROZHKIN, 2009). O Quadro 1 apresenta alguns tipos conhecidos de fosfatos de cálcio.

Quadro 1 - Alguns tipos conhecidos de fosfatos de cálcio

| Razão Ca/P | Nome do composto e abreviação | Formula química |
|------------|--|--|
| 1,33 | Fosfato de octacálcio (OCP) | $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ |
| 1,5 | Fosfato tricálcico α (α -TCP) | $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ |
| 1,5 | Fosfato tricálcico β (β -TCP) | $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ |
| 1,67 | Hidroxiapatita (HA) | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ |

Fonte: Adaptado de DOROZHKIN, 2009

2.4 Dopagem de biocerâmicas

Conforme foi apresentado anteriormente, cálcio e fósforo são elementos principais na composição da apatita óssea, porém além desses componentes existem traços de outros elementos e.g. silício, estrôncio, zinco, boro, magnésio. (HOPPE, GÜLDAL, et al., 2011). Portanto a adição de tais elementos na composição de biomateriais pode trazer efeitos benéficos como estimulação do processo de osteogênese, efeitos antibacterianos, entre outros (HOPPE, GÜLDAL, et al., 2011). Os principais métodos para incorporar íons em biomateriais cerâmicos é a adição desses elementos durante o processo de síntese das biocerâmicas ou através de imersão de amostras já preparadas em soluções que contenham os íons desejados onde ocorre a adsorção física desses elementos (BOSCH-RUÉ, DIEZ-TERCERO, et al., 2021).

2.4.1 Estrôncio como agente dopante

O estrôncio é um elemento químico da mesma família do cálcio e apresentam raios atômicos próximos. Por essa razão, o estrôncio tem a capacidade de substituir o cálcio na rede cristalina de hidroxiapatita e outras biocerâmicas baseadas em fosfatos de cálcio (LODOSO-TORRECILLA, KLEIN GUNNEWIEK, et al., 2020). O estrôncio é utilizado como princípio ativo em fármacos como o ranelato de estrôncio, que auxilia no tratamento de osteoporose ao estimular a ação de osteoblastos e inibindo o funcionamento de osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção de tecido ósseo, gerando um aumento de densidade óssea (NARUPHONTJIRAKUL, TSIGKOU, et al., 2019). O potencial terapêutico do

estrôncio como agente dopante foi investigado por Stipniece, a qual mostrou através de experimentos *in vitro*, que amostras dopadas com estrôncio tem uma elevada expressão de fosfatase alcalina e de colágeno I, em comparação com amostras não dopadas, indicando um amadurecimento mais rápido de osteoblastos (STIPNIECE, WILSON, *et al.*, 2021).

2.4.2 Boro como agente dopante

Boro é um elemento químico que está sendo associado à saúde óssea. O mecanismo responsável pelo seu efeito nos ossos ainda é pouco conhecido, porém existem resultados na literatura demonstrando o efeito de suplementos dietéticos com boro na saúde óssea de seres humanos e suínos (PRICE, LANGFORD, *et al.*, 2012). Quando adicionado em pequenas quantidades à composição da hidroxiapatita, íons de boro substituem os grupos fosfato (YEDEKÇI, TEZCANER, *et al.*, 2021). Seu potencial como agente terapêutico foi investigado por Li e colaboradores em um experimento que envolveu nanotubos de nitreto de boro, esse estudo concluiu que os nanotubos de nitreto de boro tiveram uma boa compatibilidade com células tronco mesenquimais e estimularam o processo de osteogênese (LI, WANG, *et al.*, 2016).

2.4.3 Magnésio como agente dopante

O Magnésio é um elemento químico alcalino terroso que está presente nos ossos e também faz parte do esmalte e na dentina dos dentes (YEDEKÇI, TEZCANER, *et al.*, 2021). A deficiência de magnésio afeta a saúde óssea e pode acarretar em fragilidade e baixa densidade óssea (CACCIOTTI, BIANCO, *et al.*, 2009). O magnésio, assim como o estrôncio, substitui o cálcio na estrutura cristalina do material (MOURIÑO, VIDOTTO, *et al.*, 2019). Suas aplicações terapêuticas estão relacionadas ao regulamento da função das glândulas paratireoides e o metabolismo de vitamina D, ambas importantes para a saúde óssea (CORREA-PIÑA, GOMEZ-VAZQUEZ, *et al.*, 2021). A atuação do magnésio como dopante em biomateriais é benéfica por estimular a atividade de fosfatase alcalina e a mineralização de matriz óssea (BOSCH-RUÉ, DIEZ-TERCERO, *et al.*, 2021).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Na seção a seguir serão apresentados os materiais e metodologias que serão empregadas para a realização deste trabalho.

3.1 Meta-análise

Nesta seção serão apresentados os passos adotados para produzir a meta-análise.

3.1.1 Definição do tema

Considerando os critérios PICOS, esse estudo atribuiu: a População como sendo de estudos *in vitro*; a Intervenção como sendo a dopagem de íons boro e estrôncio e magnésio em biocerâmicas a base de fosfato de cálcio; o Controle como sendo essas mesmas biocerâmicas sem a dopagem; os Desfechos como sendo os valores de ensaios de atividade ALP para avaliar a resposta biológica; e o Tipo de Estudo como sendo apenas artigos de periódicos. A pergunta a ser respondida pela revisão sistemática é: “biocerâmicas a base de fosfato de cálcio dopadas com íons de Boro e Estrôncio e Magnésio apresentam melhor resposta biológica de diferenciação celular osteogênica em comparação com uma biocerâmica sem dopagem?”.

3.1.2 Critérios de pesquisa

Para encontrar artigos originais que tratam do tema de interesse, foram utilizados os seguintes termos de pesquisas: “*Hydroxyapatite*”, “*Calcium Phosphate*”, “*Ceramics*”, “*Biom mineralization*”, “*Bone Regeneration*”, “*Gene Expression*”, “*Cell Proliferation*”, “*Cell Differentiation*”, “*Boron*”, “*Magnesium*”, e “*Strontium*”. As pesquisas foram conduzidas nas bases de dados Scopus, PubMed, EmBase e Web of Science. Somente artigos escritos na língua inglesa e publicados entre 2016 e 2021 foram incluídos nesse estudo.

3.1.3 Seleção de artigos e extração de dados

A seleção inicial dos estudos foi baseada no conteúdo do título e resumo dos artigos encontrados. Na segunda fase a seleção ocorreu com a leitura completa dos artigos que passaram da primeira fase. Os dados extraídos dos estudos foram: tipo de biocerâmica baseada em fosfato de cálcio, íon utilizado na dopagem, porcentagem de dopagem do biomaterial, tipo de célula estudada, período de avaliação e número de corpos de prova. Para produzir a meta-análise dos desfechos, valores de ensaios de fosfatase alcalina (ALP) foram extraídos dos artigos e foi considerado a média e desvio padrão das amostras em cada período de tempo. A extração de dados dos gráficos de cada estudo foi feita utilizando o software de tratamento de imagens Image J (“ImageJ”Fiji 1.51n, ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) com o plug-in *Figure Calibration* desenvolvido por Frederic Hessman(“FIGURE CALIBRATION, 2009).

3.1.4 Produção da meta-análise

A meta-análise dos dados obtidos foi feita utilizando o software Review Manager Version 5.4.1 (“RevMan | Cochrane Training” Copenhagen, The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2012). Para a exibição dos desfechos obtidos pelos ensaios foram utilizados gráficos de floresta e de funil. Os dados utilizados para a meta-análise foram extraídos de ensaios ALP dos artigos escolhidos e a diferença das médias padronizadas com um intervalo de confiança de 95% foram calculadas para cada ensaio. A heterogeneidade foi avaliada através do valor de I^2 . Os estudos foram separados em subgrupos de modo a avaliar como variáveis metodológicas arbitrarias encontradas nos estudos impactaram nas respostas biológicas, e.g. por dias de avaliação e por porcentagem de dopagem das amostras.

3.2 Produção de hidroxiapatita

Neste experimento foram produzidos três grupos diferentes de amostras: hidroxiapatita (HAp) pura, HAp dopada com adição de 5% em peso de íons de boro e HAp dopada com adição de 5% em peso de íons de estrôncio. Para a produção da hidroxiapatita foram utilizados os reagentes nitrato de cálcio tetra-hidratado $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, hidróxido de amônio $[\text{NH}_4\text{OH}]$ PA e fosfato de amônio dibásico $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$. O processo utilizado foi o de precipitação aquosa seguindo os passos indicados pelo livro “Biomaterials” de Wong (2007). Para a produção de amostras dopadas com boro foi utilizado o reagente ácido bórico PA $[\text{H}_3\text{BO}_3]$ que foi dissolvido juntamente com o fosfato de amônio. Para amostras dopadas com estrôncio foi utilizado o reagente nitrato de estrôncio PA ACS $[\text{Sr}(\text{NO}_3)_2]$ que foi dissolvido juntamente com o nitrato de cálcio. Após ter sido produzida a hidroxiapatita então foi triturada e cristalizada à 1040°C por 1h em um forno elétrico.

A cristalografia das amostras foi investigada após a cristalização por difração de raios-x (DRX) utilizando radiação $\text{K}\alpha$ de Cu entre 10° e 70° com incremento de $1^\circ/\text{min}$. Foram utilizados os valores padrão para hidroxiapatita e whitloquita (nome comum β -TCP), com cartas de referência JCPDS 00-009-0432 e 00-009-0169 respectivamente

A morfologia da superfície das amostras foi observada em um microscópio eletrônico de varredura. Para evitar o acúmulo de cargas, as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esta seção apresentará os resultados obtidos pelas pesquisas em bases de dados, produção da meta-análise e sintetização de HAp

4.1 Meta-análise

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos através da realização da meta-análise.

4.1.1 Resultados da pesquisa com estrôncio

As pesquisas em bases de dados por artigos com íons de estrôncio encontraram 116 artigos na PubMed, 135 artigos na EmBase, 139 artigos na Scopus e 281 artigos na Web of Science, totalizando 671 artigos. A partir desses resultados, 654 foram descartados na fase de avaliação de títulos e resumos, restando 17 artigos que foram lidos em sua totalidade. Para produzir a meta-análise foram selecionados 5 artigos que realizaram ensaios ALP adequados para efetuar uma comparação. O Quadro 2 apresenta informações dos artigos que foram utilizados para produzir a meta-análise.

Quadro 2 – Artigos com estrôncio selecionados para a coleta de dados

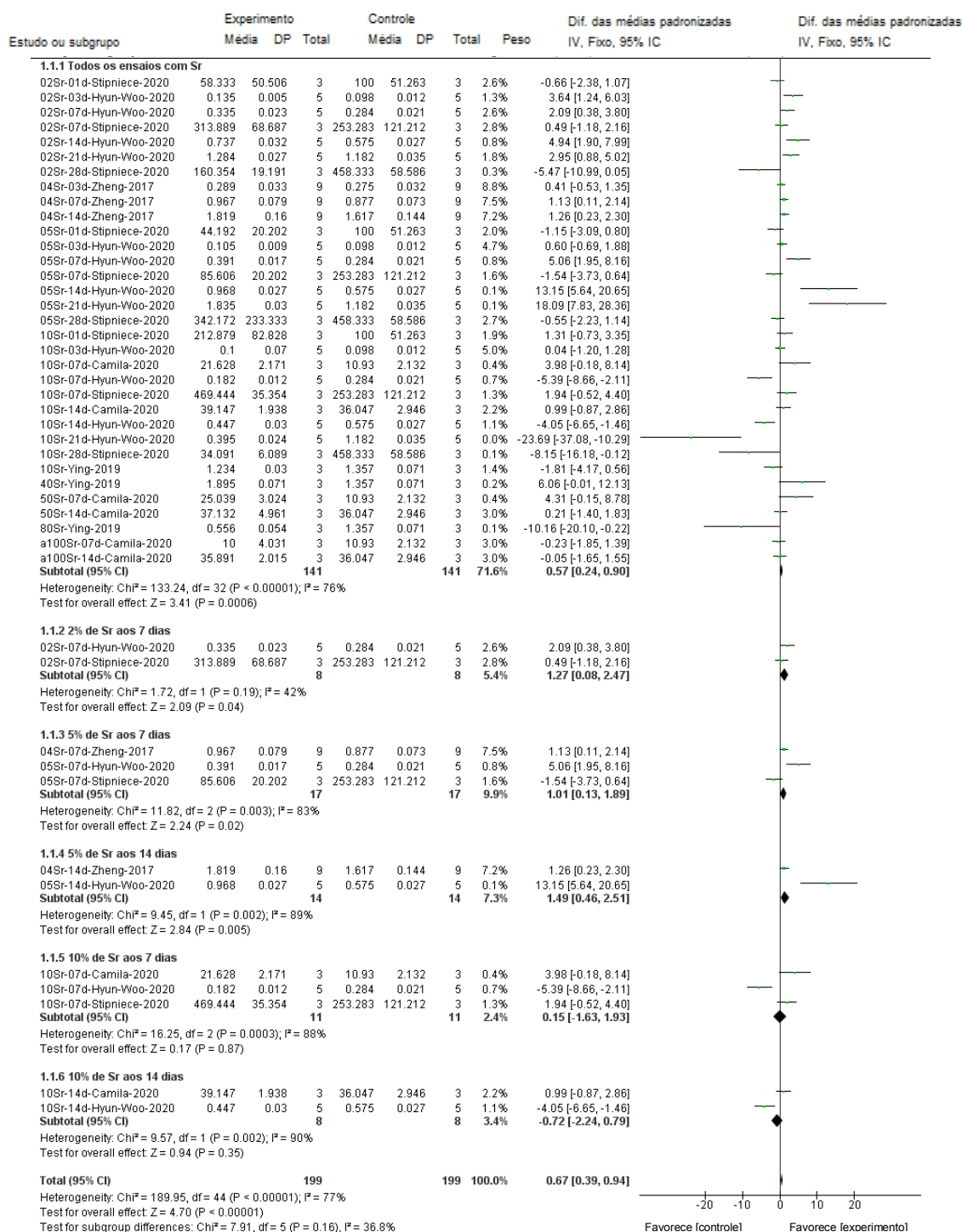
| Artigo | Autores | Ions | Material | Células Utilizadas |
|--|---|-------------|----------------------------|--|
| <i>Strontium substituted hydroxyapatite promotes direct primary human osteoblast maturation</i> | (STIPNIECE, WILSON, <i>et al.</i> , 2021) | Sr | Hidroxiapatita | Células osteoblásticas humanas primárias |
| <i>Fabrication of strontium-substituted hydroxyapatite scaffolds using 3D printing for enhanced bone regeneration</i> | (KIM, KIM, 2021) | Sr | Hidroxiapatita | MC3T3-E1 |
| <i>Strontium hydroxyapatite/chitosan nanohybrid scaffolds with enhanced osteoinductivity for bone tissue engineering</i> | (LEI, XU, <i>et al.</i> , 2017) | Sr | Hidroxiapatita | células-tronco mesenquimais da medula óssea humana |
| <i>Strontium Calcium Phosphate Nanotubes as Bioinspired Building Blocks for Bone Regeneration</i> | (TOVANI, OLIVEIRA, <i>et al.</i> , 2020) | Sr | Hidroxiapatita | MC3T3-E1 |
| <i>Strontium-substituted biphasic calcium phosphate microspheres promoted degradation performance and enhanced bone regeneration</i> | (RESSLER, CVETNIĆ, <i>et al.</i> , 2020) | Sr | Fosfato de cálcio bifásico | células-tronco mesenquimais da medula óssea humana |

Fonte: Autoria própria (2022)

4.1.2 Meta-análise com artigos que utilizaram estrôncio

A meta-análise avaliou os resultados obtidos por ensaios ALP como indicador de alteração da capacidade biológica das amostras promovida pela intervenção. A Figura 1 apresenta o resultado geral da meta-análise.

Figura 1 - Meta-análise do resultado do ensaio ALP em todas as amostras dopadas com estrôncio selecionadas



Fonte: Autoria própria (2022)

Conforme apresentado na Figura 1, considerando as amostras como um todo sem divisão em subgrupos, a análise conteve 33 grupos de experimentos com 141 amostras no total e o efeito geral da dopagem das amostras no resultado do

ensaio ALP (diferença média entre amostras dopadas e não dopadas) foi de 0,57 e 95% do intervalo de confiança entre 0,24 e 0,90 e com uma heterogeneidade de 76%. O valor de 0,57 significa que amostras dopadas produzem melhor resposta no ensaio ALP, indicando uma maior atividade osteogênica.

Considerando a análise com subgrupos, foi possível dividir a meta-análise em cinco subgrupos entre amostras dopadas com 2% de estrôncio e avaliadas aos 7 dias, 5% de estrôncio e avaliadas aos 7 dias e aos 14 dias e em amostras dopadas com 10% de estrôncio e avaliadas aos 7 dias e aos 14 dias.

4.1.3 Amostras com 2% de estrôncio 7 dias de experimento

Nas amostras dopadas com 2% de estrôncio e avaliadas aos 7 dias o efeito da dopagem na diferença das médias padronizadas foi de 1,27 a favor das amostras dopadas com 95% do intervalo de confiança entre 0,08 e 2,47. Esse resultado indica que aos 7 dias de realização de ensaio é possível ver uma expressão de ALP que indica um aumento de atividade osteogênica da amostra.

4.1.4 Amostras com 5% de estrôncio e 7 dias de experimento

Em amostras dopadas com 5% de estrôncio e avaliadas aos 7 dias o efeito da dopagem na diferença das médias padronizadas foi de 1,01 a favor das amostras dopadas com 95% do intervalo de confiança entre 0,13 e 1,89. Novamente indicando uma melhoria de atividade osteogênica da amostra.

4.1.5 Amostras com 5% de estrôncio e 14 dias de experimento

Nas amostras dopadas com 5% de estrôncio e avaliadas aos 14 dias o efeito da dopagem na diferença das médias padronizadas foi de 1,49 a favor das amostras dopadas com 95% do intervalo de confiança entre 0,46 e 2,51. Aos 14 dias a melhora no desempenho é superior ao que foi encontrado em amostras com tempo de experimento de 7 dias indicando que o efeito da dopagem é prolongado.

4.1.6 Amostras com 10% de estrôncio e 7 dias de experimento

Nas amostras dopadas com 10% de estrôncio e avaliadas aos 7 dias o efeito da dopagem na diferença das médias padronizadas foi de 0,15, favorecendo as

amostras dopadas com 95% do intervalo de confiança entre -1,63 e 1,93. A diminuição da diferença das medias padronizadas pode ser explicada pela indução de condições citotóxicas causadas pelo aumento da quantidade de íons de estrôncio liberados pela amostra, o que interfere com a capacidade de diferenciação das células (KIM, KIM, 2021).

4.1.7 Amostras com 10% de estrôncio e 14 dias de experimento

Nas amostras dopadas com 10% de estrôncio e avaliadas aos 14 dias o efeito da dopagem na diferença média foi de -0,72, favorecendo as amostras de controle com 95% do intervalo de confiança entre -2,24 e 0,79. Novamente mostrando o efeito negativo da liberação excessiva de íons de Sr.

4.1.8 Resultados da pesquisa com magnésio

As pesquisas por artigos com magnésio encontraram 100 artigos na PubMed, 361 artigos na EmBase, 498 artigos na Scopus e 345 artigos na Web of Science, totalizando 1304 artigos. Do total obtido, 1.263 artigos foram descartados na fase de avaliação de títulos e resumos, restando 32 artigos foram lidos integralmente. Para a produção da meta-análise foram encontrados seis artigos que possuíam ensaios ALP adequados para fazer a comparação. O Quadro 3 apresenta informações dos artigos selecionados para a meta-análise.

Quadro 3 – Artigos com magnésio selecionados para a coleta de dados

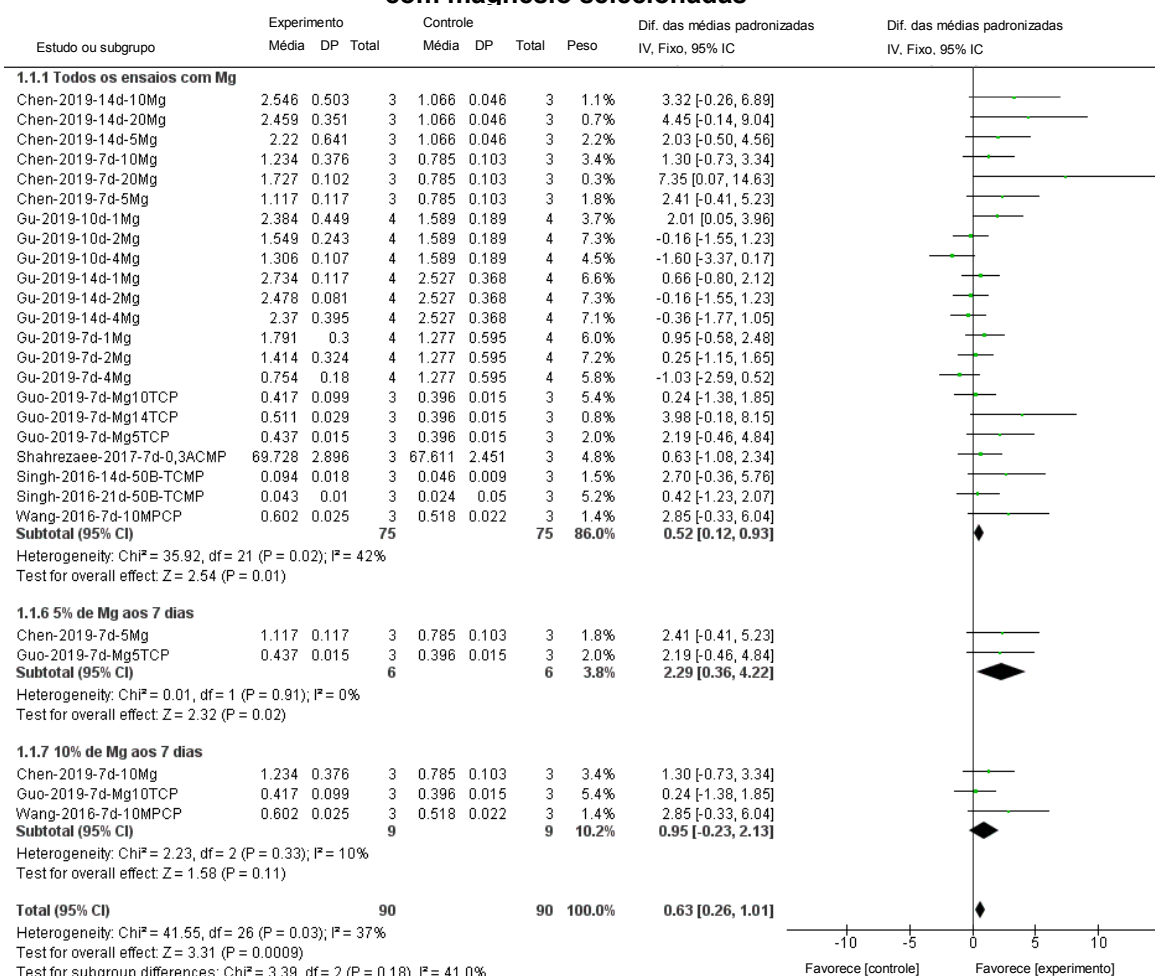
| Artigo | Autores | Ions | Material | Células Utilizadas |
|--|---------------------------------|-------------|--------------------------|---|
| <i>Biomimetic synthesis of Mg-substituted hydroxyapatite nanocomposites and three-dimensional printing of composite scaffolds for bone regeneration</i> | (CHEN, SHI, et al., 2019) | Mg | Hidroxiapatita | MC3T3-E1 |
| <i>Three-dimensional Printed Mg-Doped β-TCP Bone Tissue Engineering Scaffolds: Effects of Magnesium Ion Concentration on Osteogenesis and Angiogenesis In Vitro</i> | (GU, ZHANG, et al., 2019) | Mg | β -TCP | células-tronco mesenquimais da medula óssea humana |
| <i>Osteogenic effects of magnesium substitution in nano-structured β-tricalcium phosphate produced by microwave synthesis</i> | (GUO, LONG, et al., 2019) | Mg | β -TCP | Células estromais da medula óssea |
| <i>Synthesis of Magnesium Doped Amorphous Calcium Phosphate as a Bioceramic for Biomedical Application: In Vitro Study</i> | (SHAHREZAEI, RAZ, et al., 2017) | Mg | Fosfato de cálcio amorfo | G292 |
| <i>Study of hMSC proliferation and differentiation on Mg and Mg-Sr containing biphasic β-tricalcium phosphate and amorphous calcium phosphate ceramics</i> | (SINGH, ROY, et al., 2016) | Mg | β -TCP | células-tronco mesenquimais |
| <i>Improved osteogenesis and angiogenesis of magnesium-doped calcium phosphate cement via macrophage immunomodulation</i> | (WANG, Meng, YU, et al., 2016) | Mg | Fosfato de cálcio | células-tronco mesenquimais da medula óssea de rato |

Fonte: Autoria própria (2022)

4.1.9 Meta-análise com artigos que utilizaram magnésio

Para a elaboração desta meta-análise também foi utilizado como parâmetro de comparação o resultado de ensaios de ALP como indicador de alteração de atividade biológica entre amostras dopadas e não-dopadas. A Figura 2 apresenta o resultado geral da meta-análise.

Figura 2 - Meta-análise do resultado do ensaio ALP em todas as amostras dopadas com magnésio selecionadas



Fonte: Autoria própria (2022)

Conforme apresentado na Figura 2, considerando as amostras como um todo sem divisão em subgrupos, a análise conteve 22 grupos de experimentos com 75 amostras no total e o efeito geral da dopagem das amostras no resultado do ensaio ALP foi de 0,52 e com 95% do intervalo de confiança entre 0,12 e 0,96 e com uma heterogeneidade de 42%. O valor de 0,52 novamente indica que amostras dopadas produzem melhor resposta no ensaio ALP, indicando uma maior atividade osteogênica.

Para a meta-análise de subgrupos, somente foi possível dividir a meta-análise em dois subgrupos: amostras dopadas com 5% de magnésio e avaliadas aos 7 dias e amostras com 10% de magnésio e avaliadas aos 7 dias.

4.1.10 Amostras com 5% de magnésio e 7 dias de experimento

Em amostras dopadas com 5% de Mg e avaliadas aos 7 dias o efeito da dopagem na diferença das médias padronizadas foi de 2,29 à favor da amostra dopada com 95% do intervalo de confiança entre 0,36 e 4,22. Esses resultados mostram que, quando as amostras dopadas foram avaliadas aos 7 dias, a expressão de ALP indicou um aumento de atividade osteogênica, favorecendo a proliferação e diferenciação das células estudadas.

4.1.11 Amostras com 10% de magnésio e 7 dias de experimento

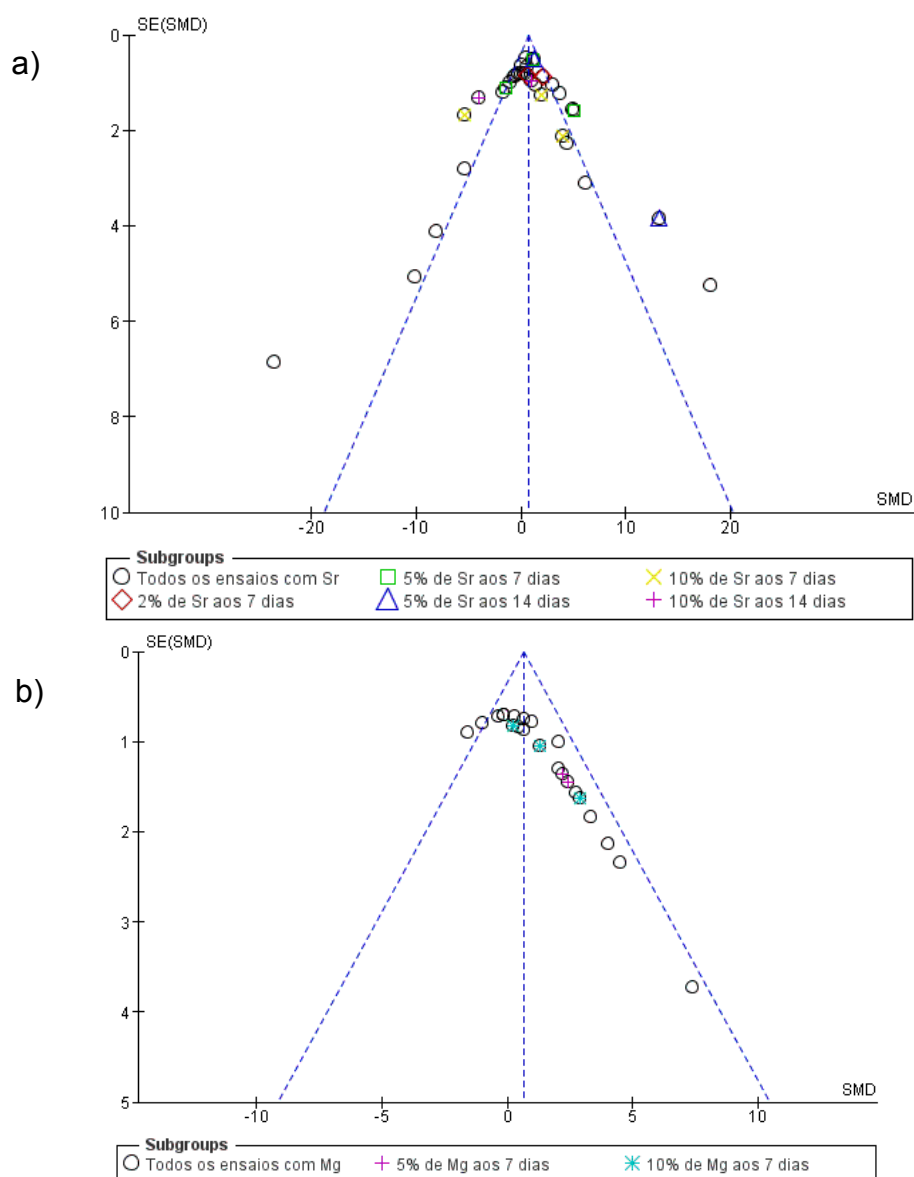
Já nas amostras dopadas com 10% de Mg e avaliada aos 7 dias o efeito da dopagem na diferença das médias padronizadas foi de 0,95 à favor da amostra dopada com 95% do intervalo de confiança entre -0,23 e 2,13. Novamente o resultado indica um efeito positivo induzido pela dopagem, porém a diminuição do efeito em comparação com amostras dopadas com 5% de magnésio pode ser explicada pelo efeito negativo que concentrações de magnésio liberados pelas amostras que excedem 50 ppm se tornam prejudiciais para a sobrevivência das células (GU, ZHANG, *et al.*, 2019).

4.1.12 Heterogeneidade estatística e viés de produção

A variância dos valores de atividade ALP encontrados nos estudos incluídos faz com que a heterogeneidade seja alta. Valores com diversas ordens de grandezas para o mesmo experimento, e.g. o estudo de Stipniece e colaboradores e o estudo de Kim Hyun-Woo, nos quais se avaliou o mesmo dopante, com o mesmo percentual de dopagem e período de avaliação, o primeiro estudo relata valores na grandeza de 10^{-1} e o segundo apresenta valores na grandeza de 10^2 .

O gráfico de funil de cada meta-análise produzida, considerando todos os estudos incluídos, está representado na Figura 3.

Figura 3 - Gráfico de funil da meta-análise contendo a) todos os estudos que utilizaram estrôncio; b) todos os estudos que utilizaram magnésio



Fonte: Autoria própria (2022)

Em relação aos vieses de publicação, os gráficos de funil mostra que mais estudos são necessários para que ocorra o preenchimento dos “espaços vazios” nesses gráficos, e dessa forma, conferindo mais peso estatístico para a resposta da pergunta dessa revisão sistemática. Com relação ao íon dopante boro, embora o mesmo apresente resultados positivos de resposta biológica, mais estudos são necessários para que a comparação entre eles seja viabilizada.

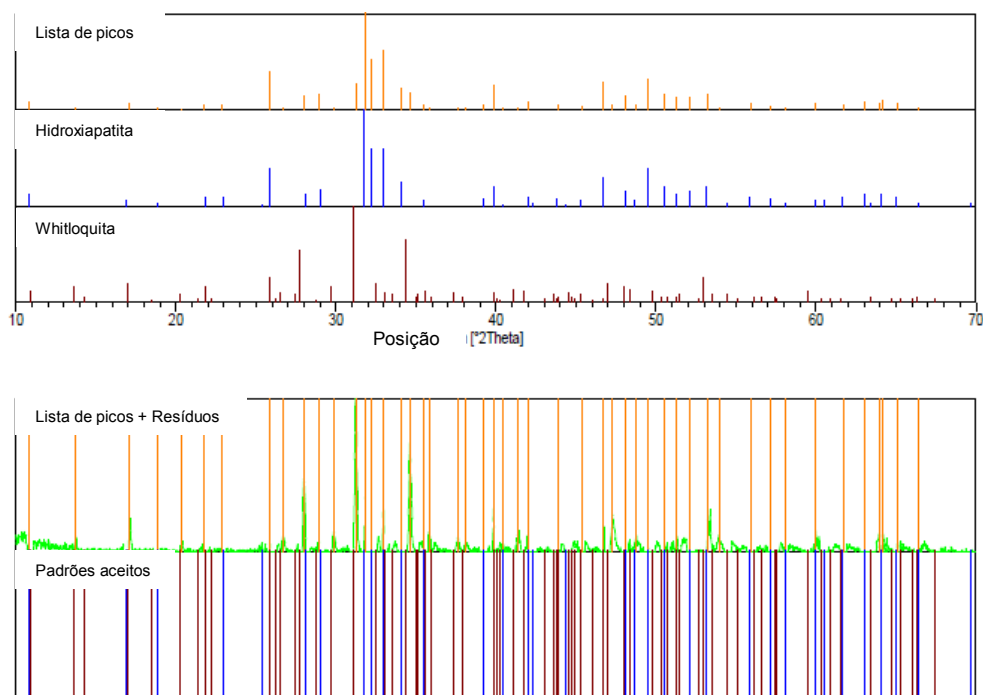
4.2 Produção da hidroxiapatita

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos com os ensaios efetuados nas amostras de hidroxiapatita que foram sintetizadas.

4.2.1 Análise de cristalografia por difração de raios-x

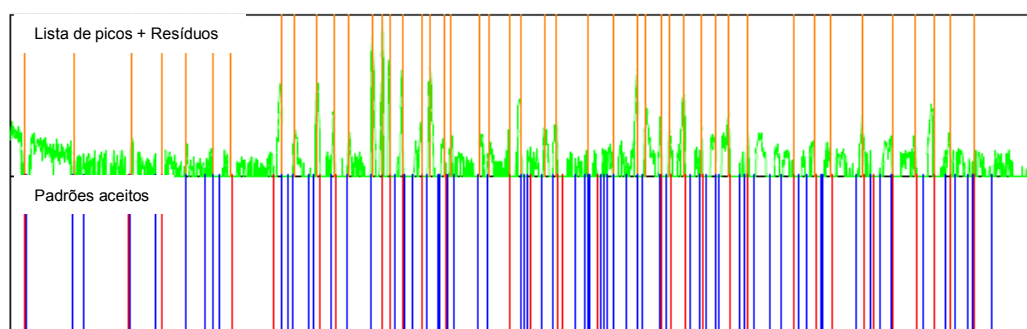
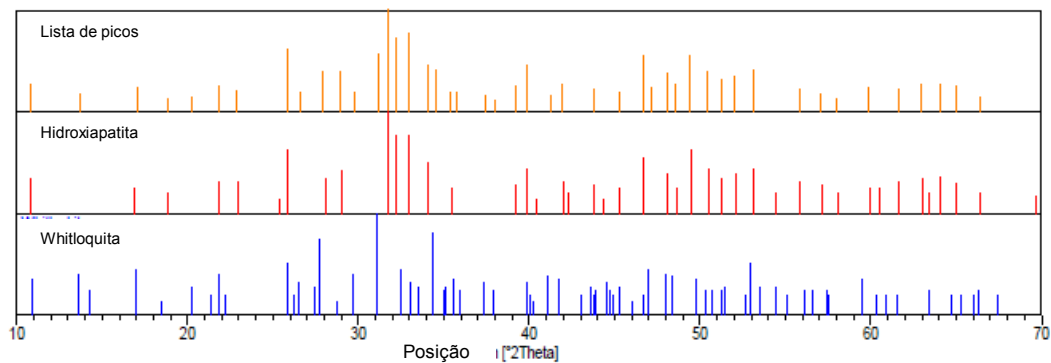
Para verificar a estrutura cristalina das amostras após serem submetidas a um tratamento térmico de cristalização, foi efetuado um ensaio de difração de raios-x e após ter sido realizado, o resultado dos ensaios de DRX das amostras foi comparado com valores padrão para hidroxiapatita e whitloquita (nome comum β -TCP), com códigos de referência JCPDS 00-009-0432 e 00-009-0169 respectivamente. As Figura 4, Figura 5 e Figura 6 apresentam os resultados do ensaio.

Figura 4 – Resultado de ensaio de DRX da amostra de hidroxiapatita sem dopagem



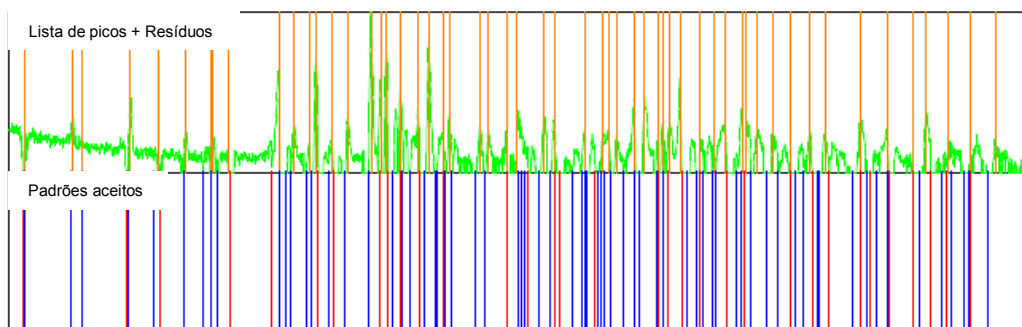
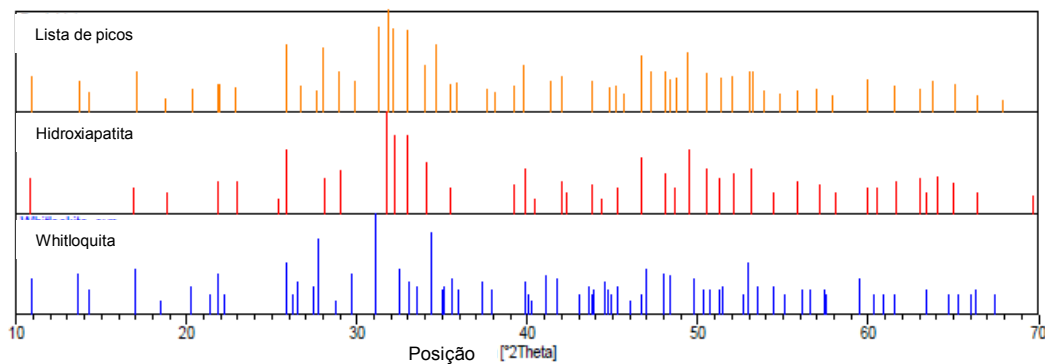
Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 5 - Resultado de ensaio de DRX da amostra de hidroxiapatita dopada com estrôncio



Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 6 - Resultado de ensaio de DRX da amostra de hidroxiapatita dopada com boro



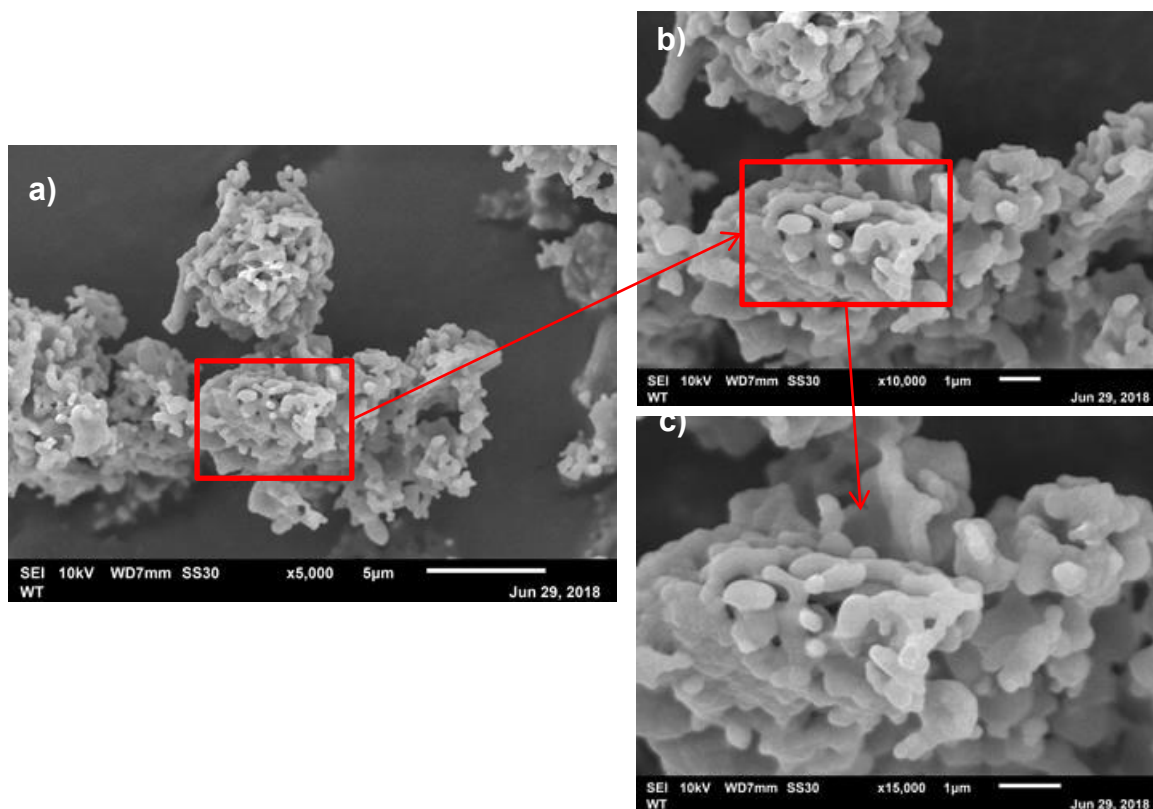
Fonte: Autoria própria (2022)

Foi observado que os picos de todas as amostras coincidiam principalmente com os picos de hidroxiapatita, também sendo encontrados alguns que coincidiam com picos característicos de β -TCP, com essa ocorrência sendo mais comum em amostras dopadas. A ocorrência de picos de β -TCP pode ser provocada pelo tratamento térmico de cristalização efetuado à 1040°C, temperatura na qual começam a se formar cristais de β -TCP à partir da hidroxiapatita (WANG, Pauchiu E., CHAKI, 1993) e o número maior de picos relacionados à β -TCP em amostras dopadas pode ser explicada pela presença dos íons de estrôncio e boro que foram adicionados, pois estudos anteriores que analisaram a adição em hidroxiapatita com ambos os íons observaram o surgimento de fase de β -TCP em suas amostras (HE, DONG, *et al.*, 2016), (ALBAYRAK, 2016). Também foi observado um leve deslocamento de alguns picos em ambas as amostras dopadas. Esse fenômeno foi encontrado em outros estudos envolvendo dopagem (YEDEKÇI, TEZCANER, *et al.*, 2021), (PAZARÇEVIREN, TEZCANER, *et al.*, 2021) e pode estar relacionado a diferenças de raios iônicos de íons de Sr^{2+} (1.18 Å) que substituem íons de Ca^{2+} (1.00 Å) e em amostras dopadas com boro onde o íon BO_3^{3-} (1.91 Å) substitui o PO_4^{3-} (2.38 Å) gerando os deslocamentos observados.

4.2.2 Análise de morfologia por microscopia eletrônica de varredura

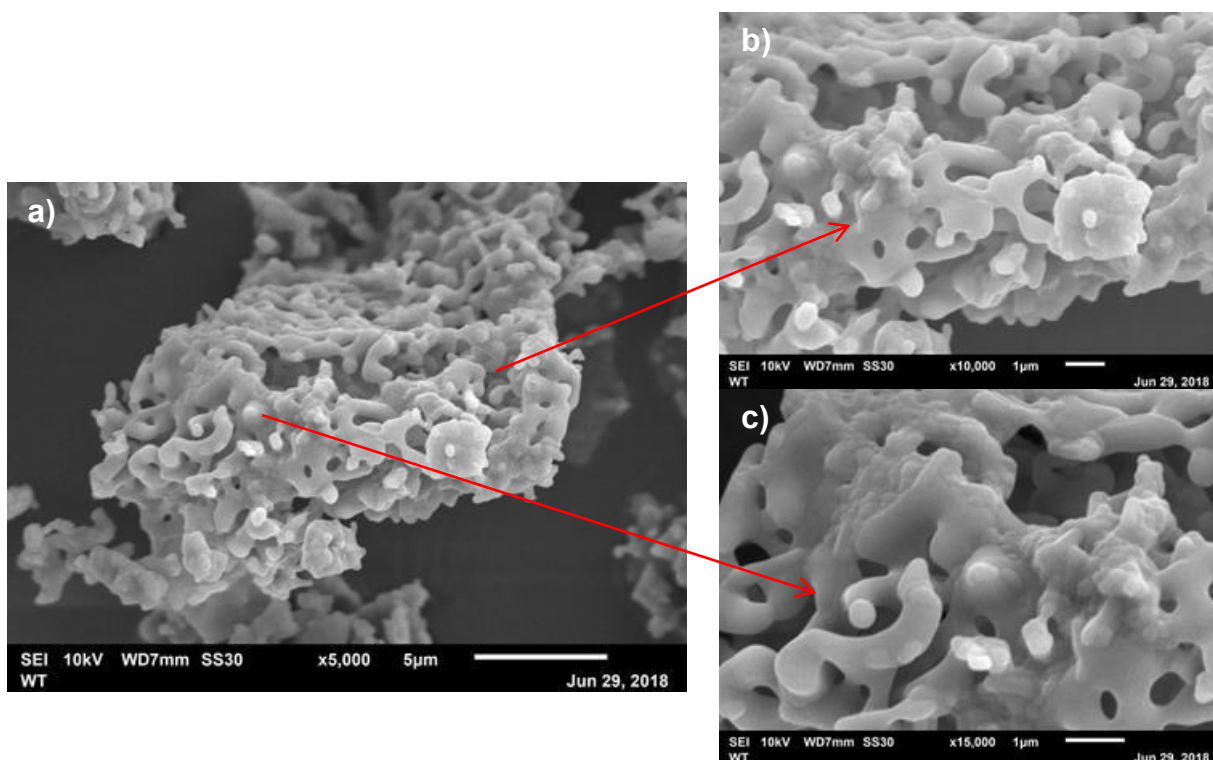
As amostras de hidroxiapatita produzidas foram examinadas em um MEV para analisar sua morfologia. As Figuras 5, 6 e 7 apresentam os resultados obtidos.

Figura 7 – Imagem de MEV da amostra de HAp sem dopagem com a) ampliação de 5000x; b) ampliação de 10000x; c) ampliação de 15000x



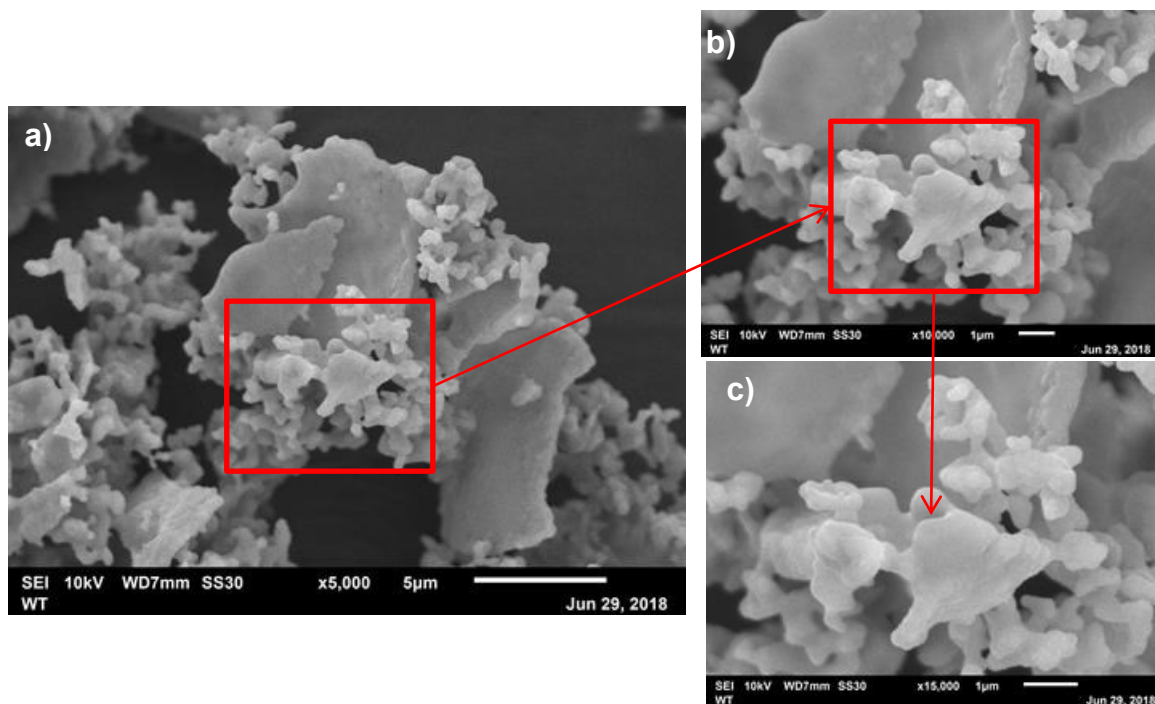
Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 8 – Imagem de MEV da amostra de HAp dopada com boro com a) ampliação de 5000x; b) ampliação de 10000x; c) ampliação de 15000x



Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 9 – Imagem de MEV da amostra de HAp dopada com estrôncio com a) ampliação de 5000x; b) ampliação de 10000x; c) ampliação de 15000x



Fonte: Autoria própria(2022)

Pode ser observado nas figuras com ampliação de 5000x uma característica equiaxial das partículas de HAp tanto nas amostra pura como nas dopadas. Sob ampliação de 10000x a superfície irregular dos grãos de HAp pode ser visualizada. Na ampliação de 15000x pode se observar a presença de poros com dimensões sub micrométricas nas amostras. Essas características foram encontradas em outros estudos envolvendo a síntese de HAp utilizando técnicas de precipitação aquosa e podem ser explicadas por condições causadas pelo processo de cristalização, que ocorreu à temperaturas de 1040°C neste experimento, ao qual as amostras foram submetidas, onde o crescimento e coalescimento de cristais é estimulado (GOMEZ-VAZQUEZ, CORREA-PIÑA, *et al.*, 2021), (CORREA-PIÑA, GOMEZ-VAZQUEZ, *et al.*, 2021), (YELTEN, YILMAZ, 2016).

4.3 Expectativas para resultados futuros e interação com entidade externa

Através do número de artigos encontrados com as pesquisas em bases de dados e informações que foram obtidos deles, foi concluído que é possível produzir uma revisão sistemática sobre o tema abordado. A produção de hidroxiapatita resultou em amostras adequadas e que estão aptas a serem avaliadas em relação ao seu desempenho biológico através de ensaios que podem ser realizados pela entidade ICC-Fiocruz e que poderá trazer contribuições científicas e publicações para UTFPR e ICC.

A interação com o ICC-Fiocruz ocorreu na forma de auxílio na compreensão de assuntos relacionados à parte biológica do projeto e na utilização do MEV para obter imagens da morfologia da hidroxiapatita produzida.

5 CONCLUSÕES

As estratégias de busca utilizadas levaram a um grande número de artigos que permitiram uma observação dos diversos métodos para análise *in vitro* do desempenho de amostras de fosfatos de cálcio dopadas com íons inorgânicos em induzir atividade osteogênica. Contudo, a variabilidade encontrada nos experimentos realizados levou à uma grande heterogeneidade estatística encontrada na meta-análise. Através da meta-análise dos ensaios ALP foi possível observar uma melhora no desempenho das biocerâmicas dopadas com 5% de estrôncio nos períodos avaliados de 7 e 14 dias, porém em amostras com 10% de estrôncio se observa um efeito negativo, no qual a dopagem diminui a capacidade osteogênica das células. Para amostras dopadas com magnésio também foi possível observar uma melhoria de desempenho provocada pela intervenção. A consulta por artigos que abordaram a dopagem com boro em biocerâmicas baseadas em fosfatos de cálcio não produziu resultados suficientes para produzir uma meta-análise.

A produção de hidroxiapatita resultou em amostras adequadas, que demonstraram possuir morfologia semelhante à hidroxiapatita produzida por outros autores. A análise das amostras por difração de raios-x indicou que elas possuem picos característicos de hidroxiapatita e também foram encontrados deslocamentos que permitem inferir que houve a incorporação dos íons dopantes nas amostras, embora não seja possível determinar com os ensaios efetuados o grau de dopagem obtido.

REFERÊNCIAS

What is a systematic review? [S.d.]. Disponível em: https://handbook-5-1.cochrane.org/chapter_1/1_2_2_what_is_a_systematic_review.htm. Acesso em: 16 nov. 2021.

ALBAYRAK, O. "Structural and mechanical characterization of boron doped biphasic calcium phosphate produced by wet chemical method and subsequent thermal treatment", **Materials Characterization**, v. 113, p. 82–89, 1 mar. 2016. DOI: 10.1016/j.matchar.2016.01.006. .

BOSCH-RUÉ, E., DIEZ-TERCERO, L., GIORDANO-KELHOFFER, B., *et al.* **Biological Roles and Delivery Strategies for Ions to Promote Osteogenic Induction. Frontiers in Cell and Developmental Biology.** [S.I.], Frontiers Media S.A. , 14 jan. 2021

CANCEDDA, R., GIANNONI, P., MASTROGIACOMO, M. **A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice.** **Biomaterials.** [S.I.], Biomaterials. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17644173/>. Acesso em: 16 nov. 2021. , out. 2007

CHEN, S., SHI, Y., ZHANG, X., *et al.* "Biomimetic synthesis of Mg-substituted hydroxyapatite nanocomposites and three-dimensional printing of composite scaffolds for bone regeneration", **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 107, n. 11, p. 2512–2521, 1 nov. 2019. DOI: 10.1002/JBM.A.36757. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31319006/>. Acesso em: 5 jun. 2022.

CORREA-PIÑA, B. A., GOMEZ-VAZQUEZ, O. M., LONDOÑO-RESTREPO, S. M., *et al.* "Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite added with magnesium obtained by wet chemical precipitation", **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 31, n. 4, p. 575–582, 1 ago. 2021. DOI: 10.1016/J.PNSC.2021.06.006. .

DOROZHKIN, S. V. **Calcium orthophosphate cements and concretes.** **Materials.** [S.I.], MDPI AG. Disponível em: </pmc/articles/PMC5445692/>. Acesso em: 15 nov. 2021. , 2009

Figure_Calibration. [S.d.]. Disponível em: http://www.astro.physik.uni-goettingen.de/~hessman/ImageJ/Figure_Calibration/. Acesso em: 9 set. 2021.

GOMEZ-VAZQUEZ, O. M., CORREA-PIÑA, B. A., ZUBIETA-OTERO, L. F., *et al.* "Synthesis and characterization of bioinspired nano-hydroxyapatite by wet chemical precipitation", **Ceramics International**, v. 47, n. 23, p. 32775–32785, 1 dez. 2021. DOI: 10.1016/J.CERAMINT.2021.08.174. .

GU, Y., ZHANG, J., ZHANG, X., *et al.* "Three-dimensional Printed Mg-Doped β -TCP Bone Tissue Engineering Scaffolds: Effects of Magnesium Ion Concentration on Osteogenesis and Angiogenesis In Vitro", **Tissue engineering and regenerative medicine**, v. 16, n. 4, p. 415–429, 14 ago. 2019. DOI: 10.1007/S13770-019-00192-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31413945/>. Acesso em: 5 jun. 2022.

GUO, X., LONG, Y., LI, W., *et al.* "Osteogenic effects of magnesium substitution in nano-structured β -tricalcium phosphate produced by microwave synthesis", **Journal of Materials Science 2019 54:16**, v. 54, n. 16, p. 11197–11212, 7 maio 2019. DOI: 10.1007/S10853-019-03674-7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10853-019-03674-7>. Acesso em: 5 jun.

2022.

HE, L., DONG, G., DENG, C. "Effects of strontium substitution on the phase transformation and crystal structure of calcium phosphate derived by chemical precipitation", **Ceramics International**, v. 42, n. 10, p. 11918–11923, 1 ago. 2016. DOI: 10.1016/j.ceramint.2016.04.116. .

ImageJ. [S.d.]. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>. Acesso em: 9 set. 2021.

JIN, W., CHU, P. K., "Orthopedic implants". **Encyclopedia of Biomedical Engineering**, [S.l.], Elsevier, 2019. v. 1–3. p. 425–439. DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.10999-7.

KIM, H. W., KIM, Y. J. "Fabrication of strontium-substituted hydroxyapatite scaffolds using 3D printing for enhanced bone regeneration", **Journal of Materials Science**, v. 56, n. 2, p. 1673–1684, 1 jan. 2021. DOI: 10.1007/s10853-020-05391-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10853-020-05391-y>. Acesso em: 7 set. 2021.

LEI, Y., XU, Z., KE, Q., *et al.* "Strontium hydroxyapatite/chitosan nanohybrid scaffolds with enhanced osteoinductivity for bone tissue engineering", **Materials Science and Engineering C**, v. 72, p. 134–142, 1 mar. 2017. DOI: 10.1016/j.msec.2016.11.063. .

LI, X., WANG, X., JIANG, X., *et al.* "Boron nitride nanotube-enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells", **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 104, n. 2, p. 323–329, 1 fev. 2016. DOI: 10.1002/JBM.B.33391. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbm.b.33391>. Acesso em: 5 jun. 2022.

LODOSO-TORRECILLA, I., KLEIN GUNNEWIEK, R., GROSFELD, E. C., *et al.* "Bioinorganic supplementation of calcium phosphate-based bone substitutes to improve: In vivo performance: A systematic review and meta-analysis of animal studies", **Biomaterials Science**, v. 8, n. 17, p. 4792–4809, 7 set. 2020. DOI: 10.1039/d0bm00599a. Disponível em: <https://www>. Acesso em: 7 set. 2021.

NARUPHONTJIRAKUL, P., TSIGKOU, O., LI, S., *et al.* "Human mesenchymal stem cells differentiate into an osteogenic lineage in presence of strontium containing bioactive glass nanoparticles", **Acta Biomaterialia**, v. 90, p. 373–392, 1 maio 2019. DOI: 10.1016/J.ACTBIO.2019.03.038. .

OLIVEIRA, T. M., BERTI, F. C. B., GASOTO, S. C., *et al.* "Calcium Phosphate-Based Bioceramics in the Treatment of Osteosarcoma: Drug Delivery Composites and Magnetic Hyperthermia Agents", **Frontiers in Medical Technology**, v. 3, p. 26, 30 jun. 2021. DOI: 10.3389/fmedt.2021.700266. .

PAZARÇEVIREN, A. E., TEZCANER, A., KESKIN, D., *et al.* "Boron-doped Biphasic Hydroxyapatite/ β -Tricalcium Phosphate for Bone Tissue Engineering", **Biological Trace Element Research**, v. 199, n. 3, p. 968–980, 1 mar. 2021. DOI: 10.1007/s12011-020-02230-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32524334/>. Acesso em: 13 mar. 2022.

PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., *et al.* "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells", **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 2 abr. 1999. DOI: 10.1126/science.284.5411.143. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.284.5411.143>. Acesso em: 5 jun. 2022.

POLLOCK, A., BERGE, E. **How to do a systematic review**. **International Journal of Stroke**. [S.l.], SAGE Publications Inc. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1747493017743796>. Acesso em: 17 nov. 2021. , 1 fev. 2018

RESSLER, A., CVETNIĆ, M., ANTUNOVIĆ, M., *et al.* "Strontium substituted biomimetic calcium phosphate system derived from cuttlefish bone", **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 108, n. 4, p. 1697–1709, 1 maio 2020. DOI: 10.1002/jbm.b.34515. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.b.34515>. Acesso em: 7 set. 2021.

RevMan | Cochrane Training. [S.d.]. Disponível em: <https://training.cochrane.org/online-learning/core-software-cochrane-reviews/revman>. Acesso em: 9 set. 2021.

ROUDSARI, J. M., MAHJOUR, S. "Quantification and comparison of bone-specific alkaline phosphatase with two methods in normal and paget's specimens", **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 3, n. 3, p. 478, jun. 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC3755844/>. Acesso em: 5 jun. 2022.

SHAHREZAEI, M., RAZ, M., SHISHEHBOR, S., *et al.* "Synthesis of Magnesium Doped Amorphous Calcium Phosphate as a Bioceramic for Biomedical Application: In Vitro Study", **Silicon** **2017** **10:3**, v. 10, n. 3, p. 1171–1179, 6 set. 2017. DOI: 10.1007/S12633-017-9589-Y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12633-017-9589-y>. Acesso em: 5 jun. 2022.

SINGH, S. S., ROY, A., LEE, B., *et al.* "Study of hMSC proliferation and differentiation on Mg and Mg-Sr containing biphasic β -tricalcium phosphate and amorphous calcium phosphate ceramics", **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 64, p. 219–228, 1 jul. 2016. DOI: 10.1016/J.MSEC.2016.03.020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27127047/>. Acesso em: 5 jun. 2022.

STIPNIECE, L., WILSON, S., CURRAN, J. M., *et al.* "Strontium substituted hydroxyapatite promotes direct primary human osteoblast maturation", **Ceramics International**, v. 47, n. 3, p. 3368–3379, 1 fev. 2021. DOI: 10.1016/j.ceramint.2020.09.182. Disponível em: <https://pure.ulster.ac.uk/en/publications/strontium-substituted-hydroxyapatite-promotes-direct-primary-huma>. Acesso em: 7 set. 2021.

THOMA, A., EAVES, F. F. "What is Wrong with Systematic Reviews and Meta-Analyses: If You Want the Right Answer, Ask the Right Question!", **Aesthetic Surgery Journal**, v. 36, n. 10, p. 1198–1201, 1 nov. 2016. DOI: 10.1093/asj/sjw172. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27756743/>. Acesso em: 16 nov. 2021.

THOMAS, S., JAGANATHAN, B. G. "Signaling network regulating osteogenesis in mesenchymal stem cells", **Journal of cell communication and signaling**, v. 16, n. 1, p. 47–61, 1 mar. 2022. DOI: 10.1007/S12079-021-00635-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34236594/>. Acesso em: 5 jun. 2022.

TOVANI, C. B., OLIVEIRA, T. M., SOARES, M. P. R., *et al.* "Strontium Calcium Phosphate Nanotubes as Bioinspired Building Blocks for Bone Regeneration", **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 12, n. 39, p. 43422–43434, 30 set. 2020. DOI: 10.1021/acsami.0c12434. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32876428/>. Acesso em: 6 set. 2021.

VAN DER STOK, J., VAN LIESHOUT, E. M. M., EL-MASSOUDI, Y., *et al.* **Bone substitutes in the Netherlands - A systematic literature review.** *Acta Biomaterialia*. [S.l.], Elsevier Ltd. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20688196/>. Acesso em: 16 nov. 2021. , 2011

WANG, M., YU, Y., DAI, K., *et al.* "Improved osteogenesis and angiogenesis of magnesium-doped calcium phosphate cement via macrophage immunomodulation", *Biomaterials Science*, v. 4, n. 11, p. 1574–1583, 18 out. 2016. DOI: 10.1039/C6BM00290K. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/bm/c6bm00290k>. Acesso em: 5 jun. 2022.

WANG, P. E., CHAKI, T. K. "Sintering behaviour and mechanical properties of hydroxyapatite and dicalcium phosphate", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 4, n. 2, p. 150–158, mar. 1993. DOI: 10.1007/BF00120384. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00120384>. Acesso em: 6 jun. 2022.

YEDEKÇI, B., TEZCANER, A., ALSHEMARY, A. Z., *et al.* "Synthesis and sintering of B, Sr, Mg multi-doped hydroxyapatites: Structural, mechanical and biological characterization", *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 115, 1 mar. 2021. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2020.104230. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33307486/>. Acesso em: 6 set. 2021.

YELTEN, A., YILMAZ, S. "Various Parameters Affecting the Synthesis of the Hydroxyapatite Powders by the Wet Chemical Precipitation Technique", *Materials Today: Proceedings*, v. 3, n. 9, p. 2869–2876, 1 jan. 2016. DOI: 10.1016/J.MATPR.2016.07.006. .