

BRUNA DITZEL DA COSTA REGALIN

**NEOFORMAÇÃO ÓSSEA E OSTEOINTEGRAÇÃO DE
BIOMATERIAIS MICRO E NANOESTRUTURADOS EM
OVINOS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciência animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes

**LAGES,SC
2014**

BRUNA DITZEL DA COSTA REGALIN

**NEOFORMAÇÃO ÓSSEA E OSTEOINTEGRAÇÃO DE
BIOMATERIAIS MICRO E NANOESTRUTURADOS EM
OVINOS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciência animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador:

Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes
Departamento de Medicina Veterinária – CAV/UDESC

Membro:

Prof. Dr. Alceu Gaspar Raiser
Departamento de Clínica de Pequenos Animais –
CCR/UFSM

Membro:

Prof. Dr. Aldo Gava
Departamento de Medicina Veterinária – CAV/UDESC

Suplente:

Prof. Nelson Heriberto Almeida Camargo
Departamento de Engenharia Mecânica - CCT/UDESC

Lages, SC, 21/02/2014

“Aos meus pais, George e Carmen, minha irmã Giorgia e meu cunhado Chico, e aos meus sobrinhos João Fhelipe e Maria Fernanda. Sem vocês eu jamais teria chegado até aqui! Ao meu amor, Doughlas, por me dizer que tudo daria certo desde o início! Obrigada por tudo!”

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus, por me guiar sempre em busca da realização dos meus sonhos e me dar forças para continuar nos momentos em que eu não acreditava mais em mim.

Aos meus pais, George e Carmen, pelo amor incondicional, por sempre acreditarem em mim e estarem ao meu lado em todos os momentos, entendendo, ainda que com saudades, a minha ausência, durante este período em que não podia visitá-los com tanta frequência. Amo muito vocês!

À minha irmã e ao meu “cunhado-irmão” Gi e Chico, por tudo! Por serem meus melhores amigos e por aceitarem a bela missão de me aguentar nos momentos de desespero! É sempre muito bom conversar com vocês!! Obrigada por sempre confiarem em mim!

Ao meu marido, amigo e colega, Douglas, por me ajudar tanto, pelas broncas, pelos conselhos, por acreditar mais em mim do que eu mesma! Poucos têm a sorte de ter um colega de profissão dentro de casa, que possa ajudar nos conselhos técnicos e entender os estresses da profissão, o longo caminho percorrido para atingir o aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, ajudar a rir dos percalços da vida! Tenho muita sorte por ter te encontrado! Te amo muito e agradeço por tudo o que você faz por mim!

Aos meus sobrinhos João Fhelipe e Maria Fernanda, por serem minhas estrelinhas mágicas, capazes de iluminar meus dias com um simples olhar! Quase morro de saudades, mas vocês não deixam de estar em meus pensamentos nem um dia sequer! Amo vocês minhas delícias!!

Aos meus sogros Adelar e Semilda pelo grande exemplo de seguir sempre em busca dos seus sonhos, não que seja fácil, mas será sempre gratificante. Aos meus cunhados Diego e Amanda pela amizade e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes, pela oportunidade de realizar meu mestrado, por se aventurar comigo em uma área nova e pela curiosidade e paixão demonstrados pela ciência! És um exemplo a ser seguido! Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Nelson Camargo, por todo o apoio fornecido nestes dois anos, me ensinando muito sobre uma área totalmente nova para mim. Aprendi muito e sou grata pelo tempo a mim dispensando!

Ao Prof. Dr. Nilson Oleskovicz, pelo exemplo de organização, pelos conselhos, pelo incentivo sempre, pela amizade! A sua ajuda sempre foi muito importante pra mim! Muito obrigada!

Ao pessoal do laboratório de Patologia Animal do CAV/UEDESC, especialmente ao Prof. Dr. Aldo Gava e à doutoranda Tiffany, por me ajudarem tanto nesta importante etapa da minha pesquisa, desde o preparo das amostras, até lidar com os desafios durante o processamento, análise e interpretação das lâminas. Não teria conseguido sem a ajuda de vocês! Obrigada!

Aos colegas e amigos do nosso grupo, por toda a ajuda, conversas, desabafos! Ao professor (e hoje doutorando) Ademar Dallabrida, por toda a ajuda desde o início do meu experimento, pelo conhecimento compartilhado e amizade construída. Ao mestrando Marcos, por participar ativamente do experimento na parte da anestesia. Ao doutorando Martielo, pelo bom-humor habitual e por sempre estar disposto a ajudar! À doutoranda Vanessa Sasso, pelas conversas e momentos de descontração! À mestranda Ronise, por todo o conhecimento compartilhado, pela paciência, dedicação, pelos conselhos e amizade! À mestranda Helena, pela amizade, pelos conselhos, pelos momentos de descontração e risadas durante as caminhadas ou ao redor de uma bacia de pipocas! Com certeza ajudou a tornar meus dias mais leves! Obrigada por tudo! Ao Bruno, Eloísa, Carina, Mirelly, Nádia e Julieta pelas conversas, muitas vezes breves, mas suficientes para aliviar um momento de estresse ou nervosismo! Muito obrigada!

Às minhas gatas Flexa e Cacau, a primeira pela serenidade que transmite e a segunda, pelo tormento que provoca! Amo demais vocês duas e aprendo lições diárias de amor e paciência com vocês!

Às ovelhas do meu experimento, sem as quais nada disso teria sido possível!

Aos animais, que nos motivam a querer aprender sempre mais para lhes ajudar a viver uma vida longa e feliz!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do CAV/UEDESC pela oportunidade e à CAPES pelo auxílio à bolsa.

À todos aqueles que apesar de não terem seus nomes escritos aqui, estiveram presentes de uma maneira ou de outra durante este processo e contribuíram para que esse objetivo fosse alcançado...

Obrigada!

“Todas as coisas da criação são filhos do Pai e irmãos do homem... Deus quer que ajudemos aos animais, se necessitam de ajuda. Toda a criatura em desgraça tem o mesmo direito de ser protegida.”

São Francisco de Assis

RESUMO

REGALIN, Bruna Ditzel da Costa. **Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos**. 2014. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

Novas técnicas para substituição de tecido ósseo têm sido continuamente pesquisadas, buscando novas alternativas para o tratamento de fraturas, tumores ósseos ou qualquer enfermidade ortopédica que indique o uso de transplantes ou enxertos ósseos. Com este intuito, foram realizados experimentos cirúrgicos em tíbias de ovinos, objetivando avaliar a capacidade osteoregenerativa de biomateriais em diferentes composições. Foram utilizadas oito ovelhas mestiças texel, com 12 meses de idade e peso médio de 30 kg. Foram produzidos três defeitos ósseos em ambas as tíbias dos animais, totalizando seis defeitos, sendo que quatro foram preenchidos por biomateriais, e dois por fragmentos ósseos retirados do próprio animal, funcionando como controle. Os materiais implantados foram: hidroxiapatita (HA), tricálcio fosfato- β (TCP- β), hidroxiapatita/tricálcio fosfato- β (HA/TCP- β 60/40) e o nanocompósito hidroxiapatita/alumina a 5% (HA/Al₂O₃ a 5%). Os animais foram alocados em dois grupos: Grupo 60 (n=04), em que os animais foram eutanasiados após 60 dias da colocação dos implantes e Grupo 90 (n=04), em que a eutanásia ocorreu 90 dias após a colocação dos implantes. Foram realizadas radiografias nos períodos pré-operatório, imediatamente após o procedimento e aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório, a fim de excluir qualquer alteração prévia ou complicação pós-operatória, capaz de comprometer a pesquisa. Após a eutanásia, foram coletadas as tíbias para avaliação macro e microscópica, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia óptica. Os resultados encontrados sugerem uma boa capacidade de neoformação óssea com a HA, o TCP- β e o composto bifásico HA/TCP- β 60/40. Este último apresenta o melhor resultado a longo prazo, devido ao melhor controle na solubilização e liberação dos

íons cálcio e fosfatos para o meio biológico durante o processo de neoformação óssea. O biomaterial nanocompósito HA/Al₂O₃ a 5% não apresentou resultados promissores neste estudo, e sugerem-se novas pesquisas a fim de investigar melhor o potencial e aplicabilidade deste novo biomaterial.

Palavras-chave: Biomaterial. Hidroxiapatita. Tricálcio fosfato-β. Ovinos. Neoformação óssea.

ABSTRACT

REGALIN, Bruna Ditzel da Costa. **Bone formation and osteointegration of micro and nanostructured biomaterial in sheep.** 2014. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

New techniques for bone replacement have continuously been searched, to find new alternatives for treatment of fractures, bone tumors or any orthopedic disease requiring transplants or bone grafts. With that proposal, we performed surgical procedures in both sheep's tibia to evaluate the osteoregenerative capacity of biomaterials of different compositions. Eight female, mongrel sheeps, 12 months old, weighting on average 30kg were obtained for the animal study. Three bone defects, in both tibias of each animal, a total of six bone defects each, were produced, being four of them treated with four different types of biomaterials and two with autogenous bone grafts, as a control group. The biomaterials implanted were: hydroxyapatite (HA), beta-tricalcium phosphate (TCP- β), hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate 60:40 (HA/TCP- β 60:40) and the nanocomposite hydroxyapatite and alumina (HA/Al₂O₃ 5%). The animals were allocated in two groups: Group 60 (n=04), in which the animals were euthanized sixty days after the implantation of the biomaterials and Group 90 (n=04), in which the animals were euthanized ninety days after the procedure. Were performed radiograph images on the preoperative period, on the immediate postoperative and at 30, 60 and 90 days of postoperative period, to excluded any previously disease or postoperative complications that could compromise this research. After euthanasia, the tibias were collected for macro and microscopic evaluation, which was accessed by scanning electron microscopy (SEM) and optic microscopy. The results suggest that HA, TCP- β and HA/TCP- β present a great osteoregenerative capacity. The last one seems to be the best for a long-term outcome, due its best control in the solubilization and releasing of calcium and phosphates ions through the biological environment during

the bone formation. The nanocomposite HA/Al₂O₃ 5% didn't show a good response on this study, and we suggest new researches to better evaluate the potential and applicability of this new biomaterial.

Keywords: Biomaterial. Hydroxyapatite. Beta-tricalcium phosphate. Sheep. Bone formation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Membro pélvico direito de ovino preparado assepticamente para o acesso ortopédico à tíbia..... 37
- Figura 2** - Tíbia direita de ovino após confecção dos defeitos em sua face medial para posterior preenchimento com os biomateriais correspondentes (proximal e distal) ou com o fragmento ósseo autógeno (defeito médio). 39
- Figura 3** - Preparo dos biomateriais para deposição no defeito correspondente. (A) Biomaterial liofilizado derramado em cuba estéril. (B) Gotas de sangue para hidratação da material. (C) Mistura viscosa pronta para aplicação..... 40
- Figura 4** - Colocação de bandagens e canaletas de alumínio em ambos os membros pélvicos após obtenção das radiografias no pós-operatório imediato em ovinos. 42
- Figura 5** – (A) Radiografia da tíbia esquerda de ovino obtida no período pós-operatório imediato. (B) Radiografia da tíbia direita de ovino obtida no período pós-operatório imediato. 48
- Figura 6** – (A) Radiografia da tíbia esquerda de ovino obtida aos 30 dias de pós-operatório. Há presença de leve reação periosteal. (B) Radiografia da tíbia direita de ovino obtida aos 30 dias de pós-operatório. 49
- Figura 7** - (A) Radiografia da tíbia esquerda de ovino obtida aos 60 dias de pós-operatório. (B) Radiografia da tíbia direita de ovino obtida aos 60 dias de pós-operatório. 50

Figura 8 – (A) Radiografia da tíbia esquerda de ovino obtida aos 90 dias de pós-operatório. (B) Radiografia da tíbia direita de ovino obtida aos 90 dias de pós-operatório..... 51

Figura 9 - (A) Micrografia dos grânulos de HA previamente à deposição no tecido, (B) HA após 60 dias da aplicação no defeito ósseo e (C) HA após 90 dias de implantação. Aumento de 5000x. 54

Figura 10 - (A) Colônia de osteoblastos na superfície do tecido ósseo sendo formado adjacente ao biomaterial implantado (aumento de 2000x) e (B) Região de interface entre biomaterial implantado e tecido ósseo neoformado (aumento de 1000x). Imagens do grupo 90 dias. 55

Figura 11 - (A) Imagens de microscopia óptica demonstrando a osteointegração da hidroxiapatita ao tecido ósseo neoformado. Há inúmeros osteócitos (setas brancas) indicando a presença de tecido ósseo jovem (H&E objetiva 10x) e (B) grânulos de hidroxiapatita sendo fagocitados por osteoclastos (setas brancas), para posterior substituição por tecido ósseo (H&E aumento 40x). Imagens do grupo 90 dias..... 55

Figura 12 - (A) Micrografia do biomaterial microporoso tricálcio fosfato – β previamente à sua deposição em tecido vivo, (B) Aspecto interno do grânulo de TCP- β após 60 dias da implantação em tecido vivo e (C) Aspecto interno do grânulo de TCP- β após 90 dias da implantação em tecido vivo. Aumento 5000x..... 57

Figura 13 - (A) Micrografia da região de interface entre biomaterial e tecido ósseo neoformado (aumento 500x). Em (B), observa-se formação de tecido ósseo no interior do grânulo. As setas pretas indicam osteócitos formando tecido ósseo. As setas brancas mostram os grânulos altamente porosos de TCP- β , separados pelo tecido ósseo formado (H&E aumento 40x). Grupo de 60 dias. 57

Figura 14 - (A) Osteoblastos na superfície óssea de ovino. Aumento 500x. (B) Formação de tecido ósseo marcante no interior dos grânulos de biomaterial. O grânulo divide-se em vários fragmentos menores, dando espaço ao novo tecido formado. Setas brancas: osteócitos. H&E aumento 40x. Grupo de 90 dias..... 59

Figura 15 - (A) Micrografia do compósito HA/TCP- β previamente à aplicação in vivo. (B) Aspecto interno do grânulo após 60 dias de aplicação in vivo. (C) Aspecto interno do grânulo após 90 dias de implantação. Aumento 5000x. 60

Figura 16 - (A) Grânulo de biomaterial bem ao centro e as regiões de interface entre este e o tecido ósseo adjacente (aumento 100x). (B) Osteoblasto sendo aprisionado pela matriz mineral e dando origem a um osteócito (aumento 3000x). Grupo de 60 dias..... 61

Figura 17 - (A) Grânulo de biomaterial remanescente, envolvido por tecido ósseo neoformado de muito boa qualidade (aumento 200x). (B) Presença de osteoblastos em uma dada superfície óssea, que parece estar dando origem a um canal de Havers (aumento 500x). Grupo de 90 dias. 62

Figura 18 - (A) Imagem de microscopia óptica com o biomaterial compósito HA/TCP- β após 90 dias de implante. Há neoformação óssea, com presença de lamelas concêntricas e abundante quantidade de osteócitos (setas pretas); biomaterial remanescente (setas brancas) e osteoblastos na superfície do tecido ósseo (setas azuis), H&E aumento 40x. (B) Visão geral de um corte histológico do mesmo material. Grande quantidade do biomaterial remanescente, entremeados por tecido ósseo maduro, H&E aumento 10x. Grupo 90 dias. 62

Figura 19 - (A) Morfologia interna dos grânulos de HA/Al₂O₃ a 5% previamente à implantação in vivo. (B) Morfologia interna dos grânulo

após 60 dias de implantação in vivo. (C) Morfologia interna dos grânulos após 90 dias da implantação. Houve mínima alteração na morfologia interna com este material; o que pode ser observado é a presença de filamentos de fibrina após os 60 dias da implantação. Aumento de 5000x..... 63

Figura 20 - (A) Grânulos do biomaterial HA/Al₂O₃ a 5% (setas brancas) envolvidos por tecido fibrocolagenoso (aumento 200x). (B) Tecido fibroso desorganizado circundando o material, aonde esperava-se encontrar tecido ósseo bem formado (aumento 500x). Grupo 60 dias.. 64

Figura 21 - Colônias pequenas de células fagocitárias (setas brancas) entremeadas no tecido fibroso que circunda o biomaterial (setas azuis). Aumento 100x. Grupo 60 dias..... 65

Figura 22 - Visão geral aos 90 dias após implantação do nanocompósito HA/Al₂O₃ a 5%. Presença de colônias maiores de células de linhagem fagocitária (setas brancas) e presença consistente de material remanescente (setas azuis), bem como de tecido fibroso intergranular. Aumento 100x..... 66

Figura 23 - (A) Imagens histológicas de grânulos de HA/Al₂O₃ a 5% circundados por macrófagos. Há tecido fibroso adjacente às células (H&E aumento 40x). (B) Observa-se intensa formação de tecido fibroso e macrófagos repletos por biomaterial fagocitado, com pigmentação escura no citoplasma celular (setas pretas). H&E aumento 40x. 66

Figura 24 - Imagens de tecido ósseo maduro na região implantada com autoenxerto. (A) Aumento 100x. (B) Aumento 200x. Grupo de 60 dias. 67

Figura 25 - Osteoblastos formando novo tecido ósseo onde foi realizado autoenxerto (aumento 1000x). Grupo 60 dias..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Biomateriais fornecidos pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC e suas composições. 35

Tabela 2 - Posição dos defeitos em que foram implantados a hidroxiapatita (HA), o tricálcio fosfato- β (TCP- β), a composição bifásica hidroxiapatita/tricálcio fosfato- β 60/40 (HA/TCP- β 60/40) e o nanocompósito hidroxiapatita/alumina (HA/ Al_2O_3), além do fragmento ósseo do grupo controle..... 40

Tabela 3 - Critérios semi-quantitativos da neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento das lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), formação de tecido mieloide (FTM) e infiltrado inflamatório (INI) utilizados para análise por microscopia óptica. 44

Tabela 4 - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento das lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), formação de tecido mieloide (FTM) e infiltrado inflamatório (INI), dos biomateriais implantados após 60 dias..... 52

Tabela 5 - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento das lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), formação de tecido mieloide (FTM) e infiltrado inflamatório (INI), dos biomateriais implantados após 90 dias..... 53

LISTA DE ABREVIATURAS

HA	Hidroxiapatita
HA/Al ₂ O ₃	Hidroxiapatita/alumina
HA/TCP-β	Hidroxiapatita/tricálcio fosfato-β
H&E	Hematoxilina e eosina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MO	Microscopia óptica
TCP-β	Tricálcio fosfato-β

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
1 REVISÃO DE LITERATURA	27
1.1 TECIDO ÓSSEO.....	27
1.2 BIOMATERIAIS E ENXERTOS ÓSSEOS	28
1.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E MICROSCOPIA ÓPTICA (MO).....	30
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 OBJETIVOS GERAIS	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 APRESENTAÇÃO DOS BIOMATERIAIS	35
3.2 ANIMAIS	35
3.3 PREPARO PRÉ-OPERATÓRIO	36
3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	37
3.5 PÓS-OPERATÓRIO	41
3.6 ACOMPANHAMENTO RADIOLÓGICO	42
3.7 AVALIAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA	43
3.7.1 Avaliação histológica	43
3.7.2 Microscopia eletrônica de varredura	45
4 RESULTADOS	47
4.1 HIDROXIAPATITA (HA).....	53
4.1.1 60 dias	54

4.1.2 90 dias.....	55
4.2 TRICÁLCIO FOSFATO – β (TCP- β).....	56
4.2.1 60 dias.....	56
4.2.2 90 dias.....	58
4.3 HA/TCP- β	59
4.3.1 60 dias.....	61
4.3.2 90 dias.....	61
4.4 HA/Al ₂ O ₃ a 5%	63
4.4.1 60 dias.....	64
4.4.2 90 dias.....	65
4.5 CONTROLE.....	67
5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS	77

INTRODUÇÃO

Animais com algum tipo de fratura, geralmente causadas por trauma, correspondem à grande parte da rotina clínica-cirúrgica dos hospitais veterinários. Atropelamentos consistem no tipo mais comum destes traumas. Tumores ósseos primários ou metastáticos são causas comuns de fraturas causadas por enfermidades pré-existentes (FOSSUM, 2008). Além disso, doenças ósseas degenerativas e fraturas afetam milhões de pessoas no mundo inteiro. Estima-se que até 2020, o número de pessoas acima dos 50 anos com doenças ósseas, irá dobrar (STURM et al., 2010).

Há algum tempo pesquisadores vêm tentando encontrar materiais com características adequadas para restauração e substituição de tecidos ósseos (LEGEROS, 2002), tanto em seres humanos, quanto em animais. Inicialmente este processo ocorreu pela utilização de materiais biológicos, como no caso de enxertos ósseos ou mesmo transplantes. Estes podem ser classificados de acordo com a origem do material enxertado como autógenos, quando o doador é o próprio receptor; alógenos, quando o doador é da mesma espécie do receptor e xenógenos, quando doador e receptor pertencem a espécies diferentes (MARTINEZ; WALKER, 1999). Autógenos são considerados mais efetivos, porém necessitam de um procedimento cirúrgico adicional, possuem viabilidade limitada e risco de morbidade na área doadora (LEGEROS, 2002; MOORE et al., 2001). Alógenos e xenógenos têm sido estudados para superar os riscos associados ao osso autógeno, mas seus usos são limitados por problemas como rejeição, sequestro ósseo e infecção, além do potencial risco de disseminação de doenças (LEGEROS, 2002; MOORE et al., 2001).

Diante destas limitações, alguns materiais biocompatíveis são pesquisados para aplicação clínica. Entende-se por biomaterial, toda substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que não sejam drogas ou fármacos, e que podem ser usadas durante qualquer período de tempo, como parte ou como todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (WILLIAMS, 1987). Com o propósito de evitar enxertos ósseos autógenos, o material deve responder a determinados requisitos, como possuir estrutura estável, rapidez na incorporação com o tecido

ósseo, promover osteocondução e gerar pouca ou nenhuma complicação associada ao seu uso (MELLONIG, 1991). Respeitando estas exigências, o fosfato de cálcio, um biomaterial cerâmico comercializado desde 1970 na forma de hidroxiapatita e tricálcio fosfato, tem recebido considerável atenção no campo da cirurgia plástica, ortopédica e odontológica (OONISHI, 1991; CONSTANTINO et al., 1992; ONO et al., 1992). Estes materiais apresentam boa habilidade osteoindutiva, ou seja, induzem a diferenciação celular de células mesenquimais indiferenciadas em linhagens osteogênicas e em tecido ósseo neoformado (HONG et al., 2010).

A hidroxiapatita é fabricada para uso clínico na forma de blocos ou grânulos, porosa ou densa (HÖNIG et al., 1998). Grânulos porosos são estudados em experimentos por serem bem tolerados pelo tecido ósseo, facilitarem a infiltração e proliferação de osteoblastos nos contornos dos grãos e em suas microporosidades, além de promoverem a proliferação de vasos sanguíneos que são essenciais ao processo reparativo (BURSTEIN et al., 1997; THOMSON et al., 1998). A hidroxiapatita em forma de grânulos facilita a adaptação ao contorno dos defeitos ósseos, não tem restrição quanto à quantidade disponível e não está sujeita à rejeição imunológica, por ser um biomaterial biocompatível (HÖNIG; MERTEN, 1993; ONO et al., 1993; OKAZAKI et al., 2000).

Em comparação com os fosfatos de cálcio microestruturados, as biocerâmicas com micro e nanoestruturas interconectadas, oferecem melhores condições de adesão e proliferação celular, devido às suas mais altas especificidades de superfície, porosidade em micro e nanoescala e topografia de superfície mais favorável. Estas vantagens estruturais demonstram melhor bioatividade, solubilidade e biodegradabilidade destes biomateriais quando aplicados *in vivo* e/ou em meio simulado (HONG et al., 2010).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a resposta biológica dos implantes de biomateriais granulados microporosos de HA e do TCP- β , e do nanocompósito HA/Al₂O₃- α , implantados em tíbias de ovinos, procurando associar o potencial da neoformação óssea entre os diferentes biomateriais.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 TECIDO ÓSSEO

O tamanho, formato e a força dos ossos são determinados por células ósseas efectoras das linhagens osteoblásticas e osteoclásticas. Os osteócitos são células não proliferativas, diferenciadas, que estão no final da linhagem osteoblástica. Estas células residem tanto na matriz mineral óssea quanto em um osteoide neoformado, permanecendo presos em pequenas lacunas na porção rígida do osso (NOBLE, 2008).

Quando ocorre uma fratura, há hemorragia, devido aos danos causados nos vasos sanguíneos, além de destruição da matriz e de células ósseas. O início do processo de reparação ocorre por meio da remoção dos coágulos sanguíneos e resíduos celulares por macrófagos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A consolidação óssea é um processo complexo que compreende três fases principais: inflamatória, reparo e remodelação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SOUSA, 2003; ISOLA, 2012). A fase inflamatória inicia imediatamente após a fratura e dura, em média, duas a três semanas. Nas primeiras 48 horas, o exsudato do hematoma contém vários mediadores inflamatórios, fatores angiogênicos e do crescimento liberados pelas plaquetas, células locais, mastócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (SOUSA, 2003). A fase de reparo após fratura ou osteotomia e sua relação com o suprimento sanguíneo são fundamentais. A cicatrização não ocorre sem angiogênese, que é reconhecida como passo essencial na osteogênese, em função da proximidade das células capilares com osteoblastos e células osteoprogenitoras nos sítios de nova formação óssea (PELLISSIER et al., 2004).

Os osteoblastos depositam uma matriz intercelular de colágeno e polissacarídeos que se torna impregnada de sais de cálcio, formando o osso primário, que se transforma gradualmente, em osso amadurecido, com estrutura lamelar típica, denominado calo ósseo (CROCI et al., 2003).

A falha destes processos biológicos, bem como a violação dos princípios da cirurgia ortopédica, podem causar distúrbios na reparação de fraturas, tendo como consequência a união retardada ou não-união óssea (SCHMAEDECKE et al., 2003; MORAES, 2006). Além disso,

traumas, anormalidades do desenvolvimento, neoplasias e diversas enfermidades podem provocar defeitos ósseos (CLOKIE et al., 2002; ARINZEH et al., 2003).

Assim, novas soluções para tratamentos ortopédicos com materiais que possam ser utilizados como enxerto ósseo com o intuito de estimular a osteogênese (enxertos e implantes osteogênicos e osteoindutores) ou mesmo direcionar de forma mais rápida e apropriada a cicatrização óssea (enxertos e implantes osteocondutores) (SCHMAEDECKE et al., 2003; MORAES, 2006), vem sendo amplamente pesquisada a mais de dez anos.

1.2 BIOMATERIAIS E ENXERTOS ÓSSEOS

A procura por biomateriais ganhou força devido à necessidade de se encontrar substitutos para o enxerto autógeno. Como a matriz mineral óssea é composta por um tipo de fosfato de cálcio, vários fosfatos de cálcio têm sido pesquisados para o desenvolvimento de substitutos ósseos (DOROZHKIN, 2007). Stein et al. (2009), compararam a porcentagem de neoformação óssea promovida pelo enxerto ósseo autógeno e três diferentes biomateriais microestruturados, entre eles a hidroxiapatita (HA) e hidroxiapatita associada ao fosfato de cálcio- β (HA + TCP- β), e verificaram que o osso autógeno apresentou porcentagem de neoformação óssea muito superior a dos substitutos ósseos testados. No entanto, o autoenxerto possui algumas desvantagens, como volume e forma limitados das áreas doadoras, o defeito gerado na extração do enxerto e o pós-operatório desta área, que normalmente apresenta maiores complicações, como infecção, dor e hematomas, do que a área receptora (BURG et al., 2000; BOSTROM; SEIGERMAN, 2005).

Shirnet et al. (2010), por sua vez, avaliaram a importância do colágeno e hidroxiapatita na reparação de fraturas provocadas experimentalmente na fíbula em ratos e concluíram que os biomateriais utilizados possuem capacidade osteocondutora mesmo observando-se uma baixa neoformação óssea. Além disso, desde o século passado, a hidroxiapatita vem recebendo especial atenção nos campos da cirurgia plástica, ortopédica e odontológica, por ser capaz de se incorporar ao tecido ósseo por meio da estimulação osteocondutiva e osteoindutiva, não apresentar rejeição associada ao seu uso como fator essencial de biocompatibilidade além de oferecer resistência biomecânica no local do implante (MELLONIG, 1991; ONO et al, 1992). Roque-Rodriguez et al.

(2009), observaram que a hidroxiapatita associada ao alandronato acelera o processo de reparação óssea. Embora a hidroxiapatita sintética demonstre boa osteocondutividade, sua bioabsorção é baixa e ela permanece no organismo por muito tempo após a implantação; a hipótese é de que o biomaterial implantado seja absorvido pelos tecidos adjacentes e estimule, assim, a neoformação e reparação do tecido ósseo (KAMITAKAHARA et al., 2008; CORRÊA, 2013).

O tricálcio fosfato- β (TCP- β), por sua vez, foi um dos primeiros compostos de fosfato de cálcio a ser usado como substituto ósseo, sendo que possui propriedades osteointegrativas e osteocondutivas (MOORE et al., 2001). O TCP- β apresenta maior solubilidade do que a hidroxiapatita e são degradados mais rapidamente do organismo (DUCHEYNE et al., 1993). Compostos cerâmicos bifásicos à base de HA e TCP- β também têm sido desenvolvidos, e observa-se que estas composições apresentam absorção diferenciada em relação aos fosfatos de cálcio puros. As composições bifásicas demonstram um aumento em sua solubilidade conforme se altera a proporção TCP- β /HA. Diferentes autores observaram nas composições bifásicas de fosfatos de cálcio, quando aplicadas in vivo ou em meio simulado, uma deposição de cristais de apatita óssea na superfície dos grãos e microporos, o que está associado às melhores capacidades de solubilidade que estes materiais apresentam (DACULSI, 1998; CHOW, 2009; RABELO NETO, 2009). Estes resultados mostram que a bioabsorção e a bioatividade das composições bifásicas podem ser controlados quando se altera a razão TCP- β /HA (KAMITAKAHARA et al., 2008; DALMÔNICO, 2011).

No entanto, a capacidade de bioabsorção dos fosfatos de cálcio não depende somente da solubilidade dos constituintes do biomaterial, mas também da morfologia dos grãos e da microporosidade. Isto ainda pode estar associado às características micro e nanoestruturais, área superficial de grãos e da interconexão dos microporos (KAMITAKAHARA et al., 2008; DALMÔNICO, 2011; SILVA, 2012; CORRÊA, 2013). A importância da microestrutura dos poros dos fosfatos de cálcio tem sido reportada por muitos pesquisadores e já se sabe que controlando as microestruturas das cerâmicas de fosfatos de cálcio, pode-se desenvolver substitutos ósseos com propriedades osteoindutivas intrínsecas. As cerâmicas à base de TCP- β porosas podem ser ferramentas úteis, pois as células relacionadas à reparação

óssea são atraídas. As cerâmicas serão degradadas com a reparação óssea (KAMITAKAHARA et al., 2008).

As biocerâmicas bioinertes, tais como a alumina (Al_2O_3) e a zircônia (ZrO_2), formam uma fina camada fibrosa não-aderente na interface entre o tecido ósseo e o biomaterial. Estas biocerâmicas são encapsuladas por um tecido fibroso e isoladas do osso adjacente por imunorreações. São normalmente empregadas na articulação coxo-femoral devido à alta resistência e durabilidade (KAMITAKAHARA et al., 2008).

Entre as cerâmicas com melhor desempenho, estão os biovidros, a alumina, o tricálcio fosfato- β e a hidroxiapatita (HENCH, 1991).

A elaboração de biomateriais nanocompósitos em uma matriz de hidroxiapatita vem sendo uma prática usual no desenvolvimento de novos biomateriais nanoestruturados. Observa-se na literatura uma vasta gama de trabalhos elaborando estes biomateriais com uma segunda fase nanométrica do tipo alumina- α , sílica, zircônia e titânio (SOUZA, 2009; BAŞAR et al., 2011; CAMARGO et al., 2012; CORRÊA, 2013). A adição de uma segunda fase descontínua na forma de nanopartículas, fibras ou plaquetas dentro de uma fase contínua denominada de matriz cerâmica, tem por objetivo modificar as características da microestrutura, nanoestrutura e da superfície de grãos e microporos, procurando melhorar a solubilidade, a adesão e proliferação celular em sua superfície, bem como, melhorar as propriedades mecânicas, minimizando, principalmente, o problema da fratura frágil, procurando, assim, melhorar o valor do coeficiente de tenacidade à fratura da matriz cerâmica (CORRÊA, 2013).

1.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)

Microscópios ópticos convencionais ficam restritos a um aumento de 2000 vezes, acima disto alguns detalhes menores tornam-se impossíveis de observação. Aparelhos de microscopia eletrônica de varredura, entretanto, permitem um aumento de 300 000 vezes ou mais, para a maior parte dos materiais sólidos, mantendo profundidade de campo compatível com a observação de superfícies rugosas (DEDAVID et al., 2007). O MEV pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de amostras sólidas, sendo amplamente utilizado em áreas da biologia, engenharia, entre

outras (DEDAVID et al., 2007), enquanto a microscopia óptica permite a análise estrutural de tecidos e morfologia de células.

O MEV apresenta as imagens de maneira tridimensional, devido à grande profundidade de campo, e permite exame de pequenos aumentos com grande profundidade de foco, tornando-se extremamente útil para complementar as análises obtidas com a microscopia óptica (DEDAVID et al., 2007).

Existem diversas maneiras de se avaliar o resultado da microscopia óptica. Um método normalmente empregado consiste na elaboração de critérios para análise semi-quantitativa como, por exemplo, presença de infiltrado inflamatório, deposição de colágeno e a neoformação óssea, que variam em intensidade como discreto, moderado e intenso (PINHEIRO, 2009). Para o presente estudo, foram utilizados os critérios modificados do trabalho de Valiati (2011), que avaliou os efeitos da laserterapia de baixa potência na incorporação de aloenxertos ósseos em blocos processados por congelamento profundo e implantados em coelhos. Os critérios avaliados por Valiati (2011) foram: deposição de fibras colágenas, remodelação óssea, preenchimento das lacunas osteocíticas, incorporação do enxerto na interface e infiltrado inflamatório.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o comportamento da neoformação óssea a partir dos biomateriais granulados microporosos de hidroxiapatita, tricálcio fosfato- β , composição HA/TCP- β 60/40, e do nanocompósito HA/ Al_2O_3 a 5%, implantados em defeitos ósseos realizados experimentalmente em tíbias de ovelhas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar qual biomaterial apresentou melhor capacidade de neoformação óssea, melhor osteointegração e osteocondução. A qualidade do tecido ósseo formado também é importante e foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia óptica (MO).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Estudo aprovado pelo Comitê de Ética e de Bem Estar Animal - CETEA da Universidade do Estado de Santa Catarina, segundo protocolo n. 1.29.12.

3.1 APRESENTAÇÃO DOS BIOMATERIAIS

Os biomateriais utilizados para realização deste trabalho foram fornecidos pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/Joinville. Estes foram elaborados seguindo o método via úmido descrito por Dalmônico (2011).

Os biomateriais utilizados neste projeto de pesquisa se apresentavam sob a forma de biomateriais granulados microporosos, com tamanhos variando entre $200\mu\text{m} < d < 500\mu\text{m}$. A tabela 1 mostra os biomateriais e suas composições.

Tabela 1 - Biomateriais fornecidos pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC e suas composições.

Biomaterial	Composição	Fornecedor
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	UDESC
Fosfato de Cálcio- β (TCP- β)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-}\beta$	UDESC
Bifásico (HA/TCP- β)	60% $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ / 40% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-}\beta$	UDESC
Nanocompósito $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-}\alpha\text{n}$ (HAp/ $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-}\alpha\text{n}$)	95% $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ / 5% $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-}\alpha\text{n}$	UDESC

Fonte: produção Grupo de Pesquisa em Biomateriais, UDESC.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizadas oito ovelhas mestiças texel, hípidas, com peso médio de $28,5 \pm 7,4\text{kg}$ e 12 meses de idade. Previamente à inclusão na pesquisa, todos os animais foram submetidos à avaliação clínica, radiográfica e laboratorial (hemograma completo, função renal [ureia e

creatinina] e função hepática [aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, proteína sérica total, albumina, globulinas]). Os animais selecionados foram alocados em baias no setor de grandes animais do Hospital de Clínica Veterinária do CAV-UEDESC para um período de adaptação de 15 dias, recebendo medicação antiparasitária, alimentação à base de ração para ovinos e silagem de milho, além de água *ad libitum*.

3.3 PREPARO PRÉ-OPERATÓRIO

No dia anterior ao procedimento cirúrgico, foi realizada tosquia dos animais, além de tricotomia completa dos membros pélvicos e subsequente limpeza com água e iodopovidine degermante¹.

Os animais foram mantidos em jejum sólido por 24 horas e hídrico de 8 horas, no período que antecedeu o procedimento cirúrgico.

No dia do experimento, os animais receberam medicação pré-anestésica à base de 0,3mg/kg de morfina² e 10µg/kg de detomidina³, por via IM. Passados 15 minutos, foram submetidos à cateterização da veia cefálica para administração de diazepam⁴ 0,5mg/kg e cetamina⁵ 5mg/kg. Após a indução, foi realizada intubação com sonda endotraqueal tipo Murphy e a manutenção anestésica foi realizada com isoflurano⁶ diluído em oxigênio a 100%, a uma taxa de 50ml/kg/min, em um sistema de reinalação parcial de gases. Foi realizada anestesia subaracnoide com a associação de 0,5mg/Kg de levobupivacaína⁷ sem vasoconstritor e 1,25mg/kg de cetamina, completando-se para atingir um volume final de 1mL/7,5kg com solução fisiológica 0,9%. Após administração subaracnoide cada animal permaneceu em decúbito ventral por 30 minutos, para aguardar o tempo de latência dos fármacos administrados. Nesse momento os membros foram preparados para a intervenção cirúrgica asséptica.

¹ Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto – SP – Brasil.

² Dimorf®, Cristália, Itapira – SP – Brasil.

³ Detomidin®, Syntec, Cotia – SP – Brasil.

⁴ Compaz®, Cristália, Itapira – SP – Brasil.

⁵ Cetamin®, Syntec, Cotia – SP – Brasil.

⁶ Isoforine®, Cristália, Itapira – SP – Brasil.

⁷ Novabupi®, Cristália, Itapira - SP – Brasil.

3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O procedimento cirúrgico foi realizado sempre pelo mesmo cirurgião e mesmo auxiliar. Com o animal em decúbito dorsal e o membro pélvico esquerdo preso à mesa cirúrgica, realizou-se antisepsia do membro pélvico direito em todas as suas faces, desde a região do tarso estendendo-se proximalmente até a região inguinal, empregando-se o esquema álcool-iodo-álcool. A extremidade distal do membro foi protegida por compressa estéril, enrolada e fixada ao membro por tiras de gaze. Os panos de campo foram posicionados de forma a expor a região da tíbia, desde a articulação femorotibiopatelar até a extremidade distal do membro (figura 01). O mesmo procedimento foi realizado para acessar a tíbia do membro pélvico esquerdo.

Figura 1 - Membro pélvico direito de ovino preparado asépticamente para o acesso ortopédico à tíbia.



Fonte: produção do próprio autor

O acesso à tibia foi realizado conforme técnica descrita por Piermatei e Johnson (2004). Uma vez exposta a sua face medial, foram produzidos três defeitos ósseos, na face cortical medial. Dois destes defeitos foram produzidos com auxílio de uma broca odontológica de 6mm⁸, os quais foram preenchidos por biomateriais. Os defeitos produzidos para estudo controle, foram fabricados com auxílio de uma trefina⁹ de 6mm, a fim de possibilitar a remoção do fragmento ósseo a ser reimplantado. O autoenxerto foi implantado na posição central da diáfise. Os defeitos produzidos apresentaram área padronizada e distância entre si de dois centímetros (figura 02). Durante a realização dos defeitos, o local de perfuração, foi constantemente irrigado com solução salina estéril resfriada. O cirurgião-auxiliar sustentava as duas extremidades da tibia, a fim de exercer pressão contrária ao sentido de perfuração, evitando-se a atuação das forças de envergamento.

⁸ Neodent®, Curitiba – PR – Brasil.

⁹ Neodent®, Curitiba – PR – Brasil.

Figura 2 - Tíbia direita de ovino após confecção dos defeitos em sua face medial para posterior preenchimento com os biomateriais correspondentes (proximal e distal) ou com o fragmento ósseo autógeno (defeito médio).



Fonte: produção do próprio autor

Os defeitos produzidos tiveram o seu leito preenchido com quatro diferentes tipos de biomateriais: hidroxiapatita (HA), tricálcio fosfato- β (TCP- β), hidroxiapatita/tricálcio fosfato- β 60/40 (HA/TCP- β 60/40) e o nanocompósito hidroxiapatita/alumina 5% (HA/ Al_2O_3 5%), sendo cada ponto de defeito previamente identificado para o material correspondente; os dois defeitos centrais foram preenchidos pelos fragmentos ósseos removidos com trefina no momento da confecção do espaço a ser preenchido, correspondendo ao grupo controle, conforme demonstrado na tabela 2. A ordem para implantação sempre foi a seguinte: defeito proximal, defeito distal e, por último, defeito central (autoenxerto).

Tabela 2 - Posição dos defeitos em que foram implantados a hidroxiapatita (HA), o tricálcio fosfato- β (TCP- β), a composição bifásica hidroxiapatita/tricálcio fosfato- β 60/40 (HA/TCP- β 60/40) e o nanocompósito hidroxiapatita/alumina (HA/ Al_2O_3), além do fragmento ósseo do grupo controle.

Osso implantado	Defeito proximal	Defeito médio	Defeito distal
Tíbia Direita	HA	Osso (controle)	TCP- β
Tíbia Esquerda	HA/TCP- β	Osso (controle)	HA/ Al_2O_3

Fonte: produção do próprio autor

Para a adequada aplicação dos biomateriais em seus respectivos defeitos, primeiramente o biomaterial granulado foi hidratado com sangue arterial, proveniente do próprio animal. Esta mistura deu origem a uma massa viscosa, que facilitou o completo preenchimento dos defeitos ósseos (figura 03).

Figura 3 - Preparo dos biomateriais para deposição no defeito correspondente. (A) Biomaterial liofilizado derramado em cuba estéril. (B) Gotas de sangue para hidratação da material. (C) Mistura viscosa pronta para aplicação.



Figura 03 (A)



Figura 03 (B)



Figura 03 (C)

Fonte: produção do próprio autor

Finalizada a deposição dos biomateriais e do fragmento ósseo, procedeu-se à sutura das camadas teciduais. A reaproximação dos planos anatômicos foi realizada mediante sutura do periósteeo com fio de náilon¹⁰ nº 0 em padrão contínuo simples. O fechamento da camada muscular e a redução do tecido subcutâneo foram realizados em padrão contínuo simples com fio de náilon¹¹ 2-0. Na dermorráfia, o padrão utilizado foi ponto isolado simples.

3.5 PÓS-OPERATÓRIO

Terminado o procedimento cirúrgico, foi aguardada a recuperação dos animais. Após a extubação e ainda levemente sedados, foram encaminhados ao setor de radiologia para obtenção das radiografias de controle pós-operatório imediato. Em seguida, os animais receberam bandagens de Robert-Jones modificada, associadas a canaletas de alumínio, em ambos os membros pélvicos (figura 04), a fim de minimizar o risco de fraturas ou lesões aos membros operados. Estas talas eram mantidas durante 30 dias e só foram refeitas em casos específicos, como em caso de afrouxamento, desgaste ou quando estivesse, de alguma forma, causando algum tipo de lesão ou desconforto ao animal.

¹⁰ Shalon[®], São Luis de Montes Belos – GO – Brasil.

¹¹ Shalon[®], São Luis de Montes Belos – GO – Brasil.

Figura 4 - Colocação de bandagens e canaletas de alumínio em ambos os membros pélvicos após obtenção das radiografias no pós-operatório imediato em ovinos.



Fonte: produção do próprio autor

No pós-operatório imediato foi mantida analgesia com 5mg/kg de tramadol¹² por via subcutânea, a cada 8 horas, 25mg/kg de dipirona¹³ por via subcutânea, a cada 8 horas, e 0,4mg/kg de meloxicam¹⁴ a cada 24 horas, durante três dias consecutivos. Foi realizada também profilaxia antimicrobiana com aplicação de 15000 UI/kg de penicilina benzatina¹⁵ antes da recolocação dos animais nas baias.

3.6 ACOMPANHAMENTO RADIOLÓGICO

Foram realizadas imagens controle no período pré-operatório, imediatamente após o procedimento e aos 30, 60 e 90 dias após a

¹² Tramadon®, Cristália, Itapira – SP – Brasil.

¹³ Febrax®, Lema-injex biologic, Vespasiano – MG – Brasil.

¹⁴ Maxicam® 2%, Ouro Fino, Cravinhos – SP – Brasil.

¹⁵ Pentabiótico® Veterinário, Fort Dodge, Campinas – SP - Brasil.

intervenção cirúrgica. As radiografias foram obtidas nas posições antero-posterior e médio-lateral. Para estes exames os animais foram mantidos em jejum sólido e hídrico a partir da noite anterior, a fim de possibilitar o uso de um protocolo sedativo leve, evitar o estresse dos animais e mantê-los na posição adequada para a realização das radiografias. O protocolo utilizado foi 0,05 mg/kg de xilazina¹⁶, pela via intramuscular.

3.7 AVALIAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA

Quatro animais foram submetidos à eutanásia aos 60 dias de pós-operatório e quatro animais aos 90 dias. A eutanásia foi realizada conforme Resolução CFMV n°1000/2012, de 11 de maio de 2012. Após a coleta de ambas as tíbias, os implantes foram acessados por meio da incisão criada na intervenção cirúrgica anterior. A face medial das tíbias foi exposta e as mesmas foram coletadas por desarticulação femorotíbiopatelar e tibiotársica.

Os ossos obtidos foram adequadamente identificados e avaliados quanto ao aspecto macroscópico e acondicionados em frascos contendo formol 10%.

Concluída esta etapa, o osso foi dividido em três fragmentos liberando cada região implantada para análise individual. Cada fragmento obtido foi, ainda, dividido em dois, sendo que uma porção foi encaminhada à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a outra para análise histológica por microscopia óptica.

3.7.1 Avaliação histológica

Os fragmentos ósseos separados individualmente foram preservados em formaldeído tamponado a 10%.

Foram encaminhados fragmentos de tecido ósseo cortical, em frascos identificados com a numeração referente a cada defeito produzido, biomaterial implantado, número de identificação do animal e grupo ao qual pertencia, sendo identificado no fragmento os locais do osso cortical, interface e biomaterial.

¹⁶ Xilazin®, Syntec, Cotia – SP – Brasil.

Após descalcificação em ácido nítrico¹⁷ a 10%, as amostras foram processadas em histotécnico onde foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol para, enfim, serem incluídas em blocos de parafina. Posteriormente, as amostras foram seccionadas no micrótomo em cortes de 4-5µm de espessura. Finalmente, corados pelo método de hematoxilina e eosina (H&E) descrito por PROPHET et al. (1992) e observados em microscopia óptica.

A interpretação das análises histológicas foi feita mediante seleção de critérios adaptados da pesquisa de Valiati (2011). Os critérios analisados foram: neoformação de tecido ósseo, deposição de fibras colágenas, preenchimento das lacunas osteocíticas, presença de osteoblastos, formação de tecido mieloide e presença de infiltrado inflamatório, sendo, para cada critério, atribuído um número de cruzes correspondente à proporção observada, conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3 - Critérios semi-quantitativos da neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento das lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), formação de tecido mieloide (FTM) e infiltrado inflamatório (INI) utilizados para análise por microscopia óptica.

	NTO	DFC	PLO	PO	FTM	INI
Não	0	0	0	0	0	0
Leve	+	+	+	+	+	+
Moderado	++	++	++	++	++	++
Acentuado	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Muito acentuado	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Fonte: modificado de Valiati (2011)

¹⁷ Quimitec®, Duque de Caxias – RJ – Brasil.

3.7.2 Microscopia eletrônica de varredura

Os estudos de caracterização morfológica e microestrutural foram realizados sobre os biomateriais granulados e o material recuperado das biópsias com 60 e 90 dias de pós-operatório.

As amostras conservadas em formol a 10% foram submetidas a um rigoroso processo de desidratação em álcool 70% e 100%, que durava aproximadamente cinco dias. Após, passaram por um processo de diafanização em xilol durante um período que variava de 8-24 horas, conforme a espessura da amostra em questão, e então, retornavam para o álcool 100% por mais 24 horas. Após esta etapa preparatória inicial, com o auxílio de um disco de diamante acoplado a um motor de alta rotação, fez-se uma pequena fissura na amostra, a fim de desenvolver um ponto de fragilidade, que permitisse a fratura do material a ser analisado.

Para facilitar os trabalhos de caracterização pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram preparadas utilizando-se um porta amostra na forma de disco em liga de alumínio com superfície lisa, onde uma fita de carbono dupla face foi fixada para a deposição do fragmento da amostra fraturada. Esta amostra foi, então, alocada em um metalizador¹⁸ e submetida ao processo de metalização por pulverização catódica, com deposição de um filme de ouro sobre a superfície do porta amostra contendo a amostra a ser analisada. Os parâmetros de deposição iônica estabelecidos foram os seguintes: temperatura na câmara de metalização de 25°C, corrente de 40mA, tensão de 2kV e tempo de deposição de 140 segundos, fornecendo um filme de ouro na superfície das partículas da ordem de 30nm.

Os estudos foram realizados com auxílio da técnica de microscopia eletrônica de varredura¹⁹ (MEV), com o equipamento marca ZEISS modelo DSM 940A, por meio do método com elétrons secundários (SE) e retro-espelhados (BSE), com distância de trabalho entre 15 e 10mm e tensão de aceleração dos elétrons de 20 kV.

¹⁸ Bal-Tec® Sputter Coater SCD 050

¹⁹ Zeiss® DSM 940A

A análise descritiva morfológica foi realizada pelo método visual da interface entre o biomaterial implantado e a área receptora, bem como pela exploração do material remanescente e pesquisa por linhagens de células osteogênicas que se depositaram entre os grânulos do biomaterial, promovendo a formação de tecido ósseo na região do implante.

4 RESULTADOS

No período pós-operatório, nenhum animal apresentou complicações como infecção, deiscência de sutura ou fraturas. As análises radiológicas efetuadas demonstraram um processo de cicatrização normal, sem reação periosteal excessiva e com absorção gradativa dos biomateriais implantados. Não foi observada diferença radiográfica entre os biomateriais implantados e a diferença entre os processos de cicatrização não pode ser diferenciado por este método (figuras 5, 6, 7 e 8).

Após a eutanásia, as tíbias foram coletadas e, macroscopicamente, a única alteração observada foi a não absorção do biomaterial HA/Al₂O₃ a 5%. Nos demais defeitos, após 60 ou 90 dias, praticamente não se identificava o local de implantação e não se observava resquícios do biomaterial implantado. No grupo mencionado, entretanto, todos os animais, de ambos os grupos, apresentavam a região do defeito com o biomaterial remanescente facilmente perceptível macroscopicamente.

Foram realizados estudos de caracterização morfológica e microestrutural dos biomateriais granulados microporosos empregados neste estudo, com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram para todos os biomateriais uma variada morfologia dos grânulos, além da microestrutura microporosa dos biomateriais granulados, que está ilustrada ao longo do texto, no subitem do biomaterial correspondente. As análises histológicas demonstraram a qualidade do tecido ósseo neoformado, bem como a capacidade de absorção de cada biomaterial, sendo demonstrado individualmente a seguir.

Figura 5 – (A) Radiografia da tíbia esquerda de ovino obtida no período pós-operatório imediato. (B) Radiografia da tíbia direita de ovino obtida no período pós-operatório imediato.



Figura (A)

Fonte: produção do próprio autor



Figura (B)

Figura 6 – (A) Radiografia da tíbia esquerda de ovino obtida aos 30 dias de pós-operatório. Há presença de leve reação periosteal. (B) Radiografia da tíbia direita de ovino obtida aos 30 dias de pós-operatório.



Figura (A)



Figura (B)

Fonte: produção do próprio autor.

Figura 7 - (A) Radiografia da tíbia esquerda de ovino obtida aos 60 dias de pós-operatório. (B) Radiografia da tíbia direita de ovino obtida aos 60 dias de pós-operatório.



Figura (A)

Figura (B)

Fonte: produção do próprio autor

Figura 8 – (A) Radiografia da tíbia esquerda de ovino obtida aos 90 dias de pós-operatório. (B) Radiografia da tíbia direita de ovino obtida aos 90 dias de pós-operatório.



Figura A



Figura B

Fonte: produção do próprio autor.

Todos os animais permaneceram em boas condições clínicas e foram eutanasiados de acordo com seus respectivos grupos. A análise macroscópica, realizada no momento de obtenção das tíbias, não demonstrou reação periosteal, necrose ou qualquer comprometimento entre os grupos. A visualização exata dos biomateriais HA, TCP- β e HA/TCP- β não era possível já aos 60 dias e, ainda mais difícil, após 90 dias. O biomaterial HA/Al₂O₃ a 5%, entretanto, era facilmente identificado na cortical medial da tíbia, mesmo após 90 dias de pós-operatório.

Os resultados obtidos mostram boa formação de tecido ósseo aos 60 e 90 dias para os biomateriais hidroxiapatita (HA), tricálcio fosfato - β (TCP- β) e HA/TCP- β , com melhor formação óssea aos 90 dias. O resultado obtido com o nanocompósito HA/Al₂O₃ a 5% demonstrou sinais de rejeição por parte do organismo, como demonstrado nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Resultados médios obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento das lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), formação de tecido mieloide (FTM) e infiltrado inflamatório (INI), dos biomateriais implantados após 60 dias.

	NTO	DFC	PLO	PO	FTM	INI
HA	++	0	++	+	+	0
TCP- β	+++	0	+++	+	+	0
HA/TCP- β	++	0	++	+	++	0
HA/Al ₂ O ₃	0	++	0	++	0	+
Controle	+++	0	+++	++	++	0

Fonte: modificado de Valiati (2011)

Pode-se detectar, aos 60 dias, moderada neoformação de tecido ósseo com a hidroxiapatita e com o composto bifásico HA/TCP- β , enquanto foi observada acentuada formação de tecido ósseo com o TCP- β e o grupo controle. O nanocompósito HA/Al₂O₃ apresentou ínfima formação de tecido ósseo, não sendo digno de nota, e moderada deposição de fibras colágenas. Preenchimento das lacunas osteocíticas foi um parâmetro moderadamente observado com os biomateriais HA e HA/TCP- β e acentuadamente visualizado com o TCP- β e o grupo controle. A presença de osteoclastos foi leve aos 60 dias para três, dos quatro biomateriais pesquisados, sendo moderada apenas para a composição HA/Al₂O₃ e o grupo controle. A formação de tecido mieloide se mostrou moderada nos grupos HA/TCP- β e controle, enquanto esteve levemente presente ou ausente, nos grupos HA e TCP- β , ou HA/Al₂O₃, respectivamente. Infiltrados inflamatórios estiveram ausentes em quase todos os implantes, exceto pelo HA/Al₂O₃, que apresentou leve infiltrado de células inflamatórias já aos sessenta dias.

Tabela 5 – Resultados médios obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento das lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), formação de tecido mieloide (FTM) e infiltrado inflamatório (INI), dos biomateriais implantados após 90 dias.

	NTO	DFC	PLO	PO	FTM	INI
HA	+++	0	+++	++	++	0
TCP- β	++++	+	+++	++	+	0
HA/ TCP- β	+++	0	+++	+++	+++	0
HA/Al ₂ O ₃	0	+++	0	++	0	+++
Controle	++++	0	+++	++	+++	0

Fonte: modificado de Valiati (2011)

Aos 90 dias, foi observada acentuada neoformação de tecido ósseo com os biomateriais HA e HA/TCP- β , e formação muito acentuada com o grupo controle e o TCP- β . Foi detectada leve deposição de fibras colágenas com o TCP- β e acentuada deposição com o nanocompósito HA/Al₂O₃. O nanocompósito, além disso, não pontuou nada nos quesitos neoformação de tecido ósseo, preenchimento das lacunas osteocíticas ou formação de tecido mieloide, apresentando apenas presença moderada de osteoclastos e acentuada infiltração de células inflamatórias. Quanto ao preenchimento das lacunas osteocíticas, os outros três biomateriais, bem como o grupo controle, demonstraram resultado acentuado. A presença de osteoclastos foi moderada para todos os grupos, exceto pelo nanocompósito, e a formação de tecido mieloide se mostrou intensificada para o grupo controle e composto bifásico, em relação à HA e ao TCP- β . Infiltrado inflamatório não esteve presente em nenhum grupo, com exceção da HA/Al₂O₃.

4.1 HIDROXIAPATITA (HA)

Apresentou boa osteointegração e formação de tecido ósseo de boa qualidade, mesmo aos sessenta dias.

4.1.1 60 dias

Pode-se observar boa osteointegração e boa qualidade de tecido ósseo formado, embora ainda se possa notar a presença de uma quantidade significativa de biomaterial. Inspeccionando-se o interior dos grânulos de biomaterial remanescente, foi possível observar uma leve alteração em sua morfologia, sugerindo infiltrado celular, deposição de proteínas e mineralização da superfície do material, em relação ao seu aspecto antes da implantação no tecido vivo (figura 09 A e B).

Figura 9 - (A) Micrografia dos grânulos de HA previamente à deposição no tecido, (B) HA após 60 dias da aplicação no defeito ósseo e (C) HA após 90 dias de implantação. Aumento de 5000x.

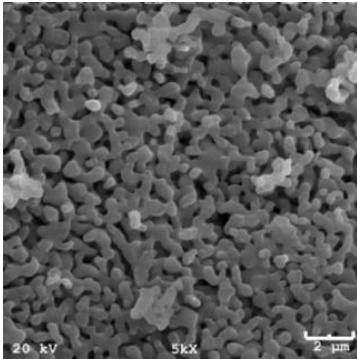


Figura 09 (A)

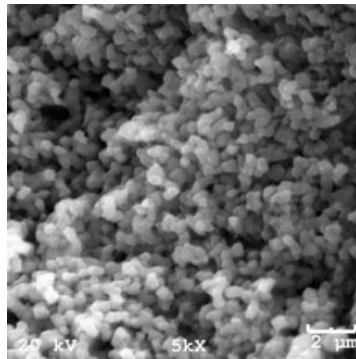


Figura 09 (B)

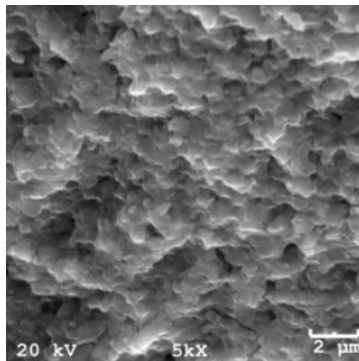


Figura 09 (C)

Fonte: produção do próprio autor

4.1.2 90 dias

Aos 90 dias observou-se uma melhor osteointegração e melhor qualidade de tecido ósseo formado do que o observado aos 60 dias. No interior do grânulo, observa-se uma alteração mais marcante na morfologia do biomaterial, indicando presença mais abundante de prolongamentos celulares, deposição de proteínas e mineralização de superfície (figura 09 C). Presença abundante de células de osteoblastos, indicando intensa proliferação de tecido ósseo (figura 10 A). Pode-se observar uma boa qualidade de interface entre o biomaterial e o tecido ósseo formado ao seu redor (figura 10 B). Ainda observa-se presença de biomaterial remanescente, embora em menor proporção do que aos 60 dias (figura 11).

Figura 10 - (A) Colônia de osteoblastos na superfície do tecido ósseo sendo formado adjacente ao biomaterial implantado (aumento de 2000x) e (B) Região de interface entre biomaterial implantado e tecido ósseo neoformado (aumento de 1000x). Imagens do grupo 90 dias.

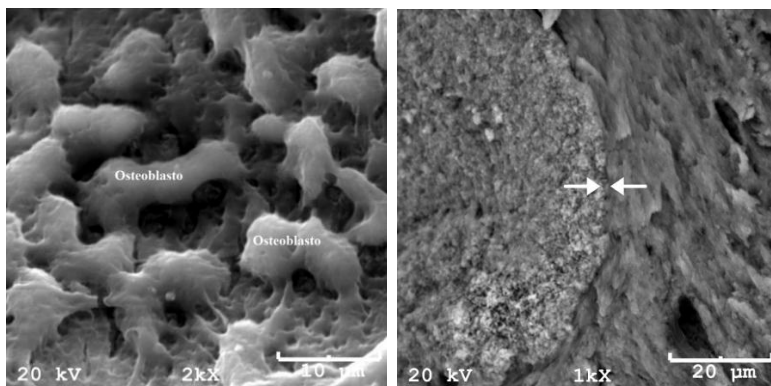


Figura 10 (A)

Figura 10 (B)

Fonte: produção do próprio autor

Figura 11 - (A) Imagens de microscopia óptica demonstrando a osteointegração da hidroxiapatita ao tecido ósseo neoformado. Há inúmeros osteócitos (setas brancas) indicando a presença de tecido ósseo

jovem (H&E objetiva 10x) e (B) grânulos de hidroxiapatita sendo fagocitados por osteoclastos (setas brancas), para posterior substituição por tecido ósseo (H&E aumento 40x). Imagens do grupo 90 dias.

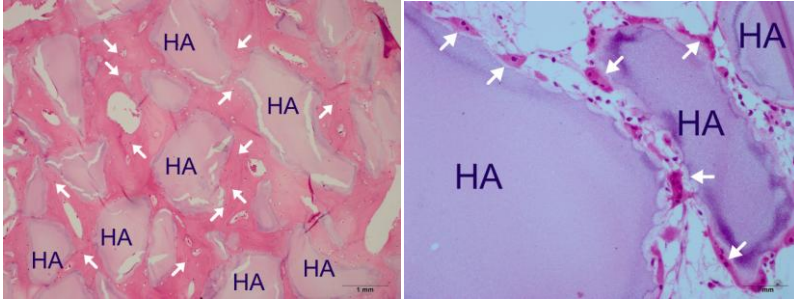


Figura 11 (A)

Figura 11 (B)

Fonte: produção do próprio autor

4.2 TRICÁLCIO FOSFATO – β (TCP- β)

Os estudos realizados com o tricálcio fosfato – β demonstraram boa osteointegração e formação óssea, inclusive no interior do grânulo. Demonstrou ser rapidamente reabsorvido e capaz de predispor à formação de tecido ósseo de boa qualidade.

4.2.1 60 dias

Apresenta boa formação de tecido ósseo, inclusive no interior de seus grânulos. Da mesma forma como foi observado com a hidroxiapatita, pode-se notar alteração na morfologia no interior de seus grânulos. Esta alteração é ainda mais intensa neste biomaterial (figura 12 A e B). Apresenta regiões de interface fortemente aderidas, indicando muito boa osteointegração (figura 13).

Figura 12 - (A) Micrografia do biomaterial microporoso tricálcio fosfato – β previamente à sua deposição em tecido vivo, (B) Aspecto interno do grânulo de TCP- β após 60 dias da implantação em tecido vivo e (C) Aspecto interno do grânulo de TCP- β após 90 dias da implantação em tecido vivo. Aumento 5000x.

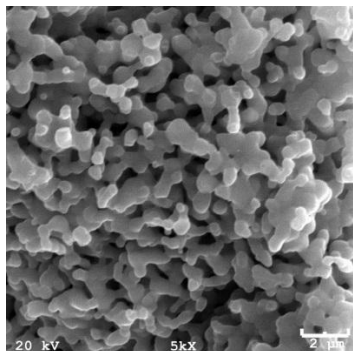


Figura 12 (A)

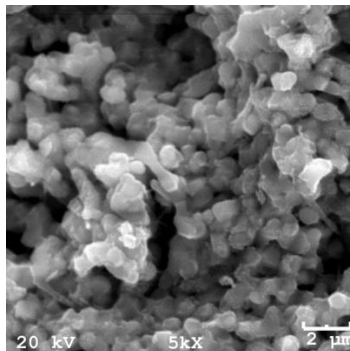


Figura 12 (B)

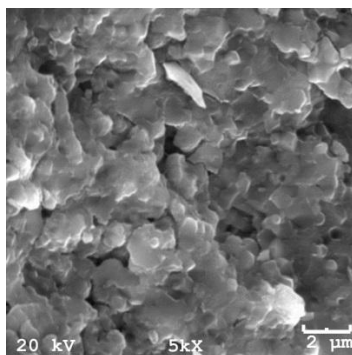


Figura 12 (C)

Fonte: produção do próprio autor

Figura 13 - (A) Micrografia da região de interface entre biomaterial e tecido ósseo neoformado (aumento 500x). Em (B), observa-se formação de tecido ósseo no interior do grânulo. As setas pretas indicam osteócitos formando tecido ósseo. As setas brancas mostram os grânulos altamente porosos de TCP- β , separados pelo tecido ósseo formado (H&E aumento 40x). Grupo de 60 dias.

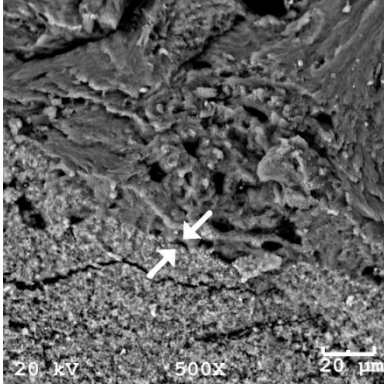


Figura 13 (A)

Fonte: produção do próprio autor

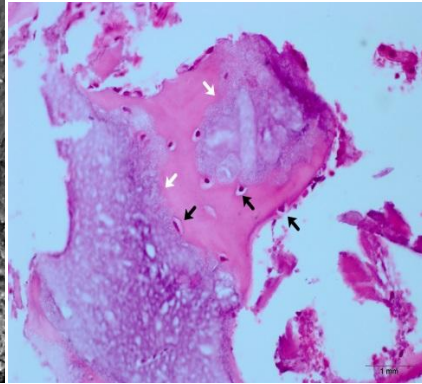


Figura 13 (B)

4.2.2 90 dias

Aos 90 dias se observa tecido ósseo de boa qualidade preenchendo praticamente todo o defeito, com presença de pouco biomaterial remanescente. Nos grânulos restantes, observa-se alteração marcante na morfologia interna (figura 12 C), indicando que, possivelmente, em breve, este fragmento de biomaterial será substituído completamente por tecido ósseo. É observada também a presença marcante de células de linhagem osteoblástica nas superfícies do tecido ósseo em construção (figura 14).

Figura 14 - (A) Osteoblastos na superfície óssea de ovino. Aumento 500x. (B) Formação de tecido ósseo marcante no interior dos grânulos de biomaterial. O grânulo divide-se em vários fragmentos menores, dando espaço ao novo tecido formado. Setas brancas: osteócitos. H&E aumento 40x. Grupo de 90 dias.

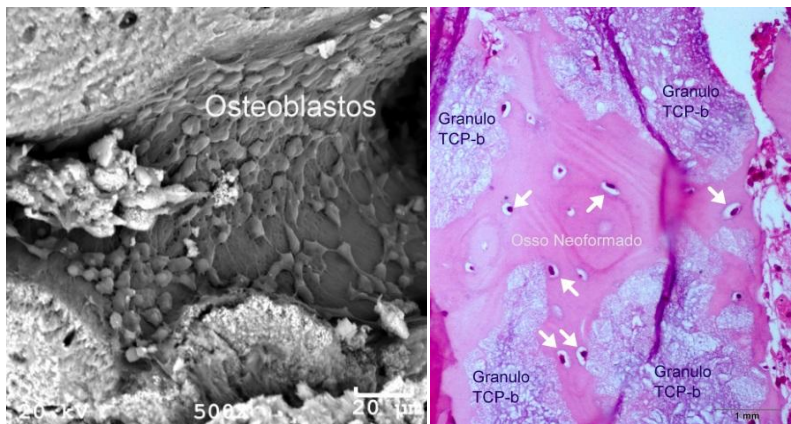


Figura 14 (A)

Figura 14 (B)

Fonte: produção do próprio autor

Por meio da análise visual das avaliações de microscopia eletrônica e microscopia óptica, foi observado que este foi o biomaterial implantado mais rapidamente absorvido. A qualidade do tecido ósseo formado é muito boa.

4.3 HA/TCP- β

O composto bifásico HA/TCP – β (60/40) apresentou bom desempenho de mineralização e de formação óssea. Por ser um composto bifásico de hidroxiapatita e tricálcio fosfato – β , apresenta solubilidade intermediária entre estes dois biomateriais, ou seja, é menos solúvel que o tricálcio fosfato – β , mas solubiliza-se mais depressa do que a hidroxiapatita. Recebe maior número de prolongamentos celulares e deposição de proteínas do que a hidroxiapatita, devido à sua menor densidade. A figura 15 ilustra o interior do grânulo em seu momento

pré-implantação e após 60 e 90 dias da implantação (A, B e C, respectivamente).

Figura 15 - (A) Micrografia do compósito HA/TCP- β previamente à aplicação in vivo. (B) Aspecto interno do grânulo após 60 dias de aplicação in vivo. (C) Aspecto interno do grânulo após 90 dias de implantação. Aumento 5000x.

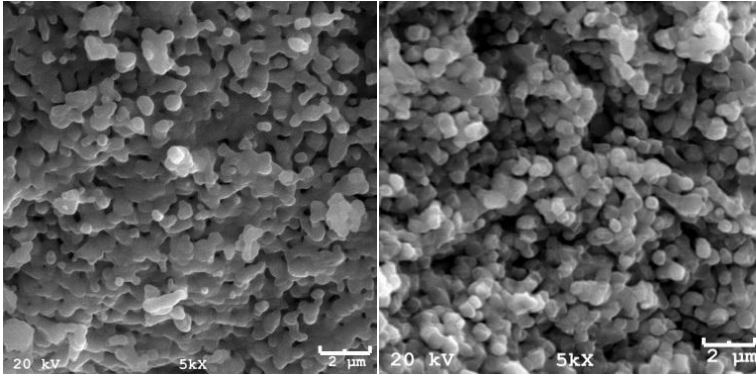


Figura 15 (A)

Figura 15 (B)

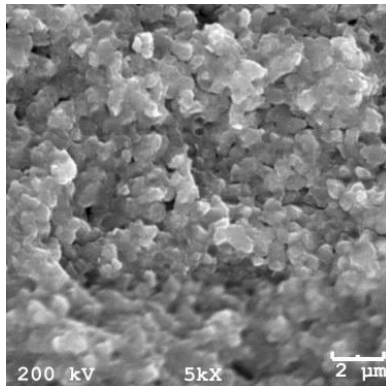


Figura 15 (C)

Fonte: produção do próprio autor

4.3.1 60 dias

Aos 60 dias, pode-se observar neste grupo uma boa osteointegração, bem como formação de tecido ósseo de excelente qualidade (figura 16).

Figura 16 - (A) Grânulo de biomaterial bem ao centro e as regiões de interface entre este e o tecido ósseo adjacente (aumento 100x). (B) Osteoblasto sendo aprisionado pela matriz mineral e dando origem a um osteócito (aumento 3000x). Grupo de 60 dias.

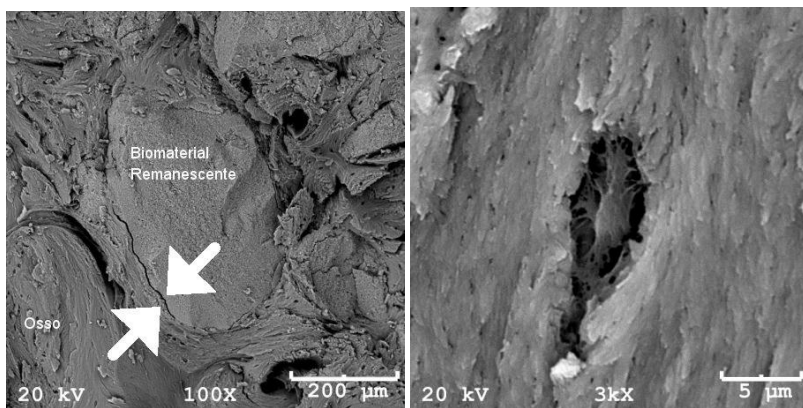


Figura 16 (A)

Figura 16 (B)

Fonte: produção do próprio autor

4.3.2 90 dias

Aos 90 dias, observa-se um tecido ósseo maduro, com a presença de canais de Havers e Volkmann, além de vasos sanguíneos, essenciais ao processo de cicatrização óssea, e colônias de osteoblastos. Neste momento, ainda se observa quantidade significativa de biomaterial, demonstrando que sua reabsorção não é rápida como ocorre com o TCP- β . Entretanto, a qualidade do tecido ósseo formado é superior àquela observada com a hidroxiapatita isolada (figuras 17 e 18).

Figura 17 - (A) Grânulo de biomaterial remanescente, envolvido por tecido ósseo neoformado de muito boa qualidade (aumento 200x). (B) Presença de osteoblastos em uma dada superfície óssea, que parece estar dando origem a um canal de Havers (aumento 500x). Grupo de 90 dias.

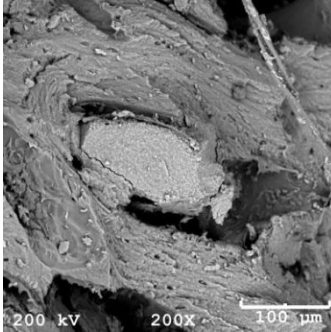


Figura 17 (A)

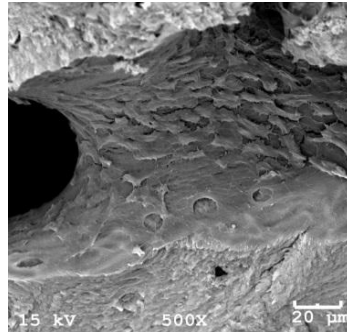


Figura 17 (B)

Fonte: produção do próprio autor

Figura 18 - (A) Imagem de microscopia óptica com o biomaterial composto HA/TCP- β após 90 dias de implante. Há neoformação óssea, com presença de lamelas concêntricas e abundante quantidade de osteócitos (setas pretas); biomaterial remanescente (setas brancas) e osteoblastos na superfície do tecido ósseo (setas azuis), H&E aumento 40x. (B) Visão geral de um corte histológico do mesmo material. Grande quantidade do biomaterial remanescente, entremeados por tecido ósseo maduro, H&E aumento 10x. Grupo 90 dias.

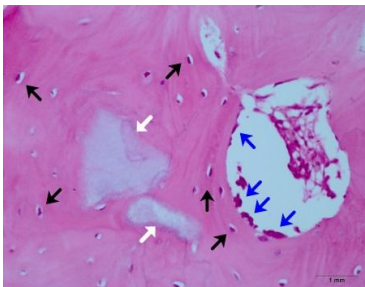


Figura 18 (A)

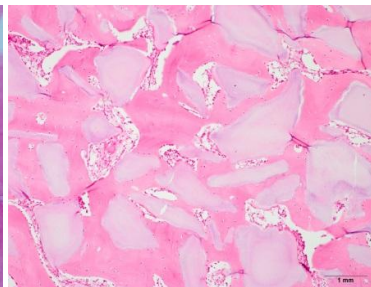


Figura 18 (B)

Fonte: produção do próprio autor

4.4 HA/Al₂O₃ a 5%

O nanocompósito HA/Al₂O₃ a 5%, um composto à base de hidroxiapatita microporosa e alumina nanoestruturada, não apresentou um resultado favorável neste estudo. Observou-se uma intensa proliferação de células fagocitárias e tecido fibroso no lugar do tecido ósseo formado nos outros biomateriais estudados. A figura 19 A, B e C demonstra as alterações ocorridas na morfologia interna do grânulo do biomaterial HA/Al₂O₃ a 5%.

Figura 19 - (A) Morfologia interna dos grânulos de HA/Al₂O₃ a 5% previamente à implantação in vivo. (B) Morfologia interna dos grânulos após 60 dias de implantação in vivo. (C) Morfologia interna dos grânulos após 90 dias da implantação. Houve mínima alteração na morfologia interna com este material; o que pode ser observado é a presença de filamentos de fibrina após os 60 dias da implantação. Aumento de 5000x.

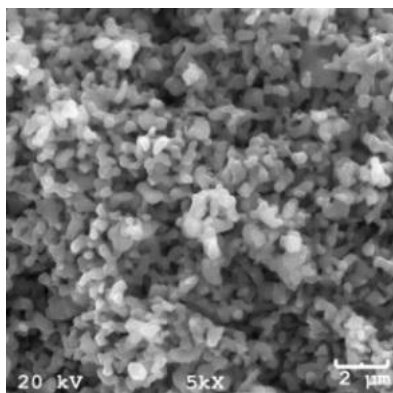


Figura 19 (A)

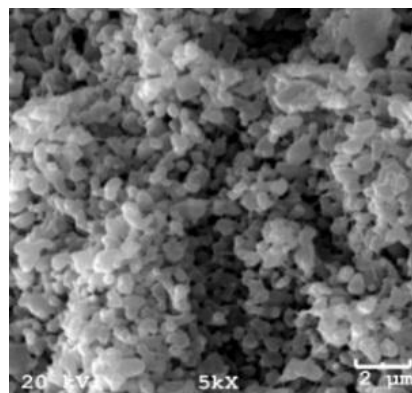


Figura 19 (B)

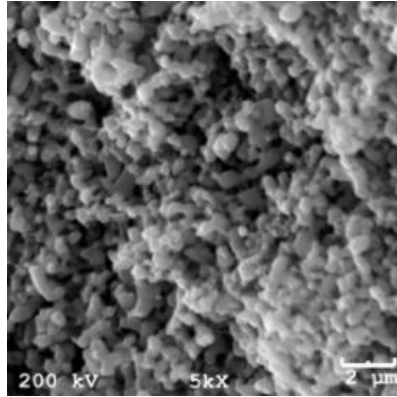


Figura 19 (C)

Fonte: produção do próprio autor

4.4.1 60 dias

Os grânulos do biomaterial implantado foram envolvidos por tecido fibroso (figura 20) e pode-se observar a proliferação de células fagocitárias (macrófagos) ao seu redor (figura 21).

Figura 20 - (A) Grânulos do biomaterial HA/Al₂O₃ a 5% (setas brancas) envolvidos por tecido fibrocolagenoso (aumento 200x). (B) Tecido fibroso desorganizado circundando o material, aonde esperava-se encontrar tecido ósseo bem formado (aumento 500x). Grupo 60 dias.

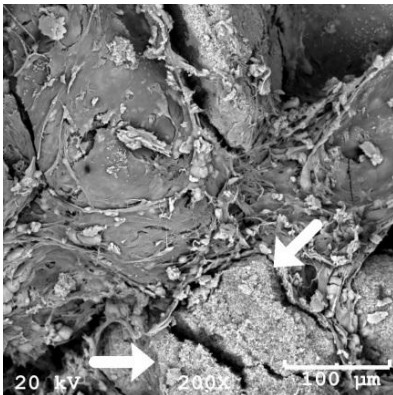


Figura 20 (A)

Fonte: produção do próprio autor

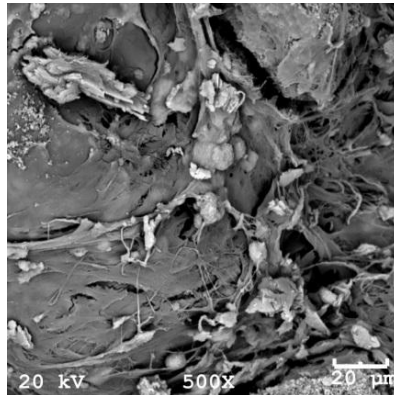
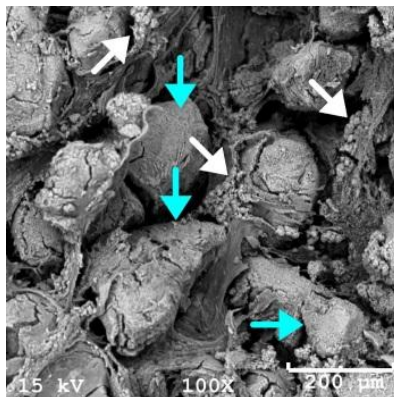


Figura 20 (B)

Figura 21 - Colônias pequenas de células fagocitárias (setas brancas) entremeadas no tecido fibroso que circunda o biomaterial (setas azuis). Aumento 100x. Grupo 60 dias.

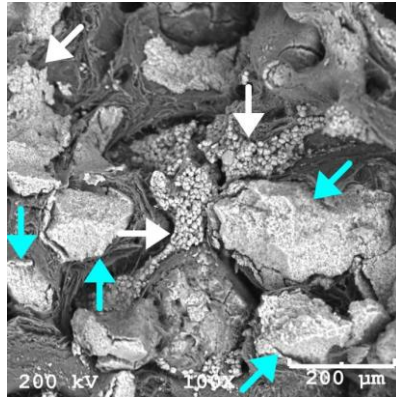


Fonte: produção do próprio autor

4.4.2 90 dias

Aos 90 dias não se observa uma alteração marcante no cenário da implantação, exceto pela maior quantidade de células de linhagem fagocitária (figuras 22 e 23). Não ocorre redução marcante na presença de biomaterial, contudo, observa-se na microscopia eletrônica inúmeros fragmentos menores dos grânulos, como possível resultado do processo de fagocitose pelas células de defesa do hospedeiro.

Figura 22 - Visão geral aos 90 dias após implantação do nanocompósito HA/Al₂O₃ a 5%. Presença de colônias maiores de células de linhagem fagocitária (setas brancas) e presença consistente de material remanescente (setas azuis), bem como de tecido fibroso intergranular. Aumento 100x.



Fonte: produção do próprio autor

Figura 23 - (A) Imagens histológicas de grânulos de HA/Al₂O₃ a 5% circundados por macrófagos. Há tecido fibroso adjacente às células (H&E aumento 40x). (B) Observa-se intensa formação de tecido fibroso e macrófagos repletos por biomaterial fagocitado, com pigmentação escura no citoplasma celular (setas pretas). H&E aumento 40x.

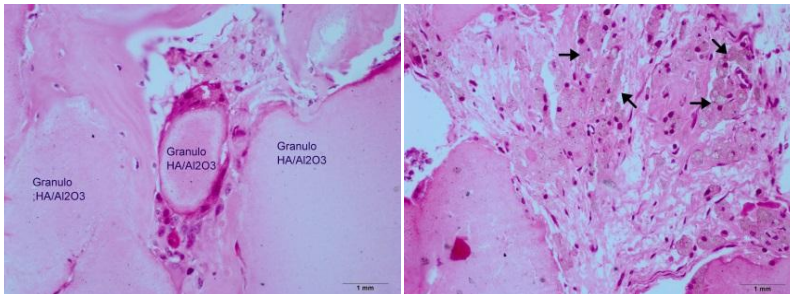


Figura 23 (A)

Figura 23 (B)

Fonte: produção do próprio autor

4.5 CONTROLE

Os defeitos que receberam o autoenxerto apresentaram rápida osteointegração ao osso cortical adjacente, sendo difícil, já aos 60 dias, identificar a região de interface entre o fragmento transplantado e o osso remanescente (figuras 24 e 25).

Figura 24 - Imagens de tecido ósseo maduro na região implantada com autoenxerto. (A) Aumento 100x. (B) Aumento 200x. Grupo de 60 dias.

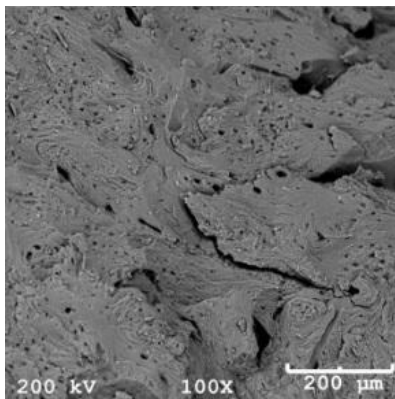


Figura 24 (A)

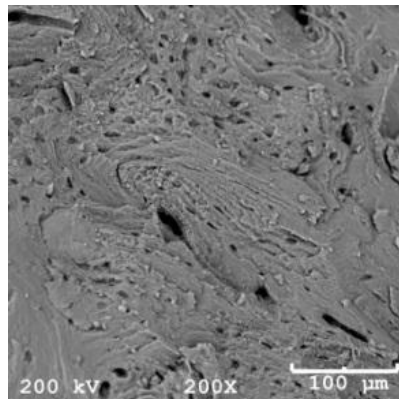
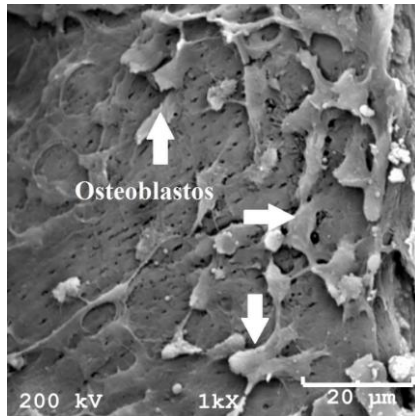


Figura 24 (B)

Fonte: produção do próprio autor

Figura 25 - Osteoblastos formando novo tecido ósseo onde foi realizado autoenxerto (aumento 1000x). Grupo 60 dias.



Fonte: produção do próprio autor

5 DISCUSSÃO

Diversos estudos relacionados à ortopedia têm sido realizados utilizando-se ovinos como modelo experimental, devido ao seu tamanho apropriado, rusticidade e docilidade, facilitando o procedimento cirúrgico, manejo e avaliação pós-operatória (WILLIE et al., 2004; SHELTON et al., 2011). Por serem animais de produção, a eutanásia ao final do experimento não se mostra um impasse mediante os comitês de ética e bem-estar animal, desde que seja respeitada a Resolução do CFMV nº1000/2012, de 11 de maio de 2012 para a realização do procedimento.

Para a implantação dos biomateriais analisados, foi necessária a criação de três áreas de 6mm. Estes defeitos foram realizados com o auxílio de brocas e trefinas de 6mm de diâmetro, para posterior preenchimento com biomateriais ou fragmento ósseo, respectivamente. No momento da perfuração, o tecido ósseo foi irrigado com solução salina estéril resfriada para prevenir o desenvolvimento de lesões térmicas. A escolha da tíbia se deu por ser um osso longo e de fácil acesso, comumente utilizado para experimentação de procedimentos ortopédicos em ovinos (DIAS et al., 2007; SILVA, 2011). As radiografias obtidas durante o estudo tiveram o objetivo de excluir qualquer enfermidade pré-existente ou complicação pós-operatória capaz de interferir na interpretação dos resultados. Todas indicaram um processo de cicatrização normal, sem reação inflamatória, fraturas, ou qualquer complicação capaz de comprometer a pesquisa. Este método de avaliação se mostrou eficaz como controle, embora não tenha capacidade de diferenciar o comportamento *in vivo* dos diferentes biomateriais.

A hidroxiapatita é o constituinte mineral natural encontrado no osso representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes (COSTA, 2009). Os biomateriais empregados neste estudo foram obtidos pelo método de síntese via úmida, e foi demonstrado por Fulmer et al. (1992), que a hidroxiapatita obtida por este método possui características similares às do tecido ósseo e dentário, diferentemente da hidroxiapatita sintetizada à altas temperaturas. Aos 60 dias, a HA demonstrou moderado preenchimento de lacunas osteocíticas e neoformação de tecido ósseo, e leve presença de osteoclastos e formação de tecido mieloide, indicando boa osteoindução e boa

capacidade osteorregenerativa. Não foi observada deposição de fibras colágenas ou presença de infiltrado inflamatório, demonstrando claramente sua biocompatibilidade. Aos 90 dias estes resultados se mostraram mais evidentes, apresentando acentuada neoformação de tecido ósseo, com evidente preenchimento de lacunas osteocíticas, diferindo dos resultados observados por Cho et al. (2011). Este autor relatou ter observado deposição de tecido fibroso sobre os grânulos do biomaterial, lenta reabsorção pelo organismo e baixa capacidade de formação óssea, o que não corresponde aos resultados obtidos no presente estudo, que demonstrou uma boa capacidade osteoindutiva e osteocondutiva, além de não ser notado nenhum sinal de rejeição tecidual com deposição de tecido fibroso. Esta divergência pode estar associada à diferença entre os tamanhos dos grânulos, que no estudo de Cho et al. (2011), variavam entre 212 a 1000 μm , e no atual se restringiam a uma faixa entre 200 e 500 μm , com presença significativa de microporosidades.

Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que fosfatos de cálcio porosos nanoestruturados apresentam maior bioatividade, especialmente maior osteoindutividade do que os convencionais, sugerindo que quanto menores forem os grânulos e mais porosidades tiverem, melhor será sua atividade na neoformação óssea (HONG et al., 2010).

O tricálcio fosfato – β demonstrou, aos 60 dias, uma acentuada neoformação óssea, e preenchimento de lacunas osteocíticas, além de uma leve presença de osteoclastos e formação de tecido mieloide. Isso demonstra que sua osteoindução não é tão acentuada quanto a da hidroxiapatita, entretanto, possivelmente devido à sua rápida solubilização e conseqüente liberação de íons cálcio e fosfato, ocorre reparação óssea de modo rápido e significativo. Aos 90 dias, a formação já foi considerada muito acentuada. Apesar de apresentar uma leve deposição de fibras colágenas aos 90 dias, não se sugere que o TCP- β seja menos biocompatível. Presume-se que esta deposição ocorra em função da alta porosidade do biomaterial, que permite uma acentuada agregação de prolongamentos celulares e proteínas diversas no interior do grânulo, como etapa normal do processo de cicatrização. Estudos recentes, que avaliaram o uso do tricálcio fosfato – β como substituto ósseo revelaram melhores resultados para formação óssea e na velocidade de degradação, do que aqueles obtidos com a hidroxiapatita (PERERA et al., 2010; YE et al., 2012), corroborando com os resultados obtidos no presente estudo.

Kondo et al. (2006), implantaram blocos de TCP- β no músculo paravertebral de cadelas da raça Beagle, e observaram formação óssea após 56 dias em quatro de cinco animais, o que condiz com o resultado da presente pesquisa, em que foi observada boa formação de tecido ósseo já no grupo de 60 dias.

A porosidade do TCP- β varia entre 46,07 e 54,44%. Densidade e porosidade são características inversamente relacionadas, ou seja, quando a porosidade aumenta, a densidade, normalmente, diminui, e vice-versa (SANTOS et al., 2012). A sua alta porosidade explica a formação de tecido ósseo no interior dos grânulos de TCP- β , como foi observado neste trabalho, inclusive alterando significativamente sua morfologia interna. Além da composição química, a estrutura porosa facilita o processo de reparação óssea por um implante ósseo (HING et al., 1999). A porosidade é, em geral, baseada na presença de poros abertos, que estão relacionados às propriedades como permeabilidade e área de superfície da estrutura porosa (KIM et al., 2012). No presente estudo foi observada leve deposição de fibras colágenas em um animal do grupo de 90 dias, o que não demonstra um sinal de rejeição ao implante, devido à presença de células de linhagem osteoblástica e a intensa formação de tecido ósseo com este biomaterial. Estudos *in vitro* demonstraram adesão e proliferação celular ao redor dos implantes de TCP- β em 24, 48 e 72 horas, além de verificar ausência de citotoxicidade aguda (SANTOS et al., 2012).

A alta absorção do TCP- β , com liberação rápida de íons cálcio e fosfato quando em meio fisiológico, entretanto, não se mostra somente benéfica. Esta rápida dissolução reduz drasticamente a área de superfície disponível para proliferação de células ósseas e, portanto, limita sua aplicação clínica (YAMADA et al., 1997). Daculsi et al. (1990), já descreviam a utilização de compostos bifásicos com 60% de hidroxiapatita e 40% de tricálcio fosfato- β para uso clínico, associando boa solubilidade com maior resistência mecânica.

A composição bifásica apresentou moderado preenchimento de lacunas osteocíticas e moderada formação de tecido mieloide e neoformação óssea aos 60 dias. Não houve deposição de fibras colágenas ou infiltrado inflamatório durante o período deste estudo, possivelmente porque sua porosidade é menor do que aquela observada no TCP- β . A capacidade osteorregenerativa e osteoindutiva se mostrou acentuada aos 90 dias, sugerindo que apresenta boa bioatividade,

embora com solubilidade mais lenta em relação ao TCP- β , o que pode ser uma boa alternativa, segundo YAMADA et al. (1997) e DACULSI et al. (1990).

Foi verificado, neste estudo, uma lenta reabsorção deste material quando comparado ao TCP- β isolado, porém uma rápida formação de tecido ósseo de boa qualidade. Segundo trabalhos recentes, a força mecânica fornecida pela hidroxiapatita, pode ser benéfica a longo prazo, dependendo da aplicação a que este material esteja destinado. Até o presente momento, o composto bifásico 60% HA/40% TCP- β , é o melhor material conhecido, pois sua capacidade alia a rápida solubilidade do TCP- β à superior biocompatibilidade da HA (KIM et al., 2012).

Huang et al. (2010), compararam a implantação de uma apresentação comercial do composto bifásico HA/TCP- β 60:40 com um grupo controle (sem preenchimento) em defeitos criados no osso alveolar de cães da raça Beagle e os resultados obtidos demonstraram uma taxa de neoformação óssea de 49,5% com o composto bifásico após 5 semanas de implantação, enquanto nenhuma formação foi observada no grupo controle no mesmo período; oito semanas após a implantação, havia 68,1% de formação óssea com o biomaterial e 18,9% no grupo controle e, após 10 semanas, observou-se uma formação óssea de 74,5% e 40,2%, com o HA/TCP- β 60:40 e o grupo controle, respectivamente. O grupo controle, na presente pesquisa, apresentou o melhor resultado, como era esperado, mas diferiu do trabalho de Huang et al. (2010), pois neste caso houve preenchimento do defeito criado com um fragmento ósseo do próprio paciente (autoenxerto). Este resultado já era esperado pelos autores do presente trabalho, visto que esta técnica ainda é considerada padrão-ouro na substituição óssea; o objetivo, portanto, é encontrar um biomaterial capaz de substituir este método, dadas as suas desvantagens, como necessidade de procedimento cirúrgico adicional e maior risco de morbidade da área doadora. A remodelação óssea foi muito rápida neste grupo, visto que já aos 60 dias foi praticamente impossível identificar as linhas de interface entre osso cortical e fragmento implantado. Com base nos resultados encontrados por este trabalho, a composição bifásica HA/TCP- β 60/40 é uma opção segura e viável para grande parte dos autoenxertos, sendo o que melhor se aproximou do grupo controle.

Compostos de hidroxiapatita e outras cerâmicas, tais como alumina e zircônia, podem combinar a biocompatibilidade da hidroxiapatita à vantagens mecânicas dos materiais complementares (BAŞAR et al., 2011). Embora a alumina seja bioinerte e conhecida por sua força

química e mecânica, ela não forma ligações bioquímicas com o tecido (YELTEN et al., 2012). No presente estudo, porém, os resultados encontrados com esta cerâmica não foram satisfatórios.

Yelten et al. (2012), relataram que a α -alumina, a única fase estável deste material, é obtida a 1250-1300°C. Em temperaturas mais baixas, são produzidas outras fases da alumina, tais como γ -Al₂O₃, δ -Al₂O₃, θ -Al₂O₃, as quais são amorfas e instáveis. O composto HA/Al₂O₃- α utilizado na atual pesquisa foi sinterizado à 1100°C, entretanto, sabe-se que estes compostos podem apresentar tensões residuais termoelásticas na interface de grãos quando sinterizados a temperaturas abaixo de 1200°C. Essas tensões são geradas durante o processo de sinterização e resfriamento do biomaterial, podendo levar ao surgimento de microtrincas ou mesmo à degradação total do biomaterial (BARRALET et al., 2000; BELLINI, 2007; CORRÊA, 2013). As tensões residuais termoelásticas de origem térmica ou mecânica conduzem a uma excitação atômica na superfície dos grãos, o que pode inibir a proliferação celular na superfície do material, além de desencadear um processo de necrose inicial, posteriormente favorecendo a deposição de tecido fibroso na interface do biomaterial (SANTOS, 2009; CORRÊA, 2013). A consequência disso pode ter sido os efeitos presenciados nesta pesquisa, com reação do organismo a um corpo estranho e tentativa das células de defesa em remover o biomaterial, visto que foi presenciada em todos os animais avaliados, com menor intensidade no grupo de 60 dias e maior atividade nos animais do grupo de 90 dias, por meio da deposição de fibras colágenas e infiltrado inflamatório, que variou de moderado a acentuado entre os tempos avaliados neste trabalho. Başar et al. (2011), investigaram a biocompatibilidade *in vitro* de um nanocompósito de hidroxiapatita e alumina associados ao fluoreto de cálcio (CaF₂), sinterizados a 1100°C, e detectaram uma redução no volume de células do cultivo, quando comparado àquele obtido com a HA pura, sugerindo mais estudos antes de sua aplicação biomédica.

Estes resultados não são suficientes para afirmar que a alumina não se comporta bem *in vivo*, dada à vasta literatura que a recomenda. Santos et al. (2009), avaliaram as propriedades mecânicas e a citotoxicidade de biocerâmicas à base de zircônia enriquecida com alumina e verificaram que o material não é citotóxico e apresenta grande potencial para aplicação como implantes. Sugere-se, portanto, novos

estudos com alteração no método de produção deste composto, com o intuito de, realmente, avaliar o comportamento da HA/Al₂O₃ in vivo.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se com este trabalho que a hidroxiapatita, o tricálcio fosfato- β e a associação HA/TCP- β (60/40) apresentam boa capacidade de reparação óssea, podendo ser utilizados como substitutos ósseos; a associação HA/TCP- β é superior aos demais por apresentar velocidade de absorção intermediária em relação à HA e ao TCP- β isolados, fornecendo ainda uma sustentação adequada ao tecido neoformado; o biomaterial HA/Al₂O₃ a 5% se mostrou incompatível, provocando reação de rejeição por parte do hospedeiro e com insignificante formação de tecido ósseo. Sugerem-se novas pesquisas acerca deste material.

REFERÊNCIAS

- ARINZEH, T. L.; et al. Allogenic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical size canine segmental defect. **Journal of Bone and Joint Surgery American**. v.85-A, n.10, p.1927-1935, 2003.
- BAROTH, S.; DACULSI, G. Biological Effect of Calcium Phosphate Bioceramics Microstructure. **Bioceramics Development and Applications**. v.1, n.1, p.1-3, 2011.
- BARRALET, J. E.; BEST, S. M.; BONFIELD, W. Effect of sintering parameters on the density and microstructure of carbonate hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v.11, n.11, p.719-724, 2000.
- BAŞAR, B.; et al. Synthesis, phase transitions and cellular biocompatibility of nanophase alumina–hydroxyapatite composites. **Advances in Applied Ceramics**. v.110, n.4, p.238-243, 2011.
- BELLINI, O. J. **Síntese e caracterização de uma matriz óssea de fosfato de cálcio e nanocompósitos fosfato de cálcio/SiO₂-alfa para substituição e regeneração óssea**. 2007. 97f. Dissertação (Mestrado)-Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville.
- BOSTROM, M. P.; SEIGERMAN, D.A. The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study. **HSS Journal**. v.1, n.1, p.9-18, 2005.
- BURG, K. J.; PORTER, S.; KELLAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**. v.21. n.23, p.2347-2359, 2000.

BURSTEIN, F. D.; et al. The use of porous granular hydroxyapatite in secondary orbitocranial reconstruction. **Plastic & Reconstructive Surgery**. v.100, n.4, p.869-874, 1997.

CAMARGO, N. H. A.; LIMA, S. A.; GEMELLI, E. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite/TiO₂n Nanocomposites for Bone Tissue Regeneration. **American Journal of Biomedical Engineering**. v.2, n.2, p.41-47, 2012.

CHO, J. S.; CHUNG, C.; RHEE, S. Bioactivity and Osteoconductivity of Biphasic Calcium Phosphates. **Bioceramics Development and Applications**. v.1, n.1, p.1-3, 2011.

CHOW, L. C. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. **Dental Material Journal**. v. 28, n.1, p.1-10, 2009.

CLOKIE, C. M. L.; et al. Closure of critical size defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. **Journal of Craniofacial Surgery**. v.13, n.1, p.111-121, 2002.

CONSTANTINO, P.D.; et al. Experimental hydroxyapatite cement cranioplasty. **Plastic & Reconstructive Surgery**. v.90, n.2, p.174-185, 1992.

CORRÊA, P. **Síntese e caracterização de nanocompósitos HA/Al₂O₃- α sol-gel para aplicações na reconstrução óssea**. 2013. 106f. Dissertação (Mestrado)- Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville.

COSTA, A. C. F. M.; et al. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v.4, n.3, p.29-38, 2009.

CROCI, A. T.; et al. Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de

formação óssea. Estudo experimental. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.11, n.4, 2003.

DACULSI, G. Biphasic Calcium Phosphate Concept Applied to Artificial Bone, Implant Coating and Injectable Bone Substitute. **Biomaterials**. v.19, n.16, p.1473-1478, 1998.

DACULSI, G.; et al. Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study. **Journal of Biomedical Materials Research**. v.24, n.3, p.379-396, 1990.

DALMÔNICO, G. M. L. **Síntese e caracterização de fosfato de cálcio e hidroxiapatita: elaboração de composições bifásicas HA/TCP- β para aplicações biomédicas**. 2011. 101f. Dissertação (Mestrado)-Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). In: **Microscopia Eletrônica de Varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Edipucrs, Porto Alegre, 1.ed., cap.1, p. 9-26, 2007.

DIAS, M. I.; et al. O efeito da quantidade do enxerto de osso esponjoso autólogo utilizado na regeneração óssea num modelo experimental de osteotomia da tibia. **Acta Médica Portuguesa**. v.20, n.1, p.37-46, 2007.

DOROZHKIN, S. Calcium orthophosphates. **Journal of Materials Science**. v.42, n.4, p.1061-1095, 2007.

DUCHEYNE, P., RADIN, S., KING, L. The Effect of Calcium Phosphate Ceramic Composition and Structure on in vitro Behavior. **J. Biomed. Mater. Res**. v.27, p.25-34, 1993.

FOSSUM, T. W.; et al. Tratamento de Fraturas Específicas. In: **Cirurgia de Pequenos Animais**. Elsevier, São Paulo, 3.ed., cap.32, p.1015-1142, 2008.

FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. Formation of calcium deficient hydroxyapatite at near-physiological temperature. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v.3, n.4, p. 299-305, 1992.

HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**. v.74, n.7, p.1487-1510, 1991.

HING, K. A.; BEST, S. M.; BONFIELD, W. Characterization of porous hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v.10, n.3, p.135-145, 1999.

HONG, Y.; et al. Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphates nanoceramics. **Materials Science and Engineering R**. v.70, n.3-6, p.225-242, 2010.

HÖNIG, J. F., MERTEN, H. A. Subperiosteal versus epiperiosteal forehead augmentation with hydroxylapatite for aesthetic facial contouring: experimental animal investigation and clinical application. **Aesthetic Plastic Surgery**. v.17, n.2, p.93-98, 1993.

HÖNIG, J.F., MERTEN, H.A., WILTFANG, J. Significance of the periosteum in onlay craniofacial augmentation. **Journal of Craniofacial Surgery**. v.9, n.3, p.260-266, 1998.

HUANG, M.; et al. In vivo evaluation of poorly crystalline hydroxyapatite-based biphasic calcium phosphate bone substitutes for treating dental bony defects. **Journal of Dental Sciences**. v.5, n.2, p.100-108, 2010.

ISOLA, J. G. M. P. Estrutura e regeneração óssea – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v.9, n.18, p.1-12, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: **Histologia básica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 10.ed, cap. 8 p.136-148, 2004.

KAMITAKAHARA, M.; OHTSUKI, C.; MIYASAKI, T. Review Paper: Behavior of Ceramic Biomaterials Derived from Tricalcium Phosphate in Physiological Condition. **Journal of Biomaterials Applications**. v.23, p.197-212, 2008.

KIM, T.; et al. In situ formation of biphasic calcium phosphates and their biological performance in vivo. **Ceramics International**. v.38, n.3, p.1965-1974, 2012.

KONDO, N.; et al. Osteoinduction with highly purified β -tricalcium phosphate in dog dorsal muscles and the proliferation of osteoclasts before heterotopic bone formation. **Biomaterials**. v.27, n.25, p.4419-4427, 2006.

LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. n.1, p.81-98, 2002.

MARTINEZ, A.S.; WALKER, T. Bone grafts. **Veterinary Clinics of North America**. v.29, p.1207-1209, 1999.

MELLONIG, J.T. Porous particulate hydroxyapatite in a human periodontal osseous defect: a case report. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**. v.11, n.3, p.217-223, 1991.

MOORE, W.R.; GRAVES, S.E.; BAIN, G.I. Synthetic bone graft substitutes. **ANZ Journal of Surgery**. v.71, n.6, p.354-361, 2001.

MORAES, P. C. **O uso do ultrassom pulsado de baixa intensidade em falhas ósseas produzidas experimentalmente em rádio de coelhos, preenchidas ou não com cimento de fosfato de cálcio**. 2006. 44f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

NOBLE, B. S. The osteocyte lineage. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 473, n. 2, p. 106-111, 2008.

OKAZAKI, A.; et al. Osseous tissue reaction around hydroxyapatite block implanted into proximal metaphysis of tibia of rat with collagen-induced arthritis. **Biomaterials**. v.21, n.5, p.483-487, 2000.

ONO, I; et al. A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein. **Plastic & Reconstructive Surgery**. v. 90, n.5, p. 870-879, 1992.

ONO, I.; et al. Treatment of extensive cranial bone defects using computer-designed hydroxyapatite ceramics and periosteal flaps. **Plastic & Reconstructive Surgery**. v.92, n. 5, p. 819-830, 1993.

OONISHI, H. Orthopaedic applications of hydroxyapatite. **Biomaterials**. v. 12, n.2, p. 171-178, 1991.

PELLISSIER, P. H.; et al. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and cold stimulate bone regeneration. **Journal of Orthopaedic Research**. v.22, p.73-79, 2004.

PERERA, F. H.; et al. Clarifying the effect of sintering conditions on the microstructure and mechanical properties of β -tricalcium phosphate. **Ceramics International**. v. 36, n.6, p. 1929-1935, 2010.

PIERMATEI, D. L.; JOHNSON, K. A. Approach to the proximal tibia through a medial incision. In: **An atlas of Surgical Approaches to the bones and joints of the dog and cat**. Philadelphia, 4.ed., cap. 82, p.367-369, 2004.

PINHEIRO, A.; et al. Bone repair following bone grafting hydroxyapatite guided bone regeneration and infra-red laser photobiomodulation: a histological study in a rodent model. **Lasers in Medical Science**. v.24, n.2, p. 234-240, 2009.

PROPHET, E. B.; et al. **Laboratory methods in histotechnology. Armed Forced Institute of Pathology**. American Registry of Pathology, Washington. 279p, 1992.

RABELO NETO, J. S. **Hidroxiapatita Sintética Nanoestruturada e Esmalte Dental Aquecidos e Irradiados por Laser de Er,Cr:Ysgg. Caracterização por Ftir e por DRX**. 2009. 120f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

ROQUE-RODRIGUEZ, A. I.; BARALDI-ARTONI, S. M.; OLIVEIRA, D. Implante de biomateriais e a consolidação óssea em cadelas submetidas à ovariossalpingo-histerectomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61, n.5, p.1054-1061, 2009.

SANTOS, C.; et al. Mechanical properties and cytotoxicity of 3Y-TZP bioceramics reinforced with Al₂O₃ particles. **Ceramics International**. v.35, n.2, p. 709-718, 2009.

SANTOS, C. F. L.; et al. Design and production of sintered β -tricalcium phosphate 3D scaffolds for bone tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**. v.32, n.5, p.1293-1298, 2012.

SANTOS, R. B. M. **Síntese e caracterização de pós nanoestruturados de fosfatos de cálcio e nanocompósitos hidroxiapatita/sílica-gel.**

2009. 95f. Dissertação (Mestrado)- Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville.

SCHMAEDECKE, A.; et al. Tratamento cirúrgico de união retardada e não união de fratura em cães: revisão de literatura. **Educação Continuada CRMV-SP.** v.6, n.1, p.74-82, 2003.

SHELTON, T. J.; et al. Percutaneous osseointegrated prostheses for amputees: Limb compensation in a 12-month ovine model. **Journal of Biomechanics.** v.44, n.15, p.2601-2606, 2011.

SHIRANE, H. Y.; et al. Implantes de biomateriais em falha óssea produzida na fibula de ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia.** v.45, n.5, p.478-482, 2010.

SILVA, D. F. **Síntese e caracterização de biomateriais de fosfato de cálcio a partir de conchas calcárias fossilizadas.** 2012. 124f.

Dissertação (Mestrado)- Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville.

SILVA, R. B. **Desvitalização extracorpórea de autoenxerto ósseo cortical com nitrogênio líquido – estudo experimental em tibia de ovelhas.** 2011. 53f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SOUSA, V. L. **Efeitos do ultrassom de baixa intensidade sobre a consolidação óssea em fratura de ossos longos (rádio e ulna, tibia e fibula) em cães (*Canis familiaris*).** 2003. 127f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SOUZA, J. C. P. **Estudo e Caracterização de pós nanoestruturados de fosfato de cálcio e nanocompósitos de fosfato de cálcio/ Al_2O_3 - α**

sol-gel para aplicações biomédicas. 2009. 102f. Dissertação (Mestrado)- Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville.

STEIN, R. S.; SILVA, J. B.; SILVA, V. D. Estudo comparativo da neoformação óssea utilizando-se o enxerto autógeno e três substitutos: defeitos ósseos em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia.** v.44, n.4, p.330-335, 2009.

STURM, S.; et al. On stiffness of scaffolds for bone tissue engineering — a numerical study. **Journal of Biomechanics.** v.43, n.9, p.1738-1744, 2010.

THOMSON, R. C.; et al. Hydroxyapatite fiber reinforced poly (alpha-hydroxy ester) foams for bone regeneration. **Biomaterials.** v.19, n.21, p. 1935-1943, 1998.

VALIATI, R. **Análise do efeito da laserterapia na incorporação de aloenxertos ósseos em blocos processados por congelamento profundo – estudo em coelhos.** 2011. 124f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

WILLIAMS, D. F.; Definitions in Biomaterials. **Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters.** v.26, n.9, p. 381-416, 1987.

WILLIE, B. M.; et al. Determining relevance of a weight-bearing ovine model for bone ingrowth assessment. **Journal of Biomedical Materials Research Part A.** v.69A, n.3, p.567-576, 2004.

YAMADA, S.; et al. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios. **Biomaterials.** v.18, n.15, p.1037-1041, 1997.

YE, X.; et al. Ectopic Bone Regeneration by Human Bone Marrow Mononucleated Cells, Undifferentiated and Osteogenically Differentiated Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Beta-Tricalcium Phosphate Scaffolds. **Tissue Engineering: Part C: Methods**. v.18, n.7, p.545-556, 2012.

YELTEN, A.; YILMAZ, S.; OKTAR, F. N. Sol-gel derived alumina-hydroxyapatite-tricalcium phosphate porous composite powders. **Ceramics International**. v.38, n.4, p.2659-2665, 2012.