

**BRUNA DITZEL DA COSTA REGALIN**

**BIOMATERIAIS OU ENXERTO DE OSSO ESPONJOSO COMO  
SUBSTITUTOS ÓSSEOS EM ARTRODESES TARSOMETATARSAIS EM OVINOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Nilson Oleskovicz

**LAGES, SC**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com  
auxílio do programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC

Ditzel da Costa Regalin, Bruna  
BIOMATERIAIS OU ENXERTO DE OSSO ESPONJOSO COMO  
SUBSTITUTOS ÓSSEOS EM ARTRODESES TARSOMETATARSAIS EM  
OVINOS / Bruna Ditzel da Costa Regalin. - Lages ,  
2017.  
90 p.

Orientador: Nilson Oleskovicz  
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages,  
2017.

1. Artrodese. 2. Hidroxiapatita. 3. Sílica. 4.  
Fusão óssea. 5. Ovinos. I. Oleskovicz, Nilson. II.  
Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa  
de Pós-Graduação. III. Título.

**BRUNA DITZEL DA COSTA REGALIN**

**BIOMATERIAIS OU ENXERTO DE OSSO ESPONJOSO COMO  
SUBSTITUTOS ÓSSEOS EM ARTRODESES TARSOMETATARSAIS EM OVINOS**

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

**Banca examinadora:**

Orientador: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Nilson Oleskovicz  
Departamento de Medicina Veterinária – CAV/UDESC

Membro: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes  
Departamento de Medicina Veterinária – CAV/UDESC

Membro: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ademar Luiz Dallabrida  
Departamento de Medicina Veterinária – CAV/UDESC

Membro: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini  
Departamento de Medicina Animal – UFRGS

Membro: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi  
Departamento de Medicina Animal - UFRGS

**LAGES, 14/07/2017.**



Dedico este trabalho ao meu  
marido e colega Douglas, por  
todo o apoio e compreensão em  
cada umas das etapas para  
chegar até aqui.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as oportunidades vivenciadas, desafios superados, amizades construídas e toda a dádiva encontrada em meio aos tropeços deste longo caminho;

Aos meus pais, George e Carmen, pelo amor incondicional, pela alegria a cada vitória e angústia a cada desafio... com certeza vivenciaram, mesmo à distância, todo o processo da pós-graduação junto comigo e acreditaram em mim em todas as vezes que as minhas inseguranças insistiam em tentar me fazer esmorecer;

Ao meu marido, colega, melhor amigo, conselheiro, Douglas... com certeza você é um presente que Deus me deu! Obrigada por toda a ajuda, e não falo só na ajuda com as ovelhas, porque esta representa 1% de tudo o que você fez e faz por mim...! Te fazer feliz é a promessa que eu reforço todos os dias, como forma de demonstrar meu amor e gratidão;

À minha “Ermã” preferida!! Minha amigona, parceira, mãezona, conselheira... obrigada por ser essa pessoa maravilhosa que você é, esse exemplo de caráter, garra, dedicação e coragem que me inspira todos os dias, mesmo de longe! E ao meu cunhado querido, pela parceria, risadas e conversas... você é como um irmão para mim! Aos meus anjinhos, João Fhelipe e Maria Fernanda, pelo carinho, doçura e amor! Vocês enchem a minha vida de alegria!

Ao meu orientador e incentivador, Prof. Dr. Nilson Oleskovicz, pelas oportunidades disponibilizadas e pelos ensinamentos compartilhados;

Aos meus sogros e cunhados, Adelar, Semilda, Amanda, Diego e Ana! Obrigada por participarem e torcerem por nós, mesmo à distância!

Aos meus compadres, Simo e Léo, e à nossa Lalica, que chegou para alegrar e encher as nossas vidas do mais lindo amor!! Obrigada por todas as conversas, conselhos e paciência, durante todo esse período, em que não pude ser tão presente quanto gostaria, mas sempre estive com vocês em pensamento e coração;

À toda a minha grande família, pela existência! Pelos momentos de descontração, mesmo que via whatsapp... o carinho e amor recebidos sempre ajudaram a tornar os dias mais leves;

Ao prof. Aury, grande mestre, meu orientador de mestrado e responsável pela minha iniciação no universo dos biomateriais... minha eterna gratidão pelas oportunidades oferecidas;

Ao prof. Nelson Camargo pela paixão que demonstra pela área das cerâmicas, pela dedicação em desenvolver biomateriais cada vez melhores e mais inovadores, e por nos





apresentar a esta bela área de pesquisa, nos fornecendo as composições empregadas neste estudo;

Ao prof. Celso Pilati, pelo preparo das amostras da histologia e pela leitura das lâminas! Obrigada por aceitar dividir parte do seu tempo e conhecimento;

Aos amigos “lageanos” que a pós-graduação me trouxe... colegas do grupo de pesquisa que me ajudaram direta ou indiretamente durante a fase experimental Ademar, Bruna Colombo, Cris Kuci, Luara, Comassetto, Soldado, Amarildo, Karen, Samuel, Carina, Ronise, Martiello, Vanessa; do laboratório de patologia clínica Julieta, Carla, Paulinho, Maysa; do setor de grandes animais do HCV, obrigada pela parceria e ajuda! Vocês são pessoas que levarei no coração para sempre;

À Luara... minha parceira de projeto, a menina da risada mais contagiante e sincera (e do choro também!), um anjo que veio para alegrar e iluminar as nossas vidas! Minha amiga querida, eu acho que você não tem ideia do quanto a tua ajuda nesse projeto foi valiosa! Não, eu não me refiro às ovelhas... o teu jeito leve e descontraído acalmava o meu estado de tensão durante o experimento, o teu bom-humor, teu otimismo, a tua amizade... eu nem sei como explicar! Eu desejo tudo o que a vida tiver de melhor para te oferecer e tenho certeza absoluta que tu vais longe, loira! Conte comigo sempre, para o quer der e vier!

À minha amiga Carina, pela amizade, pela troca de experiência, por ter se tornado a primeira pessoa que me vem à mente quando tenho um caso “bucha”! Pela humildade e dedicação em tudo o que faz... Demoramos para chegar nessa amizade, mas também acredito que Deus tem um propósito para tudo, e, agora que ela nasceu, vai durar para sempre;

Ao meu amigo Ademar, pela ajuda no projeto, pelas oportunidades de aprendizado cirúrgico, pelos conselhos na vida! Obrigada por ter trazido a Lú para as nossas vidas! Vocês são um casal sensacional, pais de duas meninas maravilhosas, e que estarão para sempre no meu coração!

Aos meus amigos Paulo e Gabi, pela companhia, pelas risadas, conversas e por serem tão parceiros e dispostos a ajudar. Obrigada por tudo!

A todos os funcionários do HCV, em especial à Marizete, Marli e dona Adriane, que sempre tiveram paciência com toda a bagunça que este experimento causou, que nos ajudaram a manter a ordem, permitindo que tudo corresse tão bem! Obrigada por tudo!

Às ovelhas desse projeto, sem as quais nada disso seria possível... obrigada por nos tornarem profissionais e seres humanos melhores! A todos os animais, que são nossa inspiração diária para estudarmos e aprendermos cada vez mais...;

Muito 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. Biomateriais ou enxerto de osso esponjoso como substitutos ósseos em artrodeses tarsometatarsais em ovinos. 2017. 90f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

O objetivo do presente estudo foi comparar a capacidade osteorregenerativa induzida por biomateriais à base de fosfatos de cálcio e sílica para a fusão das superfícies ósseas em artrodeses tarsometatarsais induzidas experimentalmente em ovelhas. Foram utilizados 12 ovinos, fêmeas, mestiços texel, com 12 meses de idade, comprovadamente hípidos, alocados em três grupos distintos, de acordo com o material implantado: 80% de hidroxiapatita associada a 20% de tricálcio fosfato  $\beta$  (HA/TCP- $\beta$  80/20) (n=4), hidroxiapatita associada a 5% de sílica (HA/SiO<sub>2</sub> 5%) (n=4) e grupo controle (n=4), que recebeu autoenxerto de osso esponjoso. A estabilidade articular foi obtida pela colocação de uma placa de compressão dinâmica (PCD) com 10 furos, fixada com oito parafusos corticais de 3,5mm na posição lateral. Os animais foram avaliados radiograficamente no pós-operatório imediato e aos 30, 60 e 90 dias após o procedimento cirúrgico. Foi realizada a eutanásia de dois animais de cada grupo aos 60 e aos 90 dias de pós-operatório, momento em que se coletou a articulação para subsequente encaminhamento à análise histológica e à microscopia eletrônica de varredura (MEV). A avaliação macroscópica indicou fusão das superfícies ósseas em todos os animais e extensa cobertura de tecido fibroso sobre a placa e parafusos, indicando a efetividade desta técnica para artrodese tarsometatarsal em ovinos. A análise histológica e por MEV demonstrou, nos três grupos estudados, boa neoformação óssea, com presença de células de linhagem osteogênica (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) e tecido ósseo primário (jovem) e secundário (maduro), além de reabsorção gradativa do enxerto (biomaterial ou osso esponjoso). A presença de material remanescente foi observada nos três grupos, de maneira mais acentuada aos 60 dias, mas ainda presente aos 90 dias de pós-operatório; o grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 apresentou a maior taxa de biomaterial remanescente do estudo. No grupo controle, um animal (25%) apresentou reação periosteal exuberante na área doadora do enxerto, demonstrando a necessidade de se encontrar materiais capazes de substituir o autoenxerto e reduzir a morbidade associada à coleta de osso esponjoso. Com base nos achados deste estudo, os compostos HA/TCP- $\beta$  80/20 e HA/SiO<sub>2</sub> 5% constituem uma boa alternativa ao uso do autoenxerto de osso esponjoso, uma vez que ambos os biomateriais pesquisados promoveram osteoindução e adequada neoformação de tecido ósseo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Artrodese. Hidroxiapatita. Sílica. Fusão óssea. Ovinos.



## ABSTRACT

REGALIN, Bruna Ditzel da Costa. Biomaterials or cancellous bone graft as bone substitutes in tarsometatarsals arthrodesis in sheeps. 2017. 90f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

The aim of this study was to compare the osteoregenerative capacity induced by biomaterials calcium phosphate based and silica for fusion of the bone surfaces in tarsometatarsals arthrodesis experimentally induced in sheep. Twelve texel crossbred, 12 months old, healthy, female sheeps, were allocated into three distinct groups, according to the implanted material: HA/TCP- $\beta$  80/20 (n = 4), HA/SiO<sub>2</sub> 5% (n = 4) and control group (n = 4), that received autograft cancellous bone. The joint stability was achieved by placing a ten holes dynamic compression plate (DCP) and eight 3.5 mm cortical screws in the lateral position. Animals were evaluated radiographically in the immediate postoperative period and at 30, 60 and 90 days after surgery. Euthanasia of two animals from each group were performed at 60 and 90 days after surgery, at which time the joint was collected for subsequent histological and scanning electron microscopy (SEM) analysis. The macroscopic evaluation showed bone surfaces fusion in all animals of the study and large coverage of fibrous tissue on the plate and screws. The histological and SEM analysis demonstrate, in the three groups studied, good bone formation with osteogenic lineage cells (osteoblast, osteocyte and osteoclast) and primary bone tissue (new formed bone) and secondary bone tissue (mature), in addition to gradual resorption of the graft (biomaterial or spongy bone). The presence of remaining material was observed in all three groups, most markedly at 60 days, but still present at 90 postoperative days; the HA/TCP- $\beta$  80/20 group had the highest biomaterial rate remaining in the study. In the control group, one animal (25%) had an exuberant periosteal reaction in the graft donor area, demonstrating the need to find materials capable of replacing the autograft and reducing the morbidity associated with the harvest of spongy bone. Based on the findings of this study, compounds HA/TCP- $\beta$  80/20 and HA/SiO<sub>2</sub> 5% are a good alternative to the use of sponge bone autograft, since both biomaterials researched promoted osteoinduction and adequate neof ormation of bone tissue.

**KEYWORDS:** Arthrodesis. Hydroxyapatite. Silicate. Bone fusion. Sheep.





## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Desenho esquemático dos ossos do tarso em ruminantes. Notar fusão do terceiro e quarto metatarsos (seta preta). ..... 20
- Figura 2 – Desenho experimental do presente estudo, demonstrando de maneira resumida as etapas desenvolvidas..... 30
- Figura 3 - (A) Acesso cirúrgico à articulação tarsometatarsal em ovinos utilizando uma lâmina de bisturi nº 10; (B) Desgaste de toda a superfície articular com motor de alta rotação; (C) Aspecto da área articular após a destruição completa das superfícies (seta). Este leito foi preenchido com um dos três tratamentos; (D) Acúmulo de sangue no leito após desbridamento da cartilagem articular (seta) ..... 33
- Figura 4 - (A) Hidratação do biomaterial granulado HA/TCP- $\beta$  80/20 com sangue arterial colhido no momento do preparo, para posterior implantação no espaço articular; (B) Aspecto da área articular após preenchimento com o biomaterial granulado HA/TCP-  $\beta$  80/20 (seta); (C) Uso de trefina de 6mm acoplada a uma furadeira para criar um defeito na crista da tíbia esquerda, utilizado para a coleta de osso esponjoso – notar irrigação com solução fisiológica NaCl 0,9% para evitar o superaquecimento e possível lesão aos tecidos; (D) Defeito criado na crista da tíbia esquerda, através do qual foi coletado osso esponjoso..... 35
- Figura 5 - Placa de compressão dinâmica aplicada na posição lateral da tíbia esquerda, como método de fixação da artrodese tarsometatarsal em ovinos. (A) Placa metálica sendo moldada para se adaptar à anatomia da região tarsal em ovinos; (B) Placa moldada posicionada no aspecto lateral da região tarsal esquerda em ovinos; (C) Fixação do primeiro parafuso para estabilização do implante metálico; (D) Aspecto final do implante, após a fixação dos oito parafusos corticais para a estabilização da artrodese tarsometatarsal em ovinos. .... 36
- Figura 6 – Confeção da bandagem de Robert Jones modificada. (A) Primeira camada de atadura envolvendo o membro; abaixo dela, apenas duas tiras de esparadrapo, uma na face lateral e outra na face medial do membro, estendidas distalmente para formar o “estribo”; (B) Acima da atadura foi aplicada uma espessa camada de algodão ortopédico para garantir o acolchoamento da bandagem; (C) Aspecto do membro após a última camada de atadura, que recobriu o algodão ortopédico, sobre a qual foram colocadas as talas e o esparadrapo; (D) aspecto final da bandagem de Robert Jones modificada, após colocação das talas e revestimento de esparadrapo. .... 37
- Figura 7 - Ovinos submetidos à artrodese tarsometatarsal esquerda, após a colocação da bandagem de Robert Jones modificada. (A) Ovino no segundo dia de pós-operatório. Animal apoia o membro normalmente. (B) Animais aos 30 dias de pós-operatório, após exame radiográfico e substituição da bandagem. .... 43



- Figura 8 - Representação gráfica da pontuação atribuída para o critério “União das Superfícies Ósseas/Linha Articular” na avaliação radiográfica de artrodese tarsometatarsal induzida experimentalmente em ovinos (comparação entre grupos), com base nos critérios adaptados do estudo de Albuquerque (2012). ..... 45
- Figura 9 - Representação gráfica da pontuação atribuída para o critério “Qualidade do Osso Neoformado” na avaliação radiográfica de artrodese tarsometatarsal induzida experimentalmente em ovinos (comparação entre grupos), com base nos critérios adaptados do estudo de Albuquerque (2012)..... 46
- Figura 10 - Representação gráfica da pontuação atribuída para o critério “Aspecto e Fixação da Placa e Parafusos” na avaliação radiográfica de artrodese tarsometatarsal induzida experimentalmente em ovinos (comparação entre grupos), com base nos critérios adaptados do estudo de Albuquerque (2012)..... 47
- Figura 11 - Representação gráfica da pontuação atribuída para o critério “Impressão Global da Consolidação” na avaliação radiográfica de artrodese tarsometatarsal induzida experimentalmente em ovinos (comparação entre grupos), com base nos critérios adaptados do estudo de Albuquerque (2012)..... 48
- Figura 12 – Radiografias do Grupo HT (HA/TCP- $\beta$  80/20) no pós-operatório imediato (A), aos 60 dias de pós-operatório (B) e aos 90 dias de pós-operatório (C). Notar área de radiopacidade acentuada aos 90 dias de pós-operatório (seta), característica da alta concentração de hidroxiapatita deste composto. .... 49
- Figura 13 – Radiografias do Grupo HS (HA/SiO<sub>2</sub> 5%) no pós-operatório imediato (A), aos 60 dias de pós-operatório (B) e aos 90 dias de pós-operatório (C). Observar o fechamento gradativo da linha articular com o passar do tempo. .... 50
- Figura 14 – Radiografias do Grupo C (autoenxerto) no pós-operatório imediato (A), aos 60 dias de pós-operatório (B) e aos 90 dias de pós-operatório (C)..... 51
- Figura 15 - Aspecto macroscópico *post mortem* da região lateral do tarso e metatarsos de ovinos submetidos à artrodese tarsometatarsal esquerda. (A) Aspecto da placa após o acesso à área cirúrgica. Notar intensa cobertura de tecido mole e fibroso sobre a placa. (B) Aspecto após a remoção de tecidos moles e fibroso envolvendo o implante metálico. (C) Aspecto dos ossos após a remoção da placa de compressão dinâmica..... 52
- Figura 16 - Análise histológica demonstrando presença acentuada de biomaterial remanescente no grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 aos 60 dias de pós-operatório. Observar que apesar da grande quantidade de grânulos, há presença de osso primário ao redor destes, indicando neoformação óssea. .... 55
- Figura 17 - Análise por MEV demonstrando a presença marcante de osteoblastos, indicando processo de neoformação óssea ativo, com tecido ósseo neoformado envolvendo um grânulo de biomaterial remanescente (setas vermelhas) do grupo HA/TCP- $\beta$  80/20, em ovinos aos 60 dias de pós-operatório..... 56



- Figura 18 - Análise histológica do grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 aos 60 dias de pós-operatório. Observar a acentuada presença de tecido fibroso (TF) organizado (maduro) e a neoformação óssea, demonstrada pelas regiões com tecido ósseo primário (OP) e pela formação óssea adjacente ao grânulo de biomaterial remanescente (BR), indicada pelas setas brancas.....57
- Figura 19 - Análise histológica demonstrando a presença de grânulos de biomaterial remanescente aos 90 dias de pós-operatório no grupo HA/TCP- $\beta$  80/20. Notar que estes grânulos estão envolvidos por tecido ósseo primário, demonstrando a neoformação óssea; presença de tecido fibroso desorganizado adjacente aos grânulos.....58
- Figura 20 - Imagens da MEV evidenciando um grânulo de biomaterial remanescente do grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 envolvido por tecido ósseo neoformado, aos 90 dias de pós-operatório. As setas vermelhas indicam a zona de interface entre o biomaterial e o tecido ósseo neoformado, caracterizando a capacidade osteointegrativa destes compostos. ....59
- Figura 21 - A presença de tecido fibroso (setas vermelhas) é identificada também pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) aos 90 dias de pós-operatório do grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 (B). ....60
- Figura 22 - Análise histológica do grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 aos 90 dias de pós-operatório, demonstrando área de neoformação óssea com presença abundante de osteócitos (setas pretas) e neoformação óssea ao redor dos grânulos de biomaterial remanescente (setas brancas). ....61
- Figura 23 - Análise histológica demonstrando uma presença muito acentuada de biomaterial remanescente aos 60 dias de pós-operatório no grupo HA/SiO<sub>2</sub> a 5%. A neoformação óssea também é evidente, com observação de osso primário e secundário desenvolvendo-se a partir dos grânulos. Entremeados ao tecido ósseo e ao biomaterial remanescente, pode ser observada a presença de tecido fibroso desorganizado. ....62
- Figura 24 - Análise histológica demonstrando a presença de biomaterial remanescente no grupo HA/SiO<sub>2</sub> a 5% aos 60 dias de pós-operatório. Observar o processo de absorção do biomaterial e substituição deste por tecido ósseo neoformado (setas brancas). Neste detalhe, pode ser identificada uma lacuna deixada pela degradação do grânulo de biomaterial, onde se observa a presença de células grandes (osteoclastos – seta preta) responsáveis por este processo; além disso, é possível perceber o fechamento da lacuna pelo avanço centrípeto do tecido ósseo neoformado. ....63
- Figura 25 - Análise por MEV de um grânulo de biomaterial remanescente do grupo HA/SiO<sub>2</sub> 5% envolvido por tecido ósseo em formação (setas vermelhas), demonstrando a área de interface entre o tecido ósseo neoformado e o grânulo do biomaterial, em um ovino aos 60 dias de pós-operatório. ....64
- Figura 26 – Presença marcante de osteoblastos (setas) na superfície óssea, indicando atividade osteogênica, em um ovino do grupo HA/SiO<sub>2</sub> 5% aos 60 dias de pós-operatório.65



- Figura 27 - Aos 90 dias de pós-operatório, no grupo HA/SiO<sub>2</sub> 5%, foi observada pela MEV, mínima presença de grânulos concisos e evidenciada a presença de seus fragmentos, na forma de apatitas deste biomaterial (setas vermelhas) entremeados ao tecido ósseo neoformado. .... 66
- Figura 28 - Imagem histológica evidenciando área com grande neoformação óssea no grupo HA/SiO<sub>2</sub> a 5% aos 90 dias de pós-operatório. Observa-se uma quantidade reduzida de grânulos de biomaterial remanescente, circundadas por grande quantidade de tecido ósseo primário (osteócitos - setas pretas)..... 67
- Figura 29 - Imagem de MEV ilustrando o aspecto da neoformação óssea no grupo controle (autoenxerto de osso esponjoso) aos 60 dias de pós-operatório. Observa-se a presença de osso esponjoso remanescente (setas vermelhas) bem como intensa atividade osteoblástica, promovendo neoformação óssea. .... 68
- Figura 30 - Análise histológica do grupo controle (autoenxerto de osso esponjoso) aos 60 dias de pós-operatório, demonstrando presença moderada a acentuada de osso esponjoso remanescente e moderada neoformação de tecido ósseo..... 69
- Figura 31 - Análise histológica do grupo controle (autoenxerto de osso esponjoso) aos 90 dias de pós-operatório, demonstrando presença de tecido ósseo primário e tecido fibroso desorganizado. .... 70
- Figura 32 - Imagem da MEV demonstrando área com tecido fibroso entremeadado ao tecido ósseo neoformado, em um ovino do grupo controle aos 90 dias de pós-operatório..... 71
- Figura 33 - Análise histológica do grupo controle aos 90 dias de pós-operatório, evidenciando uma área contendo cartilagem remanescente, circundada por tecido ósseo neoformado, e a presença de fibrocartilagem. .... 72





## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Escores para avaliação radiográfica da artrodese tarsometatarsal realizada experimentalmente em ovelhas, com base nos critérios de união das superfícies ósseas/presença da linha articular, qualidade do osso neoformado, aspecto e fixação da placa e parafusos e impressão global da consolidação. .... 39
- Tabela 2 – Critérios semi-quantitativos da proporção de biomaterial remanescente (BR), osso esponjoso remanescente (OER), cartilagem remanescente (CR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), osso secundário (OS), tecido fibroso (TF), fibrocartilagem (FC) e grau de maturação (GM) utilizados para análise por microscopia óptica. .... 41
- Tabela 3 – Mediana (mínimo e máximo) dos valores obtidos por grupo após a análise histológica, com base nos critérios semi-quantitativos analisados: biomaterial remanescente (BR), osso esponjoso remanescente (OER), cartilagem remanescente (CR), osso primário (OP), osso secundário (OS), fibrocartilagem (FC), tecido fibroso (TF) e grau de maturação (GM), em ovinos eutanasiados após 60 dias de pós-operatório. .... 53
- Tabela 4 – Mediana (mínimo e máximo) dos valores obtidos por grupo após a análise histológica, com base nos critérios semi-quantitativos analisados: biomaterial remanescente (BR), osso esponjoso remanescente (OER), cartilagem remanescente (CR), osso primário (OP), osso secundário (OS), fibrocartilagem (FC), tecido fibroso (TF) e grau de maturação (GM), em ovinos eutanasiados aos 90 dias de pós-operatório. .... 54



## LISTA DE ABREVIATURAS

- AST – aspartato amino transferase
- BR – biomaterial remanescente
- CLP – Castless plate
- CR – cartilagem remanescente
- DFC – deposição de fibras colágenas
- DMSO – dimetilsulfóxido
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- FA – fosfatase alcalina
- FC – fibrocartilagem
- FEE – fixador esquelético externo
- GGT – gama glutamil transferase
- GM – grau de maturação
- HA – hidroxiapatita
- HA/SiO<sub>2</sub> - hidroxiapatita associada à sílica a 5%
- HA/TCP-β 80/20 – 80% hidroxiapatita e 20% tricálcio fosfato beta
- IM – intramuscular
- IV – intravenoso
- KCl – cloreto de potássio
- MEV – microscopia eletrônica de varredura
- NTO – neoformação de tecido ósseo
- OER – osso esponjoso remanescente
- OP – osso primário
- OS – osso secundário
- PCD – placa de compressão dinâmica
- PDLLA – ácido poli-DL-láctico
- PEEP – pressão positiva ao final da expiração
- SC – subcutâneo
- TCP-β – tricálcio fosfato beta
- TF – tecido fibroso



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1	ANATOMIA .....	19
2.2	ARTRODESE.....	20
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
3.1	OBJETIVOS GERAIS .....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
4.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....	29
4.2	ANIMAIS .....	31
4.3	PRÉ-OPERATÓRIO .....	31
4.4	PROCEDIMENTOS ANESTÉSICOS.....	32
4.5	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	32
4.6	PÓS-OPERATÓRIO .....	36
4.7	AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA .....	38
4.8	AVALIAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA .....	39
<b>4.8.1</b>	<b>Eutanásia .....</b>	<b>39</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Avaliação por Microscopia Óptica.....</b>	<b>40</b>
<b>4.8.3</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</b>	<b>41</b>
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
5.1	AVALIAÇÃO CLÍNICA .....	43
5.2	AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA .....	44
5.3	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	52
5.4	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA .....	52

<b>5.4.1 HA/TCP-<math>\beta</math> 80/20 .....</b>	<b>54</b>
<b>5.4.2 HA/SiO<sub>2</sub> a 5%.....</b>	<b>61</b>
<b>5.4.3 CONTROLE.....</b>	<b>67</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....</b>	<b>81</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O comprometimento articular, em decorrência de traumas ou doenças degenerativas, é frequente tanto em humanos quanto em animais. Em muitos desses casos, a alternativa para solucionar o problema é cirúrgica, por meio de artrodese, a fim de evitar complicações como osteoartroses sintomáticas, dor crônica e déficit funcional (FERNANDES et al., 2008). As articulações dos membros torácicos ou pélvicos são as mais acometidas, porém artrodese de vértebras cervicais e lombares são comumente realizadas em humanos, em função de doenças articulares degenerativas, traumas, neoplasias e deformidades, como procedimento de salvamento para alívio da dor e retorno das atividades do paciente (REID; JOHNSON; WANG, 2011). No caso de artrodeses na região distal dos membros em animais, a fixação da articulação permite que a lesão não cause mais dor ou prejuízos, sendo uma boa alternativa à amputação do membro acometido (DÓREA NETO, 2007a; LESSER, 2007).

Para a realização da artrodese, é necessária a utilização de implantes metálicos rígidos, como placas, parafusos ou pinos para promover a estabilização, e enxerto ósseo capaz de acelerar a osteoindução e permitir a fusão das superfícies ósseas o mais rápido possível. Lyons et al. (2011) avaliaram a eficácia de placas e parafusos absorvíveis à base de ácido poli-DL-láctico (PDLLA) para a fusão de vértebras cervicais em ovinos e não encontraram um bom resultado, havendo falha em 75% das fusões, principalmente em decorrência de quebra dos implantes reabsorvíveis (50%), embora tenha sido observada falha na união óssea em alguns casos em que a integridade dos implantes foi mantida.

A utilização de autoenxerto é frequente, por não haver incompatibilidade e por permitir rápida osteoindução e osteocondução; entretanto, possui desvantagens, como prolongar o tempo cirúrgico, aumentar a dor pós-operatória e o risco de infecção na área doadora. Desta forma, a pesquisa por biomateriais capazes de substituir o autoenxerto é contínua.

Compostos osteoindutivos e osteocondutivos à base de fosfatos de cálcio e biossílica auxiliam na fixação interna para o tratamento de fraturas específicas e constituem uma importante alternativa na substituição de enxertos ósseos autógenos. Substitutos osteocondutivos são geralmente porosos e servem como suporte estrutural para sustentar o novo tecido ósseo; substitutos osteoindutivos estimulam o recrutamento e a diferenciação de células mesenquimais em células osteoprogenitoras (SOLCHAGA et al., 2012).

A composição química das biocerâmicas está diretamente relacionada com a qualidade do reparo ósseo, uma vez que cerâmicas bioativas, ou seja, que possuem capacidades

osteocondutivas e/ou osteoindutivas, apresentam resultados melhores quando comparadas àquelas apenas bioinertes ou biocompatíveis (SOBALLE et al., 1992; HING et al., 2007).

A hidroxiapatita (HA) apresenta uma lenta taxa de absorção *in vivo*, enquanto que o tricálcio fosfato- $\beta$  (TCP- $\beta$ ) apresenta uma dissolução rápida, devido à sua alta porosidade (COSTA et al., 2015). Diversos estudos demonstraram que a absorção lenta ou rápida demais pode trazer prejuízos no que se refere ao reparo do tecido ósseo, por isso tem sido preconizada a pesquisa por compostos bifásicos de HA e TCP- $\beta$ , aliando a maior permanência da hidroxiapatita, que confere maior sustentação ao tecido neoformado, à rápida solubilização do TCP- $\beta$ , com aceleração na deposição de células osteoprogenitoras (HUANG et al., 2010; KIM et al., 2012; COSTA et al., 2015).

Porter et al. (2004), compararam a dissolução e a precipitação de HA e de sílica/hidroxiapatita (Si-HA) *in vitro* e *in vivo* e observaram que a sílica facilita a precipitação de apatitas do implante, promovendo calcificação óssea. Sendo a sílica rapidamente liberada do implante, estes fragmentos aceleram a mineralização óssea.

Além disso, o uso de hidroxiapatita isolada já foi descrito como substituto ao autoenxerto em um estudo clínico de artrodeses em cães e gatos, demonstrando bons resultados e sugerindo um futuro promissor nas rotinas ortopédicas em medicina veterinária (DÓREA NETO, 2007a).

A espécie ovina tem sido reportada por diversos autores como um modelo experimental adequado para cirurgias ortopédicas, em função de sua estrutura, temperamento e capacidade de remodelamento ósseo (CUNNINGHAM et al., 2009; HEINECK et al., 2010; VAN DER POL et al., 2010; ALBUQUERQUE et al., 2015; COSTA et al., 2015).

Embora a literatura acerca de artrodeses vertebrais experimentais em ovelhas seja vasta (KHAN & LANE, 2004; CUNNINGHAM et al., 2009; HEINECK et al., 2010; SOLCHAGA et al., 2012), visto que serve como modelo de extrapolação para cirurgias na coluna vertebral em humanos, há poucos estudos relacionados à artrodeses em membros torácicos e pélvicos nesta espécie. Espera-se, portanto, atingir resultados ainda mais satisfatórios com o uso de composições bifásicas de HA/TCP- $\beta$  80/20 e hidroxiapatita associada à sílica (HA/SiO<sub>2</sub> 5%), visto que a associação de diferentes fases promove um incremento na atividade osteoprogenitora, com a manutenção do suporte estrutural ao osso neoformado conferido pela hidroxiapatita. O presente estudo avaliou o uso da técnica cirúrgica para artrodeses tarsometatarsais em ovinos por meio do uso de placa de compressão dinâmica (PCD) e parafusos corticais na posição lateral, haja vista que esta técnica está descrita na literatura para artrodese tarsometatarsal em cães e gatos (DENNY & BUTTERWORTH, 2006).



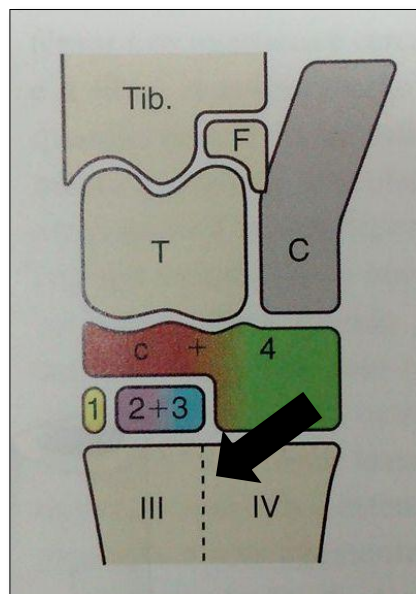
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ANATOMIA

A extremidade distal da tíbia apresenta uma área articular, denominada cóclea, destinada a acomodar a tróclea do tálus. O tálus e o calcâneo são dois ossos relativamente grandes que compõem a fileira proximal dos ossos tarsais (DYCE; SACK; WENSING, 2010).

O tarso, ou jarrete, é uma articulação formada por sete ossos tarsais e os tecidos moles a eles relacionados (DENNY, 2006). Como demonstrado na figura 1, os ossos tarsais são dispostos em três fileiras, sendo a proximal formada pelo tálus (medialmente) e pelo calcâneo (lateralmente). Este último apresenta um processo em forma de acúleo, que se projeta proximalmente atrás da tíbia como um braço de alavanca, formando a base da ponta do jarrete (DYCE; SACK; WENSING, 2010). A extremidade distal do calcâneo se encontra sobre o quarto osso társico, o qual, em ruminantes, é fusionado ao osso central do tarso. Este último localiza-se entre o tálus (proximalmente) e o primeiro, segundo e terceiro ossos tarsais, distalmente (DYCE; SACK; WENSING, 2010). Os ossos tarsais distais podem ser fusionados, como no caso do segundo e terceiro em ruminantes, e formam um disco relativamente achatado, localizados entre o osso central do tarso e os ossos metatársicos (DYCE; SACK; WENSING, 2010). Suas articulações específicas são: tarsocrural, intertarsal proximal, centrodistal (distal intertarsal) e tarsometatarsal. Esta última, compreende as articulações entre o tarso distal e os ossos metatarsais (DENNY, 2006). A articulação tarsocrural é considerada do tipo gínglimo e permite movimentos de extensão articular; as intertarsais e tarsometatarsal são planas e capazes de movimentos de deslizamento (DENNY, 2006; KAINER, 2006).

Figura 1 – Desenho esquemático dos ossos do tarso em ruminantes. Notar fusão do terceiro e quarto metatarsos (seta preta).



Fonte: DYCE; SACK; WENSING, 2010. Tib. = tíbia; F = fíbula; T = tálus; C = calcâneo; c = osso central do tarso; algarismos romanos identificam os ossos metatarsais e algarismos arábicos os ossos distais do tarso.

## 2.2 ARTRODESE

Luxações e subluxações da articulação tarsometatarsal são comuns em pacientes humanos e veterinários e quase sempre resultam de traumas, que podem envolver ainda a ruptura de ligamentos colaterais e/ou plantares (DENNY & BUTTERWORTH, 2006; FERNANDES, 2008). Na maioria dos casos, o tratamento de escolha consiste na imobilização da articulação, a fim de controlar a dor e a movimentação articular (FERNANDES, 2008; MAGALHÃES, 2015). A instabilidade articular, em decorrência de um trauma ou doença degenerativa, gera um processo doloroso devido à movimentação das superfícies articulares e da tensão aplicada sobre a musculatura e inervação adjacentes, o qual é aliviado pela artrodese (LESSER, 2007).

A realização de artrodese experimental em articulações tarsais já foi realizada em cães (CAMACHO, 2005; DÓREA NETO, 2007b). Em ovinos, no entanto, não foram encontrados relatos de artrodese em articulações do tarso. A artrodese é definida como a fixação cirúrgica de uma articulação para permitir a fusão das superfícies articulares através da proliferação de células ósseas (LESSER, 2007). Pozzi et al. (2012), citam quatro requerimentos cirúrgicos para a realização da artrodese: desbridamento da cartilagem

articular, emprego de enxerto ósseo, posicionamento da articulação imobilizada em um ângulo funcional para o paciente e aplicação de uma fixação estável.

Embora o desbridamento completo da cartilagem articular seja amplamente difundido como princípio básico para a artrodese, Lauge-Pedersen & Aspenberg (2002) realizaram um estudo promovendo artrodeses patelofemorais percutâneas em coelhos sem esse desbridamento, e obtiveram uma alta taxa de sucesso em relação à fixação e osteointegração. Os autores citam ainda o sucesso após realização de artrodese sem desbridamento articular em pacientes com reumatismo; entretanto, quiseram verificar se em ossos e articulações saudáveis o processo ocorreria da mesma forma, o que foi confirmado. Em casos de artrites pós-traumáticas ou artrites reumatóides, com o alinhamento articular preservado, as técnicas percutâneas sem desbridamento articular promovem ao paciente um pós-operatório com menos dor, redução do risco de mal posicionamento articular, além de encurtar o tempo cirúrgico e anestésico (LAUGE-PEDERSEN & ASPENBERG, 2002; POZZI et al., 2012). Já foram descritos ângulos normais para diferentes articulações em cães e ovinos (CONCEIÇÃO et al.; 2012; FREITAS et al., 2014), mas o método mais simples e seguro para sua determinação é a mensuração por avaliação goniométrica do ângulo normal do membro oposto durante a sustentação do peso.

### **2.2.1 Estabilização articular**

A fixação interna é requisito básico para a artrodese, tendo sido descritas diversas técnicas para este objetivo: pinos intramedulares (CAIXETA, 2014), placa óssea de compressão dinâmica (MAGALHÃES, 2015), placa lateral bloqueada (COUGHLIN, 2012) parafusos (LAUGE-PEDERSEN & ASPENBERG, 2002) e fixadores esqueléticos externos (DÓREA NETO, 2007b). Lyons et al. (2011) avaliaram o uso de placas e parafusos absorvíveis à base de ácido poli-DL-láctico (PDLA) em artrodeses cervicais experimentais em ovinos e obtiveram resultados negativos, visto que na necropsia foi observado um grande número de implantes quebrados, tanto placas quanto parafusos, e em dos pontos de artrodese sem sinal de consolidação em diversos animais.

Em 2007, McLennan relatou quatro casos de anquilose após luxação de articulação tarsometatarsal em cães com peso acima de 20kg, apenas com o emprego de fixador esquelético externo (FEE), sem desbridamento articular, uso de enxertos ósseos ou coaptação externa. Os implantes foram mantidos por 12 a 17 semanas e, após esse período,

todos os animais apresentaram sucesso na fusão articular, com suporte de peso sobre o membro acometido e deambulação normais (McLENNAN, 2007). Embora seja um método empregado com sucesso, há risco de infecção ao redor dos pinos, podendo levar à osteomielite se não tratada, e os animais tem fácil acesso aos implantes, podendo haver complicações atreladas à lambedura e/ou mordedura excessivas (McLENNAN, 2007). Em gatos, o emprego de FEE apresenta uma taxa moderada de complicações (19%), sendo a região do tarso com o maior índice de complicações no que se refere à falha dos implantes (BEEVER; GILES; MEESON, 2017).

Chow & Balfour (2012), por sua vez, empregaram pinos intramedulares para a estabilização de artrodeses tarsometatarsais em cães e gatos, e, apesar de se mostrar uma opção viável e com resultado satisfatório, apresentou um risco aumentado de quebra de implante, além da dificuldade na colocação de pinos intramedulares nos metatarsos de animais pequenos.

O uso de placas metálicas para estabilização de artrodeses é amplamente descrito em medicina veterinária. Em 1998, Dyce et al. investigaram o uso de placas posicionadas lateralmente à articulação tarsometatarsal em 10 cães, sendo que, em três animais foi necessária a remoção dos implantes entre três e cinco meses de pós-operatório, pois os mesmos apresentaram claudicação persistente.

Pozzi et al. (2012) sugerem que o emprego de técnicas minimamente invasivas para a colocação de placas metálicas pode ser desejável não só para correção de fraturas, mas também para a realização de artrodeses, especialmente na região tarsal. Dessa maneira, o desbridamento da cartilagem articular causaria menores trauma aos tecidos moles adjacentes, reduzindo a probabilidade de complicações pós-operatórias.

O emprego de dois modelos diferentes de placas metálicas foi investigado por Bristow et al. (2015) para artrodese pancarpal em 219 cães. A placa de compressão dinâmica híbrida, um dos métodos de fixação avaliado pelos pesquisadores, apresenta vantagem sobre a placa de compressão dinâmica (PCD) pois permite o emprego de parafusos menores nos ossos metacárpicos comparados àqueles fixados ao rádio; o outro implante avaliado foi uma placa metálica denominada “Castless Plate” (CLP) desenvolvida com o intuito de promover vantagens biomecânicas adicionais em relação à placa de compressão dinâmica híbrida, reduzindo a necessidade de utilização de coaptação externa durante o pós-operatório. Não foi observada diferença na taxa de complicações entre os

dois implantes avaliados, embora tenham sido observadas complicações relacionadas ao uso de bandagens pós-operatórias.

A colocação de uma bandagem pós-operatória a fim de fornecer suporte externo à estabilização cirúrgica de uma artrodese é amplamente indicado e difundido (DYCE et al., 1998; DENNY & BUTTERWORTH, 2006; CHOW & BALFOUR, 2012). Um estudo realizado em 2012, avaliou a necessidade de coaptação externa para prevenir a deformidade de placas metálicas após artrodese pancarpal, e verificou que as bandagens reduzem a tensão de maneira significativa, porém a amplitude da tensão exercida sobre a placa na ausência do suporte externo poderia não ser suficiente para causar a falha do implante (WOODS; WALLACE; MOSLEY, 2012). Estes achados sugerem que o suporte externo possa não ser necessário por períodos prolongados, diferindo do recomendado por DENNY & BUTTERWORTH, 2006, cuja orientação seria manter o suporte externo por oito a 12 semanas após o procedimento cirúrgico.

### 2.3 ENXERTOS E IMPLANTES ÓSSEOS

A fim de permitir uma consolidação óssea mais rápida, é amplamente recomendado o emprego de enxertos ósseos, os quais podem ser autógenos, de osso esponjoso ou cortical, retirados do próprio paciente, alógenos, utilizando fragmentos ósseos de outro animal da mesma espécie conservados em glicerina, ou xenógenos, quando o fragmento a ser enxertado é proveniente de um animal de outra espécie. O requisito básico é que sejam capazes de preencher defeitos maiores e conferir maior resistência mecânica (MOORE et al., 2001; LEGEROS, 2002; DÓREA NETO, 2007b). A colheita de osso esponjoso pode ser efetuada acessando-se a crista ilíaca, tíbia proximal medial, úmero médio ou corpo vertebral, dependendo do local cirúrgico, sendo o primeiro local, o mais comumente utilizado (GRIFFON, 2002; MIN et al., 2010). Um estudo comparou a capacidade proliferativa e de diferenciação osteoblástica da medula óssea e de células mesenquimais coletadas a partir do corpo vertebral e da crista ilíaca em humanos, e observou que ambos os locais fornecem material para enxerto ósseo adequado, podendo a colheita ser realizada no local de acesso mais fácil para o procedimento cirúrgico em andamento (MIN et al., 2010). Entretanto, algumas desvantagens são observadas com o emprego do autoenxerto, entre elas a quantidade limitada de material disponível nas áreas doadoras, o defeito gerado para a coleta do osso esponjoso 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).

Na tentativa de substituir a utilização do autoenxerto, a pesquisa por biomateriais com capacidades osteogênicas tem sido aprimorada. O material ideal para a reparação de tecidos ósseos deve ser gradativamente absorvido e substituído por tecido ósseo neoformado. Por atuarem como osteoindutores e osteocondutores, os biomateriais à base de fosfatos de cálcio são uma boa opção nas terapias de regeneração óssea (MAGALHÃES et al., 2000; DÓREA NETO, 2007a).

A fase mineral óssea corresponde a 60-70% do seu peso seco e é composta basicamente por fosfatos de cálcio. Por esta razão, o uso de fosfatos de cálcio para restauração óssea apresenta melhores propriedades osteocondutivas, quando comparado a outros biomateriais, como por exemplo, zircônia e alumina (DOROZHKIN, 2007; GOODMAN et al., 2013).

Diversos estudos acerca da eficácia de biomateriais no que concerne à fusão óssea têm sido conduzidos, entre eles se destaca a realização de artrodeses em vértebras cervicais e lombares, induzidas experimentalmente em ovinos (WHEELER et al., 2007; CUNNINGHAM et al., 2009; SOLCHAGA et al., 2012). Dórea Neto et al. (2007a), utilizaram hidroxiapatita pura em artrodeses de cães e gatos e pela avaliação clínica e radiográfica constataram que houve união óssea, indicando que este biomaterial pode ser um adequado substituto ósseo em cirurgia de pequenos animais.

Costa et al. (2015), analisaram a capacidade de neoformação óssea da hidroxiapatita (HA), tricálcio fosfato- $\beta$  (TCP- $\beta$ ) e HA/TCP- $\beta$  60/40 na forma de grânulos porosos, para o preenchimento de defeitos ósseos em tíbias de ovelhas, e observaram que a composição bifásica apresentou o melhor resultado por aliar a rápida absorção do TCP- $\beta$  à maior resistência mecânica conferida pela HA. Estudos anteriores já demonstraram uma alta capacidade osteocondutiva do composto bifásico HA/TCP 20/80 (GRIFFON, 2002; JENSEN et al., 2009). Cunningham et al. (2009) associaram o peptídeo B2A, que mimetiza a ação de fatores de crescimento, ao composto bifásico HA/TCP 20/80, e observaram que a associação incrementa ainda mais a atividade osteogênica da cerâmica bifásica.

Além dos fosfatos de cálcio, outra opção para regeneração óssea são as biossílicas, que apresentam bioatividade comprovada, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Este biomaterial possui a capacidade de acelerar a mineralização óssea e aumentar a taxa de proliferação de

células precursoras ósseas (WANG; SCHRÖDER; MÜLLER, 2014). A sílica é encontrada no organismo em áreas de crescimento ósseo, e diversas análises tem demonstrado sua presença em meio a osteoblastos (HENSTOCK; CANHAM; ANDERSON, 2015). Wheeler et al. (2007) compararam fosfatos de cálcio associados à sílica com o autoenxerto para artrodeses lombares em ovinos, e verificaram que a cerâmica contendo sílica apresentou resultados equivalentes ao enxerto autógeno nas avaliações radiográficas, biomecânicas e histológicas, sendo superior aos fosfatos de cálcio utilizados isoladamente. Hutchens et al. (2016) compararam a eficácia de fosfato de cálcio associado à sílica de alta porosidade como enxerto ósseo único, associado à medula óssea ou a osso esponjoso coletado da crista ilíaca para o preenchimento de defeitos críticos criados na região distal do fêmur, em ovinos, e observaram excelente biocompatibilidade nas três formas, com neovascularização, tecido ósseo maduro e processo de regeneração óssea. Em coelhos, foi observada regeneração óssea com biocerâmicas à base de silicato, similar ao observado com o TCP- $\beta$ , no que concerne à velocidade de absorção do material e ao tecido ósseo neoformado, além de se constatar segurança na excreção de íons silicato pela urina, durante o processo de degradação do biomaterial, sem acúmulo destes em órgãos como rins, fígado, baço, ou mesmo no sangue (LIN et al., 2015).

Até o presente momento, não foram encontrados na literatura, relatos do emprego de HA/TCP- $\beta$  80/20, HA/SiO<sub>2</sub> a 5% em artrodeses tarsometatarsais em ovinos. Portanto, no presente estudo, optou-se pelo emprego destes compósitos em artrodeses induzidas experimentalmente em ovinos a fim de verificar sua eficácia como indutores ósseos. Além disso, a técnica cirúrgica realizada neste estudo ainda não foi relatada em ovinos, também sendo útil a avaliação da sua eficácia como método de estabilização articular nesta espécie. Acredita-se que a técnica de fixação articular por meio da utilização de placa de compressão dinâmica (PCD) com 10 furos e oito parafusos corticais de 3,5mm na posição lateral seja efetiva para a estabilização articular e permita a fusão das superfícies ósseas. De maneira similar, presume-se que os compostos de fosfato de cálcio, nas composições bifásicas HA/TCP- $\beta$  80/20 e HA/SiO<sub>2</sub> a 5% apresentarão boa capacidade osteoindutiva e osteocondutiva, semelhantes ao autoenxerto de osso esponjoso, constituindo uma boa alternativa ao seu uso. Considerando os dois compostos analisados, supõe-se que, devido à maior capacidade de precipitação das apatitas ósseas da HA/SiO<sub>2</sub> a 5% em um mais curto período de tempo, este biomaterial apresentará melhores resultados no que concerne à proliferação de células osteoprogenitoras e neoformação óssea. A confirmação destas

hipóteses promoveria alternativas ao uso do autoenxerto de osso esponjoso em artrodeses, reduzindo a morbidade pós-operatória sem ônus ao processo de cicatrização óssea; o emprego de ovinos como modelo experimental permite que estes achados possam ser empregados tanto em humanos quanto em pacientes veterinários.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a resposta osteorregenerativa após a implantação de biomateriais à base de fosfatos de cálcio e sílica ou autoenxerto de osso esponjoso (controle) para a fusão das superfícies ósseas, em artrodeses tarsometatarsais induzidas experimentalmente em ovelhas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar radiograficamente o processo de cicatrização da articulação tarsometatarsal após o procedimento de artrodese; avaliar a fixação dos implantes metálicos no pós-operatório imediato e aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório, a fim de acompanhar a estabilidade e possíveis complicações relacionadas ao método de estabilização empregado.

Avaliar histologicamente a capacidade osteorregenerativa do tecido ósseo após a implantação dos biomateriais HA/TCP- $\beta$  80/20 e HA/SiO<sub>2</sub> 5% e compará-la àquela induzida pelo autoenxerto de osso esponjoso, aos 60 e aos 90 dias de pós-operatório, verificando a qualidade do tecido ósseo neoformado pela presença de células de linhagem osteogênica, bem como a rapidez com que o biomaterial é absorvido pelo tecido.

Avaliar por microscopia eletrônica de varredura (MEV) o preenchimento dos grânulos de cada biomaterial com células osteogênicas e o tecido ósseo neoformado, aos 60 e aos 90 dias de pós-operatório.



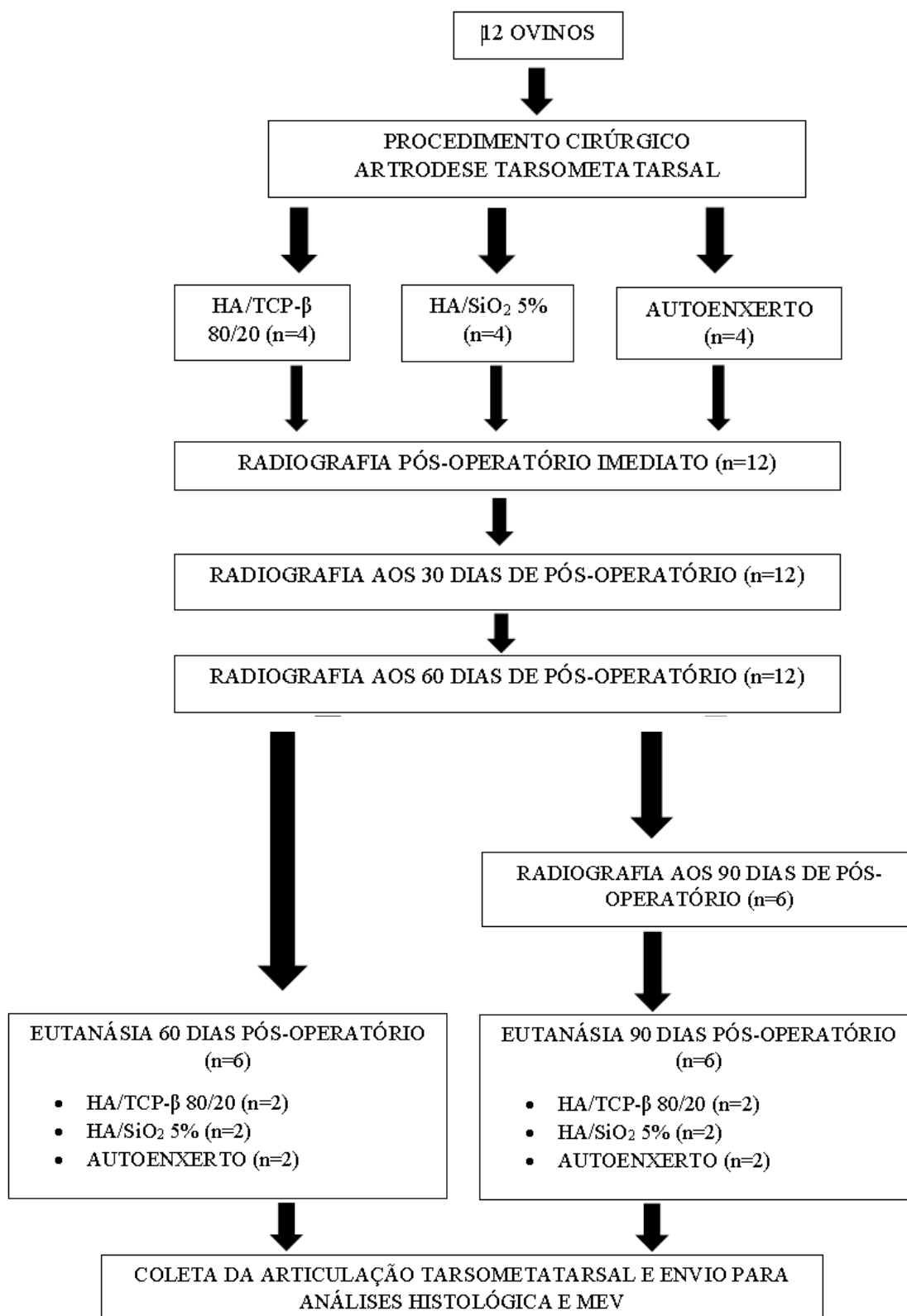
## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi realizado nas dependências do Hospital de Clínica Veterinária do CAV/UDESC, sob aprovação do Comitê de Ética e Bem-Estar Animal desta instituição, segundo o protocolo 1.18.15, com base nas resoluções nº 13 e nº 30 do CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

### **4.1 DESENHO EXPERIMENTAL**

Na figura 2 está demonstrado o desenho experimental do presente estudo, a fim de facilitar a compreensão acerca da metodologia proposta. Na sequência, encontra-se detalhada a metodologia desenvolvida.

Figura 2 – Desenho experimental do presente estudo, demonstrando de maneira resumida as etapas desenvolvidas.



Fonte: produção do próprio autor, 2017.

## 4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 12 ovinos, fêmeas, mestiças texel, com peso médio de  $32,5 \pm 4,6$ kg e 12 meses de idade. Durante o período do experimento, estes animais foram alocados em baias no setor de grandes animais do HCV/CAV/UDESC, em grupos de dois ou quatro animais, de acordo com o tamanho da baia. As ovelhas passaram por um período de adaptação de, no mínimo, 15 dias previamente ao início do experimento, quando receberam medicação antiparasitária (Cloridrato de Levamisol, 1ml/10kg, VO), com uma dose inicial e reforço em 15 dias. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração para ovinos e silagem de milho, além de água *ad libitum*.

## 4.3 PRÉ-OPERATÓRIO

Previamente à inclusão na pesquisa, todos os animais foram submetidos à avaliação clínica (coloração de mucosas, tempo de preenchimento capilar [TPC], temperatura retal, ausculta cardíaca e respiratória); hematológica (hemograma completo e contagem plaquetária) e bioquímica (ureia, creatinina, proteína sérica total, albumina, globulinas, aspartato amino transferase [AST], gama glutamil transferase [GGT], fosfatase alcalina [FA] e fibrinogênio), para as quais foi colhido sangue da veia jugular, em um volume de 5ml, dos quais 2ml foram utilizados para a realização de hemograma completo (tubo com EDTA) e o restante para avaliação do perfil bioquímico sérico (tubo com ativador de coágulo).

Foram obtidas radiografias pré-operatórias do membro pélvico esquerdo compreendendo o terço distal da tíbia até, aproximadamente, dois terços proximais dos metatarsos em duas incidências (dorso-plantar e médio-lateral) para que fossem excluídos indivíduos com afecções osteoarticulares que pudessem comprometer a pesquisa. Neste momento foi realizado também um exame ortopédico (movimentos de flexão/extensão dentro da normalidade), observação da deambulação dos animais e avaliação dos cascos.

Os animais foram mantidos em jejum sólido por 24 horas e hídrico por 12 horas, previamente ao procedimento cirúrgico. A tricotomia foi realizada sempre no dia anterior a cada cirurgia, e compreendia todo o membro pélvico esquerdo, desde região média da coxa até a altura dos cascos. No dia do estudo, ambos os membros pélvicos foram lavados com água morna e clorexidina, a fim de remover ao máximo as sujidades aderidas aos membros e região inguinal.

#### 4.4 PROCEDIMENTOS ANESTÉSICOS

Administrou-se como medicação pré-anestésica, 0,3mg/kg de morfina, por via IM e, após cinco minutos, 20µg/kg de detomidina, por via IV. Os animais foram induzidos com 4mg/kg de propofol, por via intravenosa, e em seguida, intubados com sonda endotraqueal tipo Murphy, de tamanho apropriado ao diâmetro traqueal. A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano em 1,3V% diluído em oxigênio a 100%, tendo sido o paciente mantido em ventilação espontânea por 30 minutos e, após, alternando aleatoriamente em outras modalidades de ventilação mecânica: ciclada a volume, pressão e pressão positiva ao final da expiração (PEEP), cada uma delas durante 30 minutos (estudo paralelo). Como protocolo analgésico, os animais receberam anestesia subaracnóidea, realizada no espaço lombo sacro L6-S1, com 0,5mg/kg de ropivacaína 0,75% e 0,1mg/kg de morfina, diluída em solução fisiológica NaCl 0,9% em volume final de 1ml/7,5kg.

#### 4.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

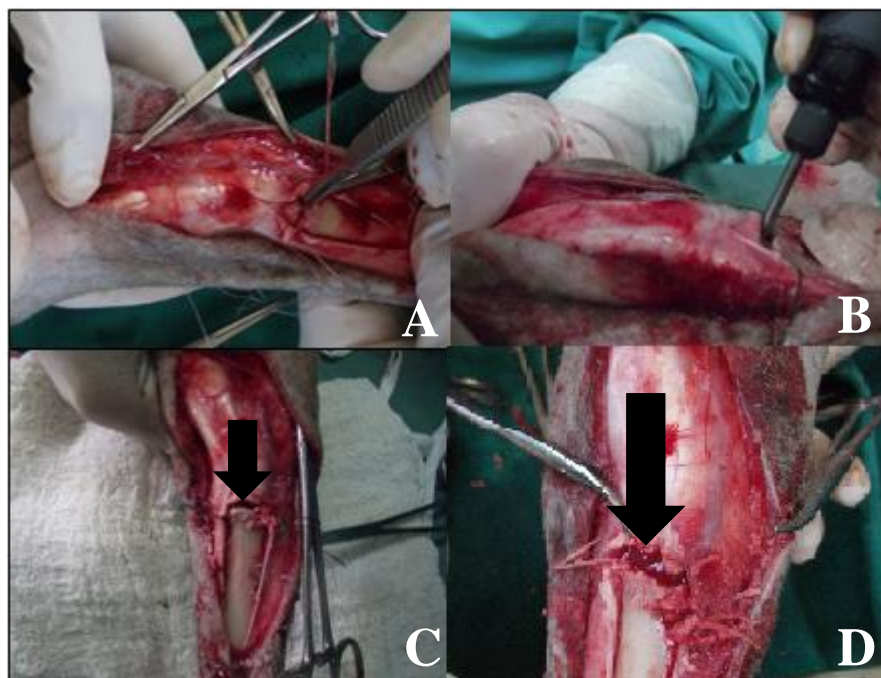
Após a indução anestésica, os animais receberam ceftriaxona sódica, na dose de 30mg/kg, por via intravenosa, a qual foi readministrada a cada 90 minutos enquanto durasse o procedimento cirúrgico.

Com o animal em decúbito lateral direito, foi realizada antisepsia do membro pélvico esquerdo em todas as suas faces desde a extremidade distal dos metatarsos, estendendo-se proximalmente até a região inguinal esquerda, empregando-se o esquema álcool-iodo-álcool. A extremidade distal do membro foi protegida por atadura estéril, enrolada e fixada ao membro por tiras de gaze estéril. Os panos de campo foram posicionados de forma a expor o membro pélvico esquerdo a partir da região distal do fêmur.

O acesso à articulação tarsometatarsal foi realizado conforme técnica descrita por PIERMATEI & JOHNSON (2004) para cães e gatos e a artrodese desta foi realizada conforme técnica e princípios descritos por LESSER (2007), também para cães e gatos. Foi realizada uma incisão na face lateral do membro pélvico esquerdo, desde o terço distal da tíbia até o terço distal do metatarso, contornando o aspecto lateral do tarso. O sangramento foi controlado com pinças hemostáticas e compressão. O tecido subcutâneo foi divulsionado até se obter a exposição completa do calcâneo. Em seguida, tomou-se o cuidado de afastar o ligamento colateral lateral, por meio de reparo com fio de seda nº 0.

A articulação tarsometatarsal foi localizada e acessada com uma lâmina de bisturi (Figura 3 A), até se obter a completa separação de suas superfícies proximal e distal. Foi realizada a curetagem das superfícies articulares com auxílio de um motor elétrico de alta rotação (Figura 3 B), a fim de se promover a destruição completa da cartilagem articular e preparar o leito (Figura 3 C) para posterior preenchimento com o biomaterial correspondente ou autoenxerto de osso esponjoso. Durante todo o desgaste articular, um auxiliar irrigou a área com solução salina estéril, com o intuito de prevenir necrose óssea por lesão térmica.

Figura 3 - (A) Acesso cirúrgico à articulação tarsometatarsal em ovinos utilizando uma lâmina de bisturi nº 10; (B) Desgaste de toda a superfície articular com motor de alta rotação; (C) Aspecto da área articular após a destruição completa das superfícies (seta). Este leito foi preenchido com um dos três tratamentos; (D) Acúmulo de sangue no leito após desbridamento da cartilagem articular (seta)



Fonte: Produção do próprio autor, 2015.

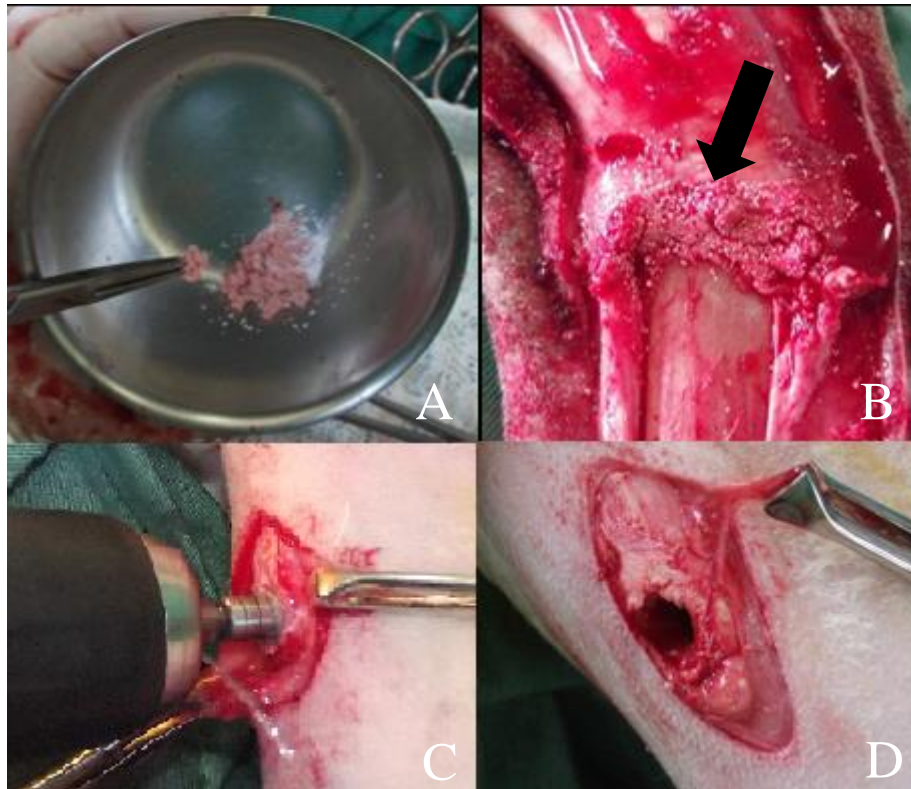
O espaço criado após a destruição da articulação tarsometatarsal teve seu tamanho padronizado, entre 5-7mm em todos os animais, sendo considerado satisfatório quando observado sangramento do osso subcondral e uma ampla área de destruição da cartilagem articular. Este espaço foi preenchido por 1,2g de biomaterial granulado esterilizado por radiação gama, HA/TCP-  $\beta$  80/20 ou HA/SiO<sub>2</sub> 5%, hidratados com sangue (Figura 4 A e B), ou ainda por osso esponjoso, coletado da crista da tíbia, em quantidade suficiente para preencher a superfície articular (Figura 4 C e D), no grupo controle. Ambos os biomateriais empregados

neste estudo apresentaram o mesmo aspecto macroscópico e o mesmo procedimento prévio à aplicação foi realizado em todos os casos. Os animais foram alocados alternadamente em três grupos: Grupo HT (n=4), que recebeu HA/TCP- $\beta$  80/20, o Grupo HS (n=4), que recebeu a composição HA/SiO<sub>2</sub> 5% e o Grupo C (n=4), que recebeu o autoenxerto (controle).

A coleta do osso esponjoso foi realizada a partir de uma incisão de, aproximadamente, 2cm na região medial proximal da tíbia esquerda, que compreendeu pele, tecido subcutâneo e perióstio. Com uma trefina, foi removido um fragmento ósseo de 6 mm de diâmetro, criando-se um defeito na crista da tíbia, através do qual pode-se coletar o tecido ósseo esponjoso com auxílio de uma cureta óssea de Spratt, em quantidade suficiente para o preenchimento do espaço articular criado cirurgicamente. Após a coleta, o fragmento ósseo foi reposicionado no defeito da tíbia e o tecido subcutâneo foi reduzido com dois pontos sultan isolados, com fio de náilon 2-0 e a dermorráfia do local de coleta foi realizada com dois ou três pontos isolados simples, utilizando o mesmo fio.



Figura 4 - (A) Hidratação do biomaterial granulado HA/TCP- $\beta$  80/20 com sangue arterial colhido no momento do preparo, para posterior implantação no espaço articular; (B) Aspecto da área articular após preenchimento com o biomaterial granulado HA/TCP-  $\beta$  80/20 (seta); (C) Uso de trefina de 6mm acoplada a uma furadeira para criar um defeito na crista da tíbia esquerda, utilizado para a coleta de osso esponjoso – notar irrigação com solução fisiológica NaCl 0,9% para evitar o superaquecimento e possível lesão aos tecidos; (D) Defeito criado na crista da tíbia esquerda, através do qual foi coletado osso esponjoso.



Fonte: Produção do próprio autor, 2015.

A estabilização da artrodese tarsometatarsal neste estudo foi obtida pela colocação de uma placa de compressão dinâmica de aço inoxidável, com 10 furos, 170 mm de comprimento, 10 mm de largura e 4 mm de espessura, moldada para acomodação no aspecto lateral da articulação, e fixada por oito parafusos corticais de 3,5mm, aplicados com compressão (Figura 5). Destes, cinco parafusos foram fixados aos metatarsos, distais à articulação, e três foram fixados ao calcâneo, portanto, proximais à articulação.

Figura 5 - Placa de compressão dinâmica aplicada na posição lateral da tíbia esquerda, como método de fixação da artrodese tarsometatarsal em ovinos. (A) Placa metálica sendo moldada para se adaptar à anatomia da região tarsal em ovinos; (B) Placa moldada posicionada no aspecto lateral da região tarsal esquerda em ovinos; (C) Fixação do primeiro parafuso para estabilização do implante metálico; (D) Aspecto final do implante, após a fixação dos oito parafusos corticais para a estabilização da artrodese tarsometatarsal em ovinos.



Fonte: Produção do próprio autor, 2015.

Após a conclusão da fixação articular, a área foi cuidadosamente lavada com solução salina estéril, a fim de remover quaisquer coágulos, debris ou resíduos de grânulos dos biomateriais que eventualmente ficassem depositados nos tecidos moles adjacentes ao defeito preenchido. A reaproximação dos planos anatômicos sobre a placa óssea foi realizada por meio de redução do tecido subcutâneo com fio de náilon 2-0, em padrão zigue-zague e a dermorrafia foi realizada com pontos isolados simples, com fio de náilon monofilamentar n°2-0.

#### 4.6 PÓS-OPERATÓRIO

No pós-operatório imediato, após o exame radiográfico, foi confeccionada uma bandagem do tipo Robert Jones modificada (Figura 6 A, B, C e D), para proteger e fornecer suporte ao membro operado. A fim de incrementar o suporte, foram criadas artesanalmente talas

a partir de chapas galvanizadas, moldadas para acompanhar a anatomia do membro, as quais foram colocadas sobre a espessa camada de algodão ortopédico, para não causar lesões no membro operado. Aos 15 dias de pós-operatório, as bandagens foram retiradas para inspeção da ferida e retirada de pontos; se não houvesse intercorrência prévia, como deslocamento da tala, ausência de apoio no membro operado, ou umidade da bandagem, este era o momento da primeira troca de tala. As trocas seguintes coincidiram com as avaliações radiográficas (aos 30 e 60 dias de pós-operatório) ou a qualquer momento, caso houvesse necessidade por qualquer uma das razões anteriormente mencionadas. Estas bandagens foram mantidas por 8 a 12 semanas, até o momento da eutanásia.

Figura 6 – Confecção da bandagem de Robert Jones modificada. (A) Primeira camada de atadura envolvendo o membro; abaixo dela, apenas duas tiras de esparadrapo, uma na face lateral e outra na face medial do membro, estendidas distalmente para formar o “estribo”; (B) Acima da atadura foi aplicada uma espessa camada de algodão ortopédico para garantir o acolchoamento da bandagem; (C) Aspecto do membro após a última camada de atadura, que recobriu o algodão ortopédico, sobre a qual foram colocadas as talas e o esparadrapo; (D) aspecto final da bandagem de Robert Jones modificada, após colocação das talas e revestimento de esparadrapo.



No período pós-operatório, os animais receberam suporte analgésico com meloxicam 0,6 mg/kg e dipirona 25 mg/kg, imediatamente ao término da cirurgia, por via intravenosa (IV). Foi mantido um cateter na veia jugular, ocluído por um plug adaptador PRN, fixado à pele por fio de náilon 2-0 em ponto de sapatilha chinesa, e envolvido por atadura e esparadrapo, para administrações intravenosas subsequentes. Foi administrado meloxicam 0,4 mg/kg a cada 24 horas, durante três dias, por via IV e dipirona 25 mg/kg a cada 8 horas durante três dias, por via IV. Após cada administração IV, o cateter foi lavado com solução heparinizada para evitar sua obstrução. Os animais receberam também antibiótico no período pós-operatório, sendo empregado 5 mg/kg de enrofloxacina, a cada 12 horas, durante 15 dias, por via SC.

#### 4.7 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Durante o estudo, o membro operado dos animais foi avaliado radiograficamente imediatamente após o término do procedimento cirúrgico e aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório. Foram obtidas imagens em duas incidências (dorso-plantar e médio-lateral) a cada avaliação e o regime empregado foi de 51 quilovolts (kV) e 1.6 miliampere (mA).

A avaliação radiográfica foi realizada mediante critérios adaptados do estudo de Albuquerque (2012), conforme tabela 1.

Tabela 1 – Escores para avaliação radiográfica da artrodese tarsometatarsal realizada experimentalmente em ovelhas, com base nos critérios de união das superfícies ósseas/presença da linha articular, qualidade do osso neoformado, aspecto e fixação da placa e parafusos e impressão global da consolidação.

Critérios para o escore	Pontos
<b>UNIÃO DAS SUPERFÍCIES ÓSSEAS/LINHA ARTICULAR</b>	
Perda do detalhe da linha articular	2
Linha articular ainda visível	1
Linha articular larga	0
<b>QUALIDADE DO OSSO NEOFORMADO</b>	
Marcante formação de novo osso, com calo formando ponte óssea	2
Formação óssea, mas com ponte óssea pobre	1
Sem neoformação óssea	0
<b>ASPECTO E FIXAÇÃO DA PLACA E PARAFUSOS</b>	
Implantes metálicos com aspecto normal	2
Lise ao redor dos parafusos	1
Afrouxamento, migração ou quebra da placa e/ou parafusos	0
<b>IMPRESSÃO GLOBAL DA CONSOLIDAÇÃO</b>	
União radiográfica	2
Evidência radiográfica de calo, mas com união incompleta	1
Mínima ou ausência radiográfica de união	0

Fonte: Adaptado de Albuquerque (2012).

Para todos os critérios descritos na tabela 1, foi atribuída uma pontuação que variou de zero a dois, sendo que quanto maior a pontuação, melhor o resultado. O resultado de cada critério foi avaliado isoladamente, não havendo, portanto, somatório entre as pontuações.

## 4.8 AVALIAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA

### 4.8.1 Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia após 60 (n=6) ou 90 (n=6) dias de pós-operatório, conforme Resolução CFMV nº1000/2012, de 11 de maio de 2012 e Resolução CONCEA nº13, de 26 de setembro de 2013, para coleta da articulação tarsometatarsal.

O protocolo empregado para a eutanásia consistiu de uma sedação prévia dos animais com 0,2 mg/kg de xilazina, por via IM; após aproximadamente 15 minutos, os animais foram induzidos com 8 mg/kg de tiopental por via IV. Na sequência, foi administrado 10ml de solução de cloreto de potássio (KCl) a 10% por via intravenosa, como agente indutor da eutanásia. Os animais foram monitorados por eletrocardiografia digital até a detecção de assistolia.

O fragmento ósseo compreendendo a articulação tarsometatarsal submetida à fixação permanente foi coletado e dividido em duas partes por meio de uma secção longitudinal, dividindo a amostra óssea em uma parte dorsal e outra plantar, sendo que uma porção foi encaminhada à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), no laboratório de Engenharia Mecânica do Centro de Ciências Tecnológicas da UDESC, Joinville/SC, e a outra para análise histológica, no laboratório de Histologia Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da UDESC, Lages/SC.

#### **4.8.2 Avaliação por Microscopia Óptica**

As amostras da articulação tarsometatarsal destinadas à análise histológica foram preservadas em formaldeído tamponado a 10%.

O processo de preparo das amostras, iniciou-se com a descalcificação em ácido nítrico a 10%, para posterior processamento 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 e depositados em lâminas histológicas. As lâminas foram coradas pelo método de hematoxilina e eosina (H&E) descrito por PROPHET et al. (1992) e observadas em microscópio óptico, para análise dos resultados. A leitura das lâminas foi realizada por um avaliador que desconhecia os tratamentos empregados.

A interpretação das análises histológicas foi realizada mediante o emprego de critérios modificados do estudo de Costa et al., (2015). Os critérios analisados foram: proporção de biomaterial remanescente, osso esponjoso remanescente, cartilagem remanescente, neoformação de tecido ósseo, deposição de fibras colágenas, osso primário, osso secundário, tecido fibroso, fibrocartilagem e grau de maturação, sendo, para cada critério, atribuído um número de cruzes correspondente à proporção observada, conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 – Critérios semi-quantitativos da proporção de biomaterial remanescente (BR), osso esponjoso remanescente (OER), cartilagem remanescente (CR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), osso secundário (OS), tecido fibroso (TF), fibrocartilagem (FC) e grau de maturação (GM) utilizados para análise por microscopia óptica.

	BR	OER	CR	NTO	DFC	OP	OS	TF	FC	GM
Ausente	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leve	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Moderado	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Acentuado	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Muito acentuado	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Fonte: Modificado de Costa et al., (2015).

#### 4.8.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os estudos de caracterização morfológica e microestrutural dos biomateriais HA/TCP- $\beta$  80/20 e HA/SiO<sub>2</sub> 5% foram realizados previamente à sua implantação *in vivo*.

Amostras da articulação tarsometatarsal coletadas no momento da eutanásia dos animais, aos 60 e 90 dias após o procedimento cirúrgico, foram destinadas à análise por microscopia eletrônica de varredura, nos três grupos. As amostras conservadas em formol a 10% foram submetidas a um rigoroso processo de desidratação em álcool 70% e 100%, que teve duração de, aproximadamente, cinco dias. Após, passaram por um processo de diafanização em xilol durante um período que variou de 8-24 horas, conforme a espessura da amostra em questão, e então, retornaram 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, foi feita uma pequena fissura na amostra, a fim de desenvolver um ponto de fragilidade, que permitiu 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 metalizador 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 ajuda da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), com o equipamento marca ZEISS modelo DSM 940A, através do método por elétrons secundários (SE) e retro-espelhados (BSE), com distância de trabalho entre 15 e 10mm e tensão de aceleração dos elétrons entre 20 kV.

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. Esta análise foi complementar à análise histológica, sendo realizada por amostragem, ou seja, apenas uma amostra articular de cada grupo foi analisada por este método.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do software computacional (Sigma stat for Windows, versão 12). Os dados histológicos, obtidos por meio de avaliação subjetiva não paramétrica, foram, primeiramente, submetidos ao teste Shapiro-Wilk para análise de normalidade. Após, para avaliação entre grupos, foram submetidos ao teste de Friedman seguido pelo teste de Tukey, sendo considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ . A avaliação do osso esponjoso remanescente (OER) foi submetido ao teste de Mann Whitney Rank Sum Test e considerado significativo quando  $p \leq 0,05$ .



## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

No período pós-operatório, todos os animais se alimentaram normalmente, após a recuperação anestésica.

As bandagens de Robert Jones modificadas, mantidas durante todo o período do estudo, se mostraram efetivas e de fácil adaptação por parte dos animais (figura 7 A e B).

Figura 7 - Ovinos submetidos à artrodese tarsometatarsal esquerda, após a colocação da bandagem de Robert Jones modificada. (A) Ovino no segundo dia de pós-operatório. Animal apoia o membro normalmente. (B) Animais aos 30 dias de pós-operatório, após exame radiográfico e substituição da bandagem.



Fonte: Produção do próprio autor, 2015.

Aos 15 dias de pós-operatório, foi constatado que um animal do grupo controle estava evitando apoiar o membro pélvico esquerdo. No momento da retirada da tala para subseqüente retirada de pontos, observou-se que a mesma havia se deslocado parcialmente. Na região da crista da tíbia, área de coleta do osso esponjoso, foi observada a presença de reação periosteal com formação de calo ósseo, e sensibilidade à palpação. Foi realizada massagem com dimetilsulfóxido (DMSO) e a tala foi refeita. O animal recebeu uma dose de meloxicam para controle da dor e do processo inflamatório e, no dia seguinte, o animal já estava deambulando normalmente. A taxa de complicações relacionadas à coleta de osso esponjoso no presente estudo, portanto, foi de 25%.

Um animal do grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 apresentou crepitação na região da articulação tarsometatarsal, também aos 15 dias de pós-operatório, no momento da troca de tala e retirada de pontos. Foi realizado um exame radiográfico para acompanhamento, o qual demonstrou

movimentação da placa em função do afrouxamento dos parafusos localizados no calcâneo, resultando no afastamento desta das superfícies ósseas. A extremidade proximal da placa, localizada sobre o calcâneo, rompeu a pele e ficou exposta. Este animal recebeu antibioticoterapia por 21 dias, uma semana a mais do que os demais animais, com enrofloxacin 5mg/kg, a cada 12 horas por via SC e meloxicam por mais dois dias, após a troca da tala. Aos 32 dias de pós-operatório, o animal apresentou claudicação e a exposição da placa óssea aumentou, portanto foi reiniciada a terapia analgésica com meloxicam e dipirona durante dois dias e antibioticoterapia por mais cinco dias. Este animal foi submetido a exames radiográficos aos 35 e 45 dias de pós-operatório, além dos tempos padronizados no estudo. Clinicamente, apresentava-se bem, com deambulação, alimentação e comportamento normais, sendo, portanto, mantido no estudo. Após a eutanásia, aos 60 dias de pós-operatório, a artrodese estava consolidada e macroscopicamente normal.

Os demais animais submetidos a este estudo apresentaram uma recuperação sem complicações, com apoio normal do membro operado, sem sinais de dor, contaminação da ferida e exposição da placa óssea.

## 5.2 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Em todos os animais, exceto um, do grupo HA/TCP- $\beta$  80/20, houve uma boa estabilização do implante, sem sinais de reabsorção óssea, osteomielite ou qualquer complicação. Em todos os momentos, foram obtidas radiografias em duas incidências: dorso-plantar e médio-lateral, a fim de identificar, com precisão, qualquer alteração que pudesse se manifestar no período pós-operatório

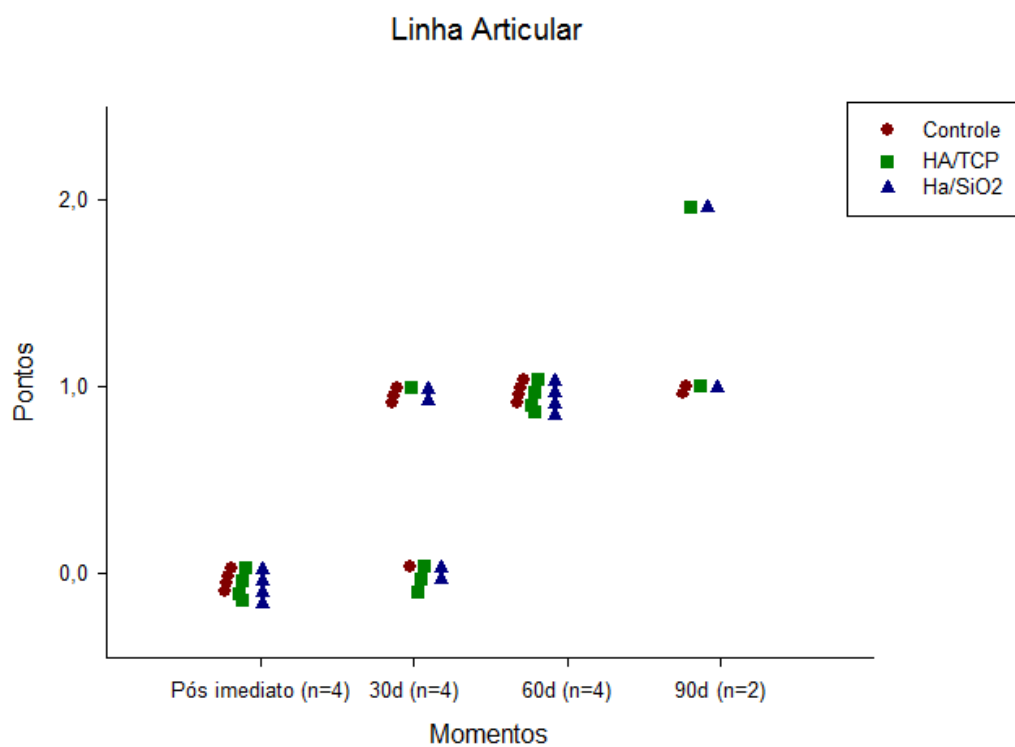
Em um animal do grupo HA/TCP- $\beta$  80/20, eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório, foi observado afastamento da placa de compressão dinâmica da superfície óssea e frouxidão dos parafusos corticais fixados no calcâneo; estes, na radiografia obtida no pós-operatório imediato, encontravam-se fixados às duas corticais (lateral e medial) do osso, enquanto na imagem obtida aos 30 dias estavam fixados apenas à cortical lateral, demonstrando que houve movimentação dos implantes. Na última imagem radiográfica obtida, aos 60 dias de pós-operatório, observou-se que os parafusos permaneceram fixados à cortical lateral do calcâneo.

Os resultados obtidos pela avaliação radiográfica estão demonstrados nos gráficos apresentados nas figuras 8 a 11, segundo os critérios: união das superfícies ósseas/linha articular

(figura 8), qualidade do osso neoformado (figura 9), aspecto e fixação da placa e parafusos (figura 10) e impressão global da consolidação (figura 11).

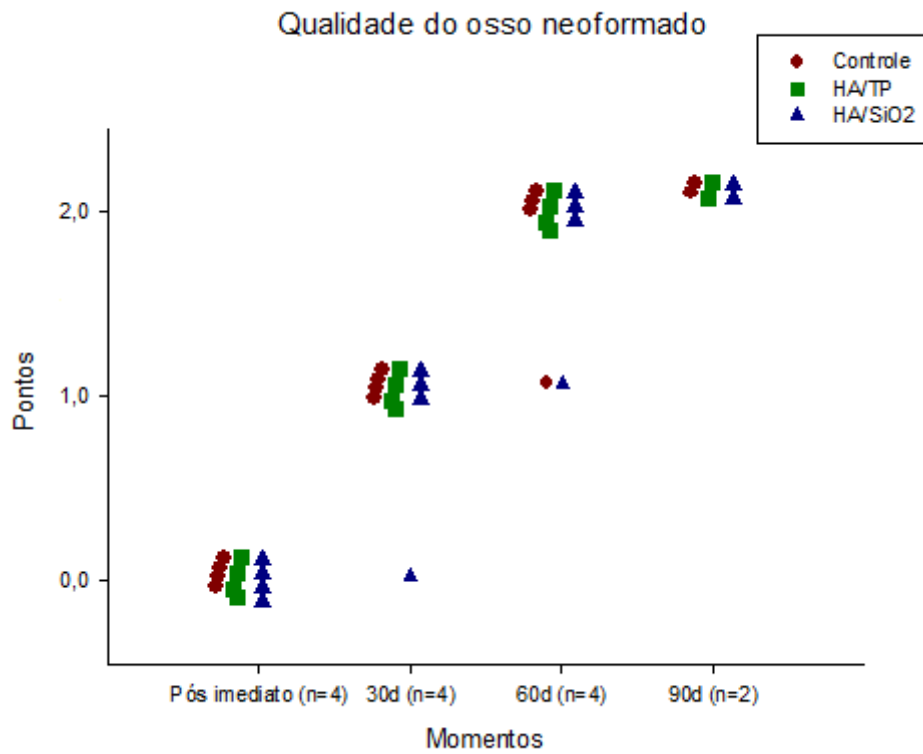
Na avaliação radiográfica referente ao aspecto e fixação da placa e parafusos, observou-se que o animal do grupo HA/TCP- $\beta$  80/20, que apresentou frouxidão dos implantes com deslocamento da placa, foi responsável pelo importante desvio inferior nos valores do grupo. Entretanto, nas avaliações referentes à união das superfícies ósseas/linha articular, qualidade do osso neoformado e impressão global da consolidação, pode-se observar que esta complicação não comprometeu a consolidação articular.

Figura 8 - Representação gráfica da pontuação atribuída para o critério “União das Superfícies Ósseas/Linha Articular” na avaliação radiográfica de artrose tarsometatarsal induzida experimentalmente em ovinos (comparação entre grupos), com base nos critérios adaptados do estudo de Albuquerque (2012).



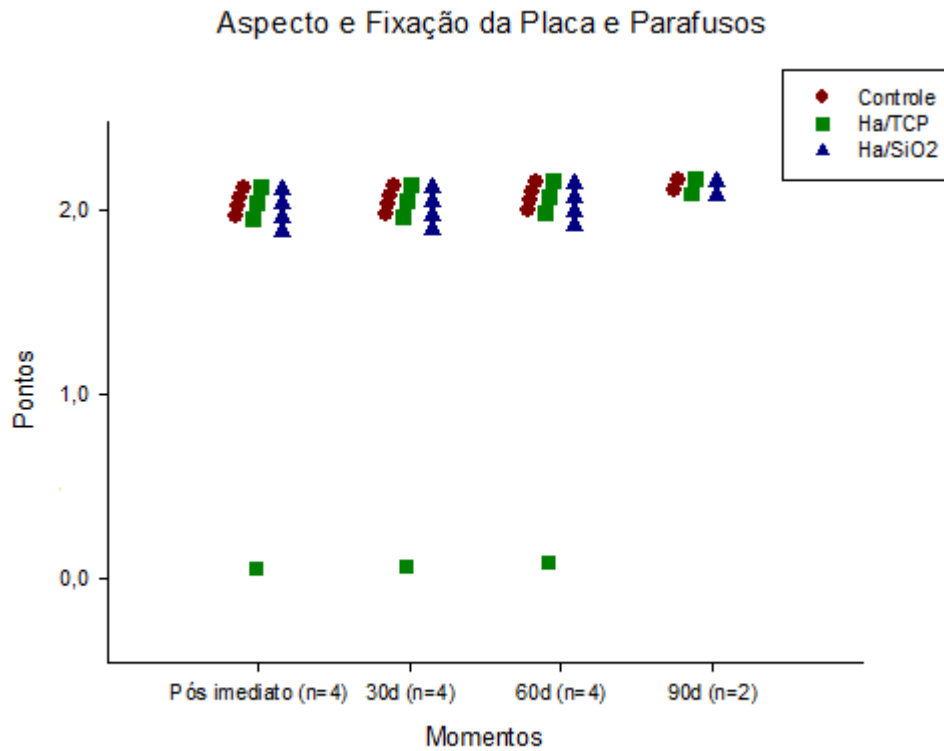
Fonte: 0= linha articular larga, 1= linha articular ainda visível, 2= perda do detalhe da linha articular. Produção do próprio autor, 2017.

Figura 9 - Representação gráfica da pontuação atribuída para o critério “Qualidade do Osso Neoformado” na avaliação radiográfica de artrodese tarsometatarsal induzida experimentalmente em ovinos (comparação entre grupos), com base nos critérios adaptados do estudo de Albuquerque (2012).



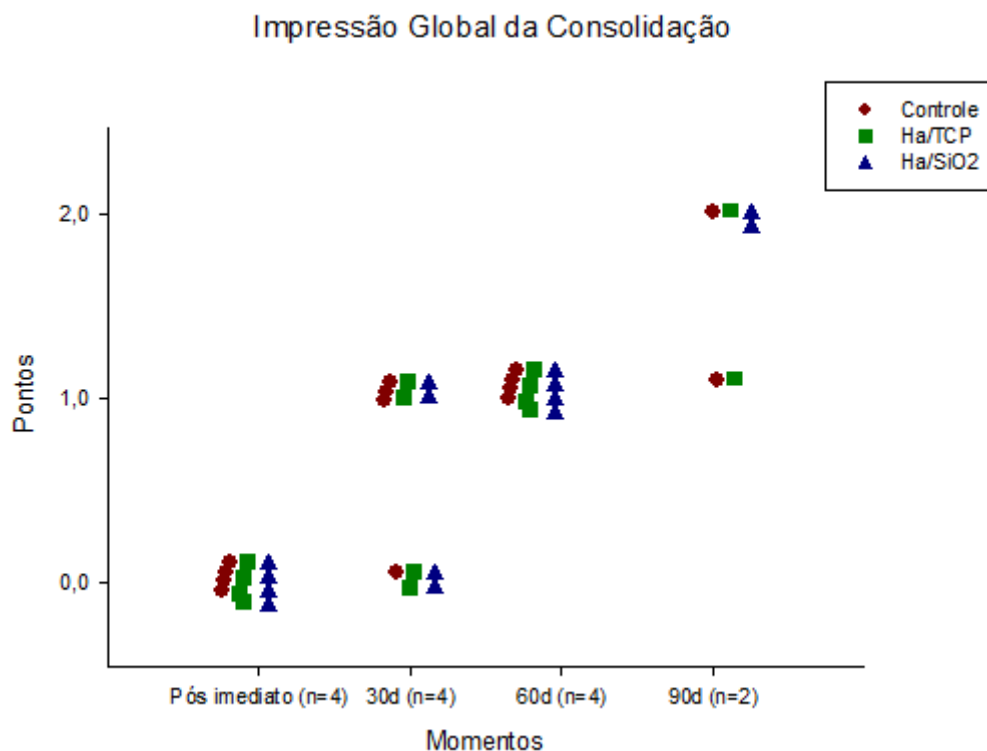
Fonte: 0= sem neoformação óssea, 1= formação óssea com ponte óssea pobre, 2= marcante formação de novo osso, com calo formando ponte óssea. Produção do próprio autor, 2017.

Figura 10 - Representação gráfica da pontuação atribuída para o critério “Aspecto e Fixação da Placa e Parafusos” na avaliação radiográfica de artrodese tarsometatarsal induzida experimentalmente em ovinos (comparação entre grupos), com base nos critérios adaptados do estudo de Albuquerque (2012).



Fonte: 0= afrouxamento, migração ou quebra da placa e/ou parafusos, 1= lise ao redor dos parafusos, 2= implantes metálicos com aspecto normal. Produção do próprio autor, 2017.

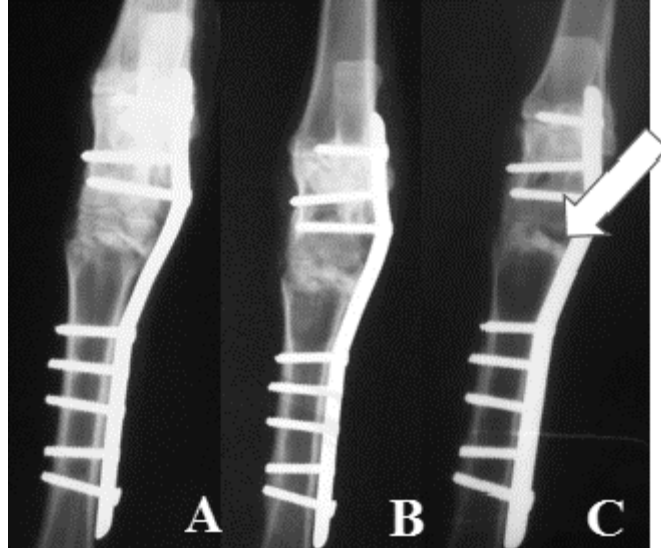
Figura 11 - Representação gráfica da pontuação atribuída para o critério “Impressão Global da Consolidação” na avaliação radiográfica de artrose tarsometatarsal induzida experimentalmente em ovinos (comparação entre grupos), com base nos critérios adaptados do estudo de Albuquerque (2012).



Fonte: 0= mínima ou ausência radiográfica de união, 1= evidência radiográfica de calo, mas com união incompleta, 2= união radiográfica. Produção do próprio autor, 2017.

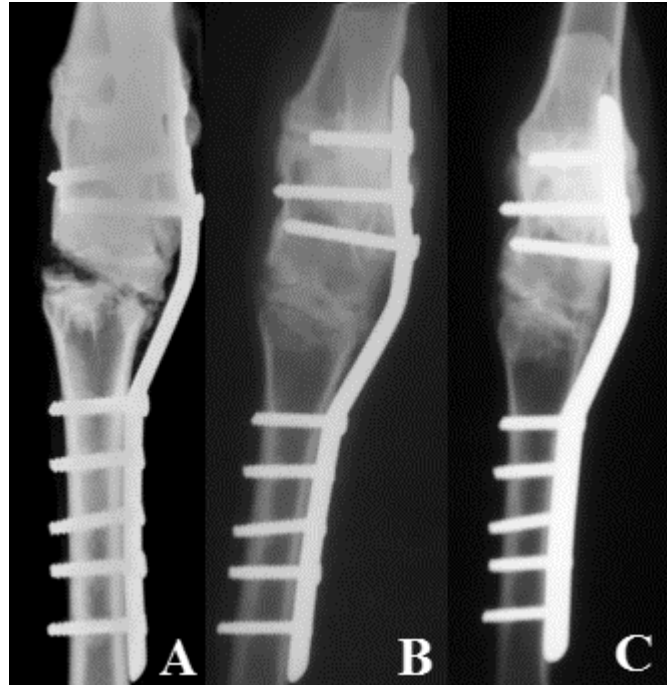
As figuras 12, 13 e 14 ilustram os resultados radiográficos obtidos com o Grupo HT (HA/TCP- $\beta$ ), Grupo HS (HA/SiO<sub>2</sub> 5%) e Grupo C (autoenxerto), respectivamente, no pós-operatório imediato e aos 60 e 90 dias.

Figura 12 – Radiografias do Grupo HT (HA/TCP- $\beta$  80/20) no pós-operatório imediato (A), aos 60 dias de pós-operatório (B) e aos 90 dias de pós-operatório (C). Notar área de radiopacidade acentuada aos 90 dias de pós-operatório (seta), característica da alta concentração de hidroxiapatita deste composto.



Fonte: Produção do próprio autor, 2015.

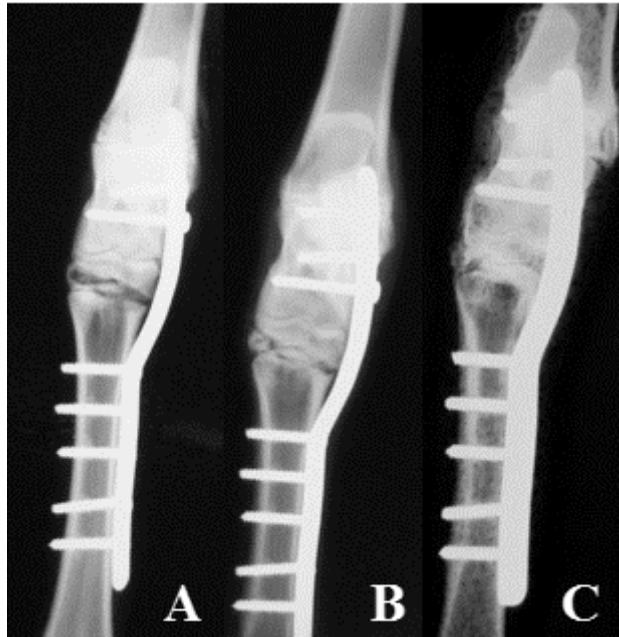
Figura 13 – Radiografias do Grupo HS (HA/SiO<sub>2</sub> 5%) no pós-operatório imediato (A), aos 60 dias de pós-operatório (B) e aos 90 dias de pós-operatório (C). Observar o fechamento gradativo da linha articular com o passar do tempo.



Fonte: Produção do próprio autor, 2015.



Figura 14 – Radiografias do Grupo C (autoenxerto) no pós-operatório imediato (A), aos 60 dias de pós-operatório (B) e aos 90 dias de pós-operatório (C).



Fonte: Produção do próprio autor, 2015.

No período pós-operatório imediato, foi observada a presença de uma linha articular larga, preenchida por uma substância radiopaca (biomateriais ou osso esponjoso), sem neoformação óssea estabelecida. O aspecto da placa e dos parafusos se mostrou adequado desde o início, conforme demonstrado nas imagens dos três diferentes grupos.

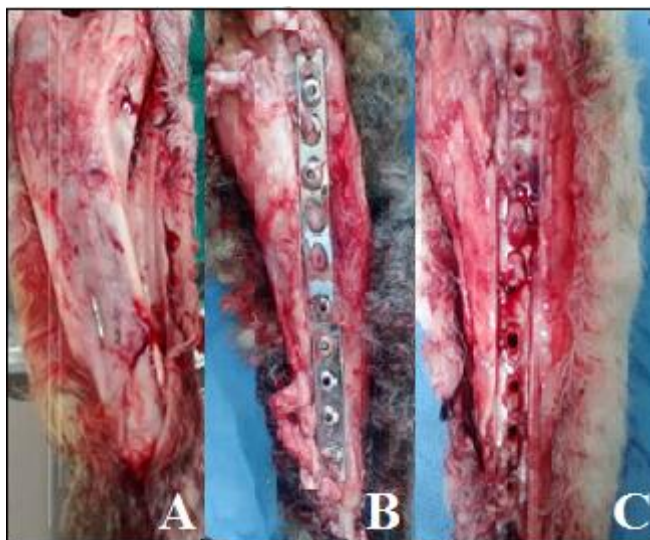
Aos 60 dias de pós-operatório, foi possível observar uma reorganização tecidual, com fechamento progressivo da linha articular, mas ainda com evidência desta, além de incremento na radiopacidade, sugestiva de início de neoformação óssea. Não foram observadas diferenças marcantes entre os três grupos avaliados no que concerne aos aspectos radiográficos pós-operatórios.

Aos 90 dias de pós-operatório, ainda foi observada a presença da linha articular, porém reduzida em relação aos momentos anteriores. No grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 pode-se notar uma área radiopaca sugestiva da presença de biomaterial remanescente, o que não demonstrou comprometer a neoformação óssea. No grupo HA/SiO<sub>2</sub> 5%, a radiopacidade foi menos evidente, e havia um aspecto de marcante neoformação óssea. Nos três grupos, foi possível identificar presença de calo ósseo, mas sem a união óssea completa.

### 5.3 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Após as eutanásias, todos os animais, aos 60 e 90 dias de pós-operatório, apresentaram boa consolidação óssea, o foco da artrodese permaneceu firme, sem nenhum sinal de movimentação ou crepitação, quando manipulado pelo avaliador (Figura 15). O aspecto macroscópico da região coletada foi idêntico para todos os animais, em ambos os momentos.

Figura 15 - Aspecto macroscópico *post mortem* da região lateral do tarso e metatarsos de ovinos submetidos à artrodese tarsometatarsal esquerda. (A) Aspecto da placa após o acesso à área cirúrgica. Notar intensa cobertura de tecido mole e fibroso sobre a placa. (B) Aspecto após a remoção de tecidos moles e fibroso envolvendo o implante metálico. (C) Aspecto dos ossos após a remoção da placa de compressão dinâmica.



Fonte: Produção do próprio autor, 2015.

A placa de compressão dinâmica ficou intensamente coberta por tecido mole e fibroso, dificultando sua remoção. Esses tecidos foram removidos mecanicamente com lâmina de bisturi e, em seguida, foram retirados os implantes metálicos. Ato contínuo, foi realizada intensa manipulação da área articular estabilizada cirurgicamente e testes de força manuais, realizados sempre pelo mesmo avaliador, foram exercidos sobre a região, confirmando a estabilidade articular e o resultado positivo obtido com a técnica cirúrgica empregada.

### 5.4 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

A descrição dos resultados histológicos foi realizada por um avaliador cego aos tratamentos, que atribuiu um número de cruzes para as lâminas de cada animal, com base nos

seguintes critérios: biomaterial remanescente, osso esponjoso remanescente, cartilagem remanescente, osso primário, osso secundário, fibrocartilagem, tecido fibroso e grau de maturação.

Com base no número de cruzes atribuídas para cada critério em cada animal, foi dado o valor numérico correspondente e realizada a média aritmética para cada grupo, a fim de simplificar a interpretação dos resultados, os quais estão demonstrados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Mediana (mínimo e máximo) dos valores obtidos por grupo após a análise histológica, com base nos critérios semi-quantitativos analisados: biomaterial remanescente (BR), osso esponjoso remanescente (OER), cartilagem remanescente (CR), osso primário (OP), osso secundário (OS), fibrocartilagem (FC), tecido fibroso (TF) e grau de maturação (GM), em ovinos eutanasiados após 60 dias de pós-operatório.

GRUPO	BR	OER	CR	OP	OS	FC	TF	GM
HA/TCP- $\beta$ 80/20	3,5 (3 – 4)	0	1,5 (1-2)	3 (3-3)	1 (1-1)	1 (1-1)	3 (3-3)	3 (3-3)
HA/SiO <sub>2</sub> a 5%	4 (4 – 4)	0	0,5 (0 – 1)	2 (2 – 2)	2 (2 – 2)	1,5 (1 – 2)	2,5 (2 – 3)	2,5 (2 – 3)
CONTROLE	0	2,5 (2 – 3)	2 (2 – 2)	2 (2 – 2)	2 (2 – 2)	1 (1 – 1)	2,5 (2 – 3)	2,5 (2 – 3)

Fonte: HA/TCP- $\beta$  80/20 (80% hidroxiapatita/20% tricálcio fosfato- $\beta$ ); HA/SiO<sub>2</sub> a 5% (hidroxiapatita e sílica a 5%). Teste de Friedman seguido pelo teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ . Para a avaliação do OER, foi realizado o teste de Mann Whitney Rank Sum Test ( $p \leq 0,05$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos. Produção do próprio autor, 2017.

Aos 60 dias de pós-operatório, ainda foi observada uma quantidade de biomaterial remanescente, que variou de acentuada a muito acentuada, em ambos os grupos preenchidos por uma composição à base de fosfatos de cálcio; no grupo controle, foram detectados resquícios de osso esponjoso, cuja presença foi descrita como moderada a acentuada. A formação óssea, avaliada conforme a observação de osso primário e secundário, foi semelhante nos três grupos aos 60 dias, considerada, de maneira geral, de moderada a acentuada. Da mesma forma, a formação de tecido fibroso foi uniforme em todos os animais, sendo observado graus variáveis de organização, com regiões de tecido fibroso em maturação e outras com o tecido maduro. Foi observada a presença leve a moderada de cartilagem remanescente nestes animais.

Tabela 4 – Mediana (mínimo e máximo) dos valores obtidos por grupo após a análise histológica, com base nos critérios semi-quantitativos analisados: biomaterial remanescente (BR), osso esponjoso remanescente (OER), cartilagem remanescente (CR), osso primário (OP), osso secundário (OS), fibrocartilagem (FC), tecido fibroso (TF) e grau de maturação (GM), em ovinos eutanasiados aos 90 dias de pós-operatório.

GRUPO	BR	OER	CR	OP	OS	FC	TF	GM
HA/TCP- $\beta$ 80/20	2,5 (2-3)	0	1,5 (0-3)	2 (2-2)	2 (2-2)	0,5 (0-1)	2,5 (2-3)	2 (2-2)
HA/SiO <sub>2</sub> a 5%	1,5 (1-2)	0	2,5 (2-3)	2,5 (2-3)	2,5 (2-3)	0,5 (0-1)	3 (3-3)	3 (3-3)
CONTROLE	0	0,5 (0-1)	1,5 (1-2)	2,5 (2-3)	2 (2-2)	1 (0-2)	2,5 (2-3)	2,5 (2-3)

Fonte: HA/TCP- $\beta$  80/20 (80% hidroxiapatita/20% tricálcio fosfato- $\beta$ ); HA/SiO<sub>2</sub> a 5% (hidroxiapatita e sílica a 5%). Teste de Friedman seguido pelo teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ . Para a avaliação do OER, foi realizado o teste de Mann Whitney Rank Sum Test ( $p \leq 0,05$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos. Produção do próprio autor, 2017.

Aos 90 dias, a quantidade observada de biomaterial remanescente foi reduzida variando entre leve a moderada no grupo HA/SiO<sub>2</sub> e moderada a acentuada no grupo HA/TCP- $\beta$  80/20; a redução mais evidente foi observada no primeiro. No grupo controle, por sua vez, houve redução na proporção de osso esponjoso remanescente observado, variando de ausente a leve. A formação óssea se mostrou ainda entre moderada e acentuada nos três grupos, não sendo observado uma diferença marcante entre os dois tempos analisados.

#### 5.4.1 HA/TCP- $\beta$ 80/20

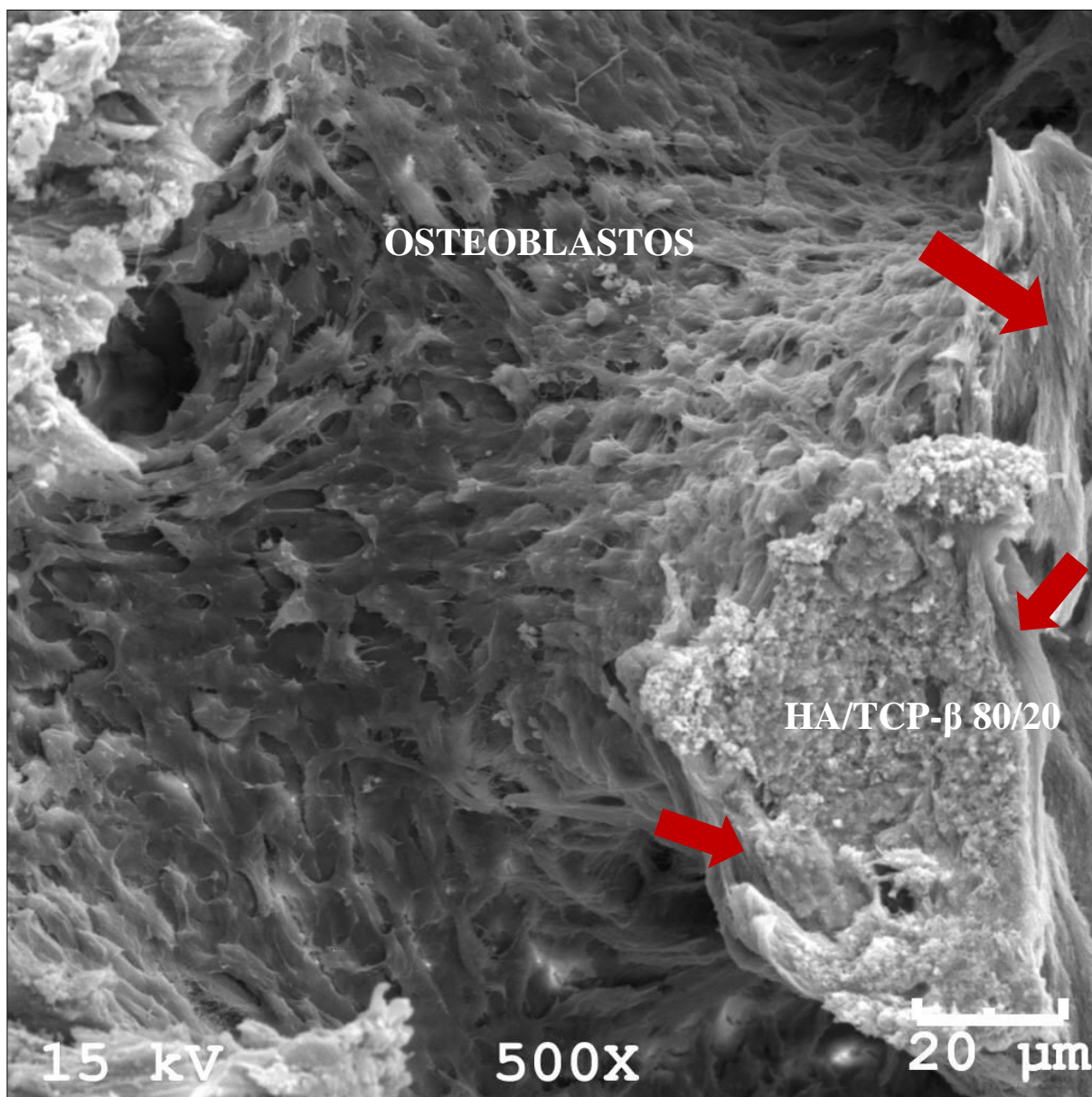
Aos 60 dias de pós-operatório, os animais do grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 apresentaram uma quantidade de biomaterial remanescente que variou de acentuada a muito acentuada, conforme demonstrado pela análise histológica na figura 16. Embora marcante a presença do biomaterial remanescente, é possível observar neoformação óssea ao redor dos grânulos na microscopia eletrônica de varredura (MEV), demonstrado na figura 17, indicando alta biocompatibilidade e capacidades osteoindutiva e osteocondutiva.

Figura 16 - Análise histológica demonstrando presença acentuada de biomaterial remanescente no grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 aos 60 dias de pós-operatório. Observar que apesar da grande quantidade de grânulos, há presença de osso primário ao redor destes, indicando neoformação óssea.



Fonte: produção do próprio autor, 2016. BR=biomaterial remanescente; OP=osso primário; OS=osso secundário; TF=tecido fibroso. H&E, aumento 100x.

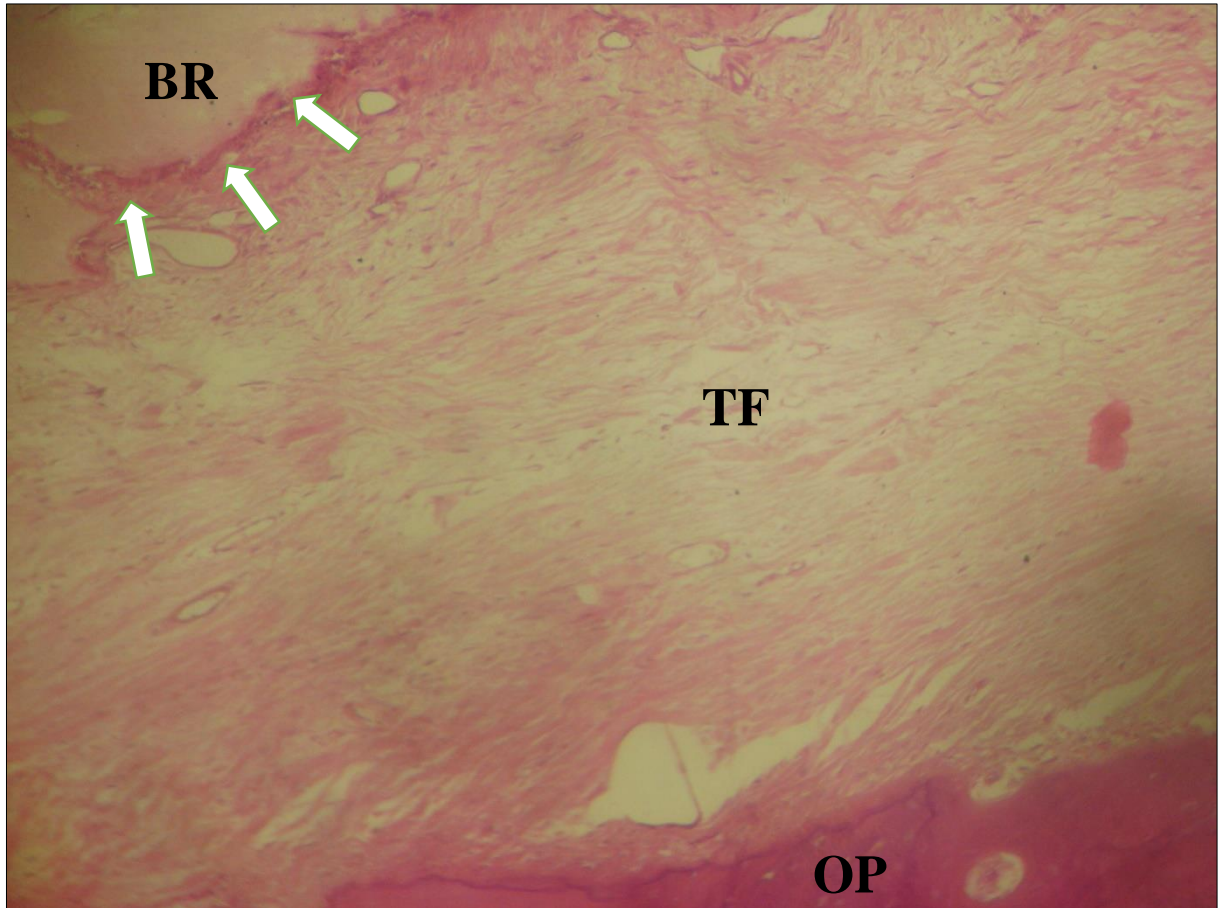
Figura 17 - Análise por MEV demonstrando a presença marcante de osteoblastos, indicando processo de neoformação óssea ativo, com tecido ósseo neoformado envolvendo um grânulo de biomaterial remanescente (setas vermelhas) do grupo HA/TCP- $\beta$  80/20, em ovinos aos 60 dias de pós-operatório.



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT – Joinville, 2016. Aumento 500x.

A presença de tecido fibroso também fica evidente e se apresenta em diferentes graus de maturação. Na figura 18, através da análise histológica é possível observar uma vasta área preenchida por tecido fibroso maduro e organizado, em contato direto com áreas de neoformação óssea, representadas pelo tecido ósseo primário.

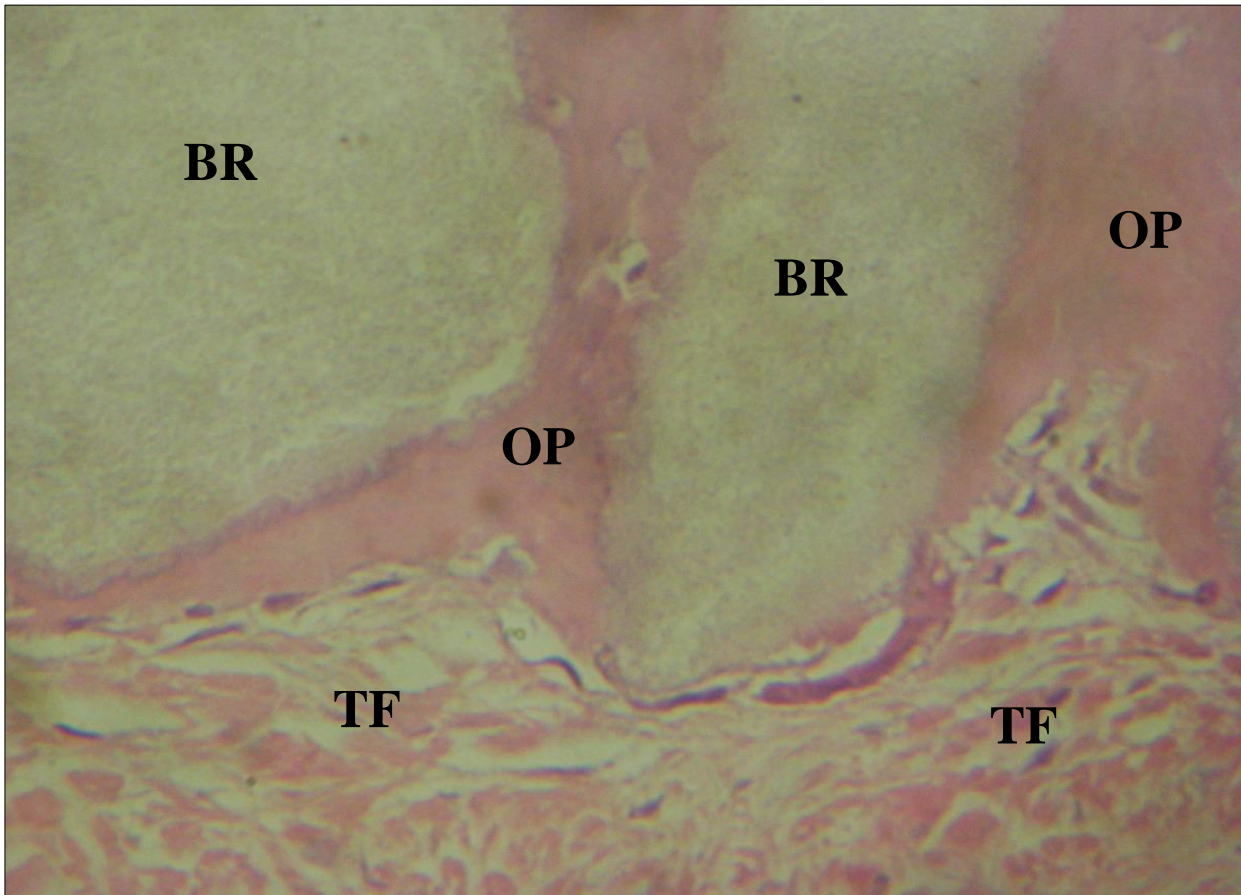
Figura 18 - Análise histológica do grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 aos 60 dias de pós-operatório. Observar a acentuada presença de tecido fibroso (TF) organizado (maduro) e a neoformação óssea, demonstrada pelas regiões com tecido ósseo primário (OP) e pela formação óssea adjacente ao grânulo de biomaterial remanescente (BR), indicada pelas setas brancas.



Fonte: produção do próprio autor, 2016. BR=biomaterial remanescente, OP=osso primário, TF=tecido fibroso. H&E, aumento 100x.

Aos 90 dias de pós-operatório, este grupo ainda apresentou quantidade de biomaterial remanescente moderada a acentuada, e uma evidente neoformação óssea ao redor de seus grânulos (figuras 19, 20 e 21). Esta, pode ser visualizada também ao longo do campo da microscopia óptica, pela presença de osso primário (jovem) com presença marcante de osteócitos (figura 22).

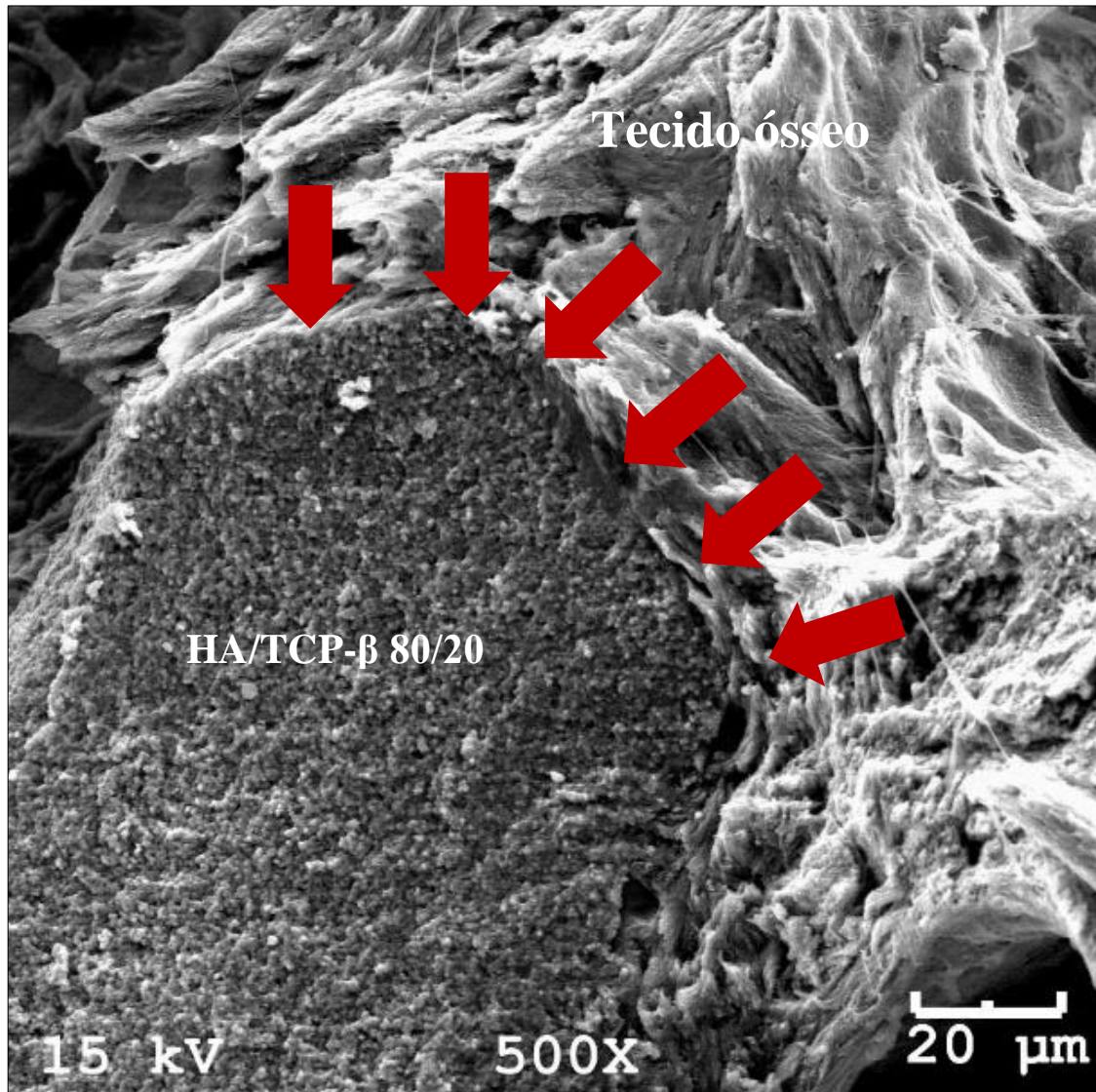
Figura 19 - Análise histológica demonstrando a presença de grânulos de biomaterial remanescente aos 90 dias de pós-operatório no grupo HA/TCP- $\beta$  80/20. Notar que estes grânulos estão envolvidos por tecido ósseo primário, demonstrando a neoformação óssea; presença de tecido fibroso desorganizado adjacente aos grânulos.



Fonte: produção do próprio autor, 2016. BR=biomaterial remanescente; OP=osso primário; TF=tecido fibroso. H&E, aumento 400x.

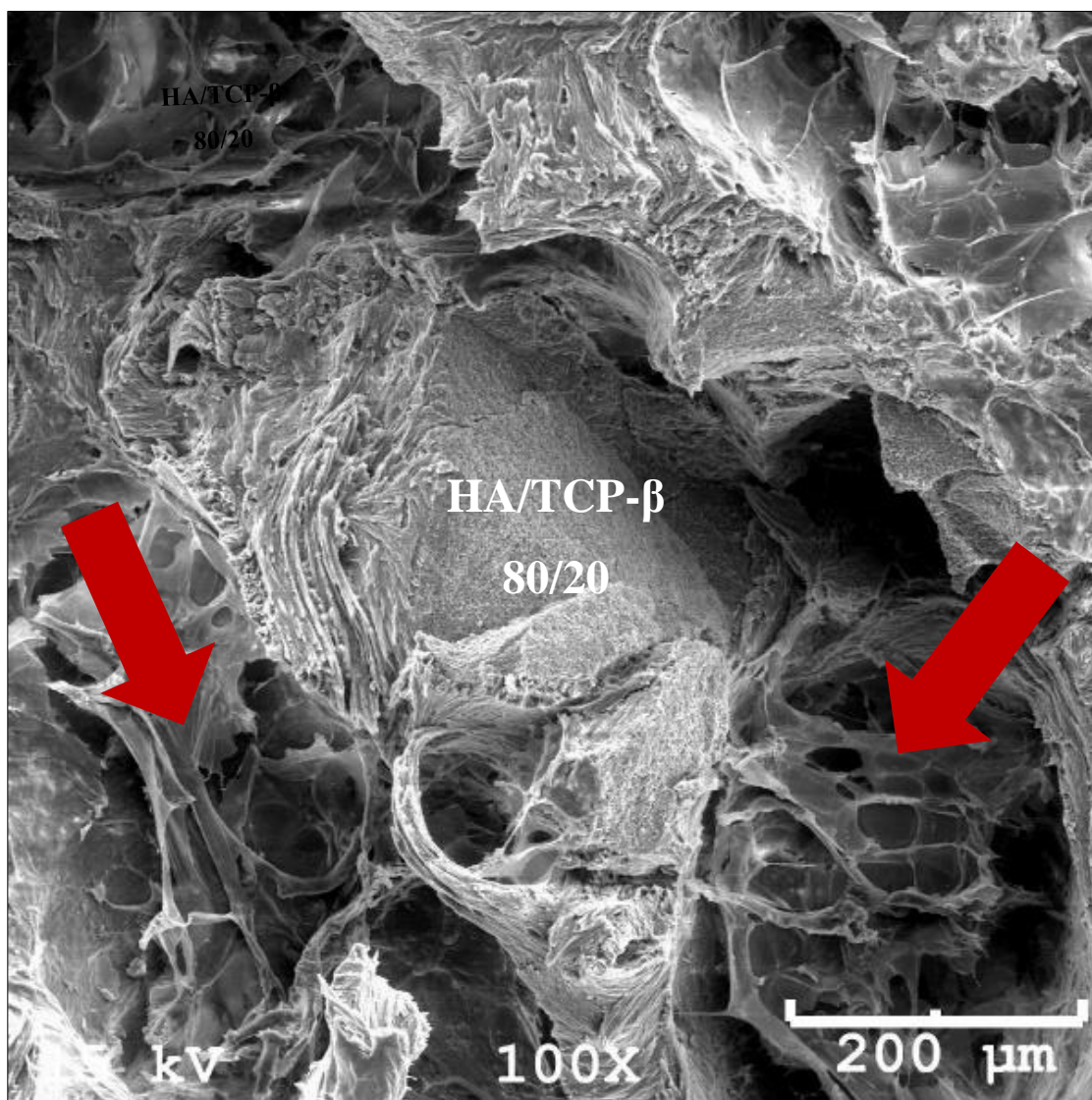


Figura 20 - Imagens da MEV evidenciando um grânulo de biomaterial remanescente do grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 envolvido por tecido ósseo neoformado, aos 90 dias de pós-operatório. As setas vermelhas indicam a zona de interface entre o biomaterial e o tecido ósseo neoformado, caracterizando a capacidade osteointegrativa destes compostos.



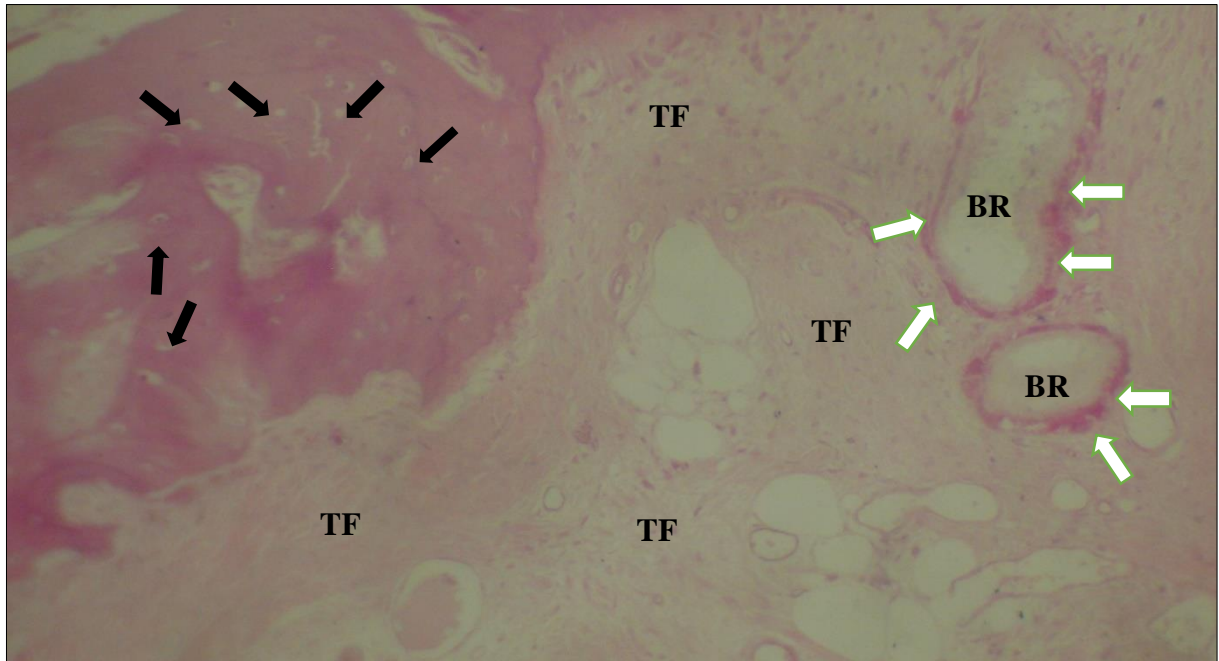
Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT – Joinville, 2016. Aumento 500x.

Figura 21 - A presença de tecido fibroso (setas vermelhas) é identificada também pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) aos 90 dias de pós-operatório do grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 (B).



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT – Joinville, 2016. Aumento 100x.

Figura 22 - Análise histológica do grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 aos 90 dias de pós-operatório, demonstrando área de neoformação óssea com presença abundante de osteócitos (setas pretas) e neoformação óssea ao redor dos grânulos de biomaterial remanescente (setas brancas).



Fonte: produção do próprio autor, 2016. BR=biomaterial remanescente, TF=tecido fibroso. H&E, aumento 100x.

#### 5.4.2 HA/SiO<sub>2</sub> a 5%

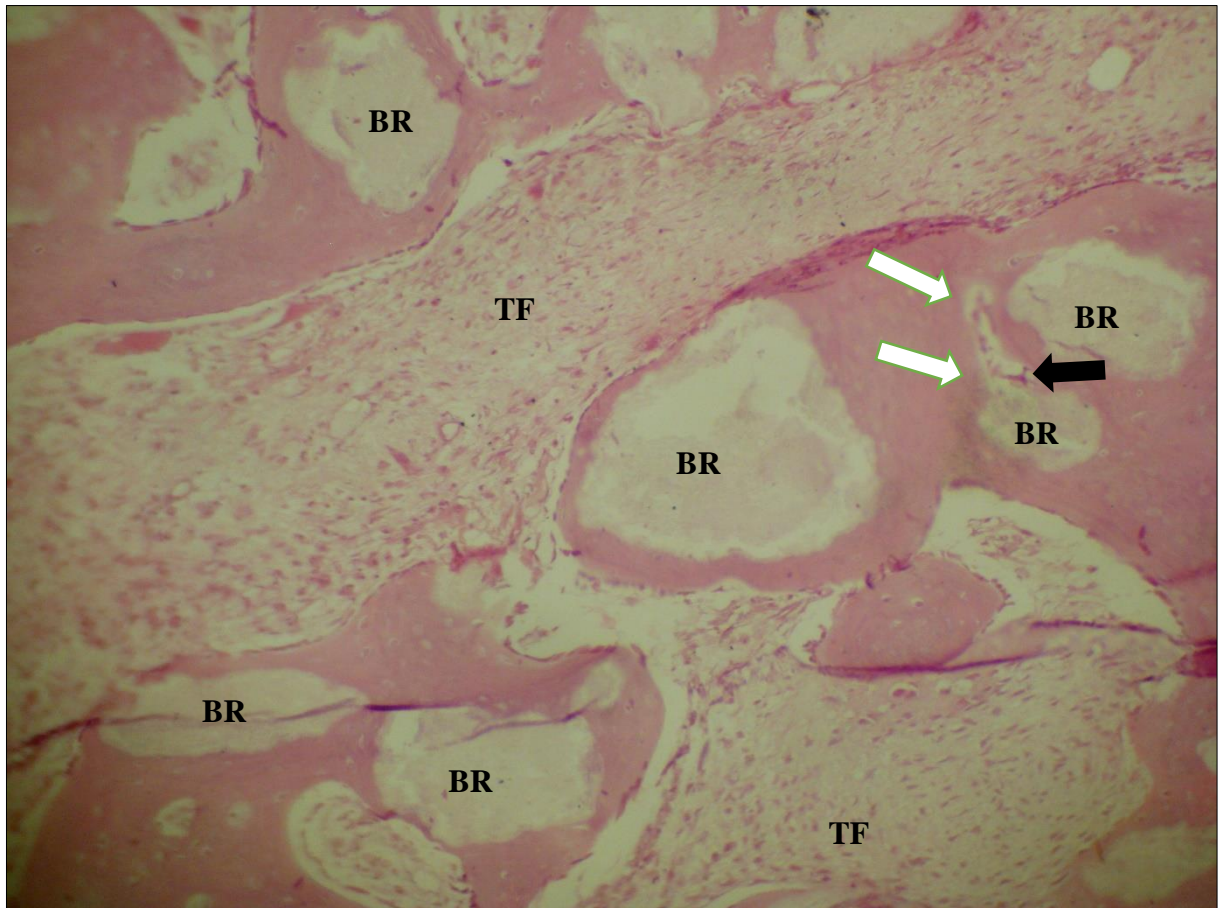
Aos 60 dias de pós-operatório, a presença de biomaterial remanescente no grupo HA/SiO<sub>2</sub> a 5% foi considerada muito acentuada, de acordo com as imagens histológicas (figuras 23 e 24). A neoformação óssea nesse grupo foi considerada moderada neste momento, entretanto, foi observada a presença de tecido ósseo primário e secundário em proporções semelhantes. Na MEV, é possível identificar grânulos do biomaterial remanescente envolvidos por tecido ósseo neoformado, além de grande presença de osteoblastos, indicando atividade osteoprogenitora (figura 25 e 26).

Figura 23 - Análise histológica demonstrando uma presença muito acentuada de biomaterial remanescente aos 60 dias de pós-operatório no grupo HA/SiO<sub>2</sub> a 5%. A neoformação óssea também é evidente, com observação de osso primário e secundário desenvolvendo-se a partir dos grânulos. Entremeados ao tecido ósseo e ao biomaterial remanescente, pode ser observada a presença de tecido fibroso desorganizado.



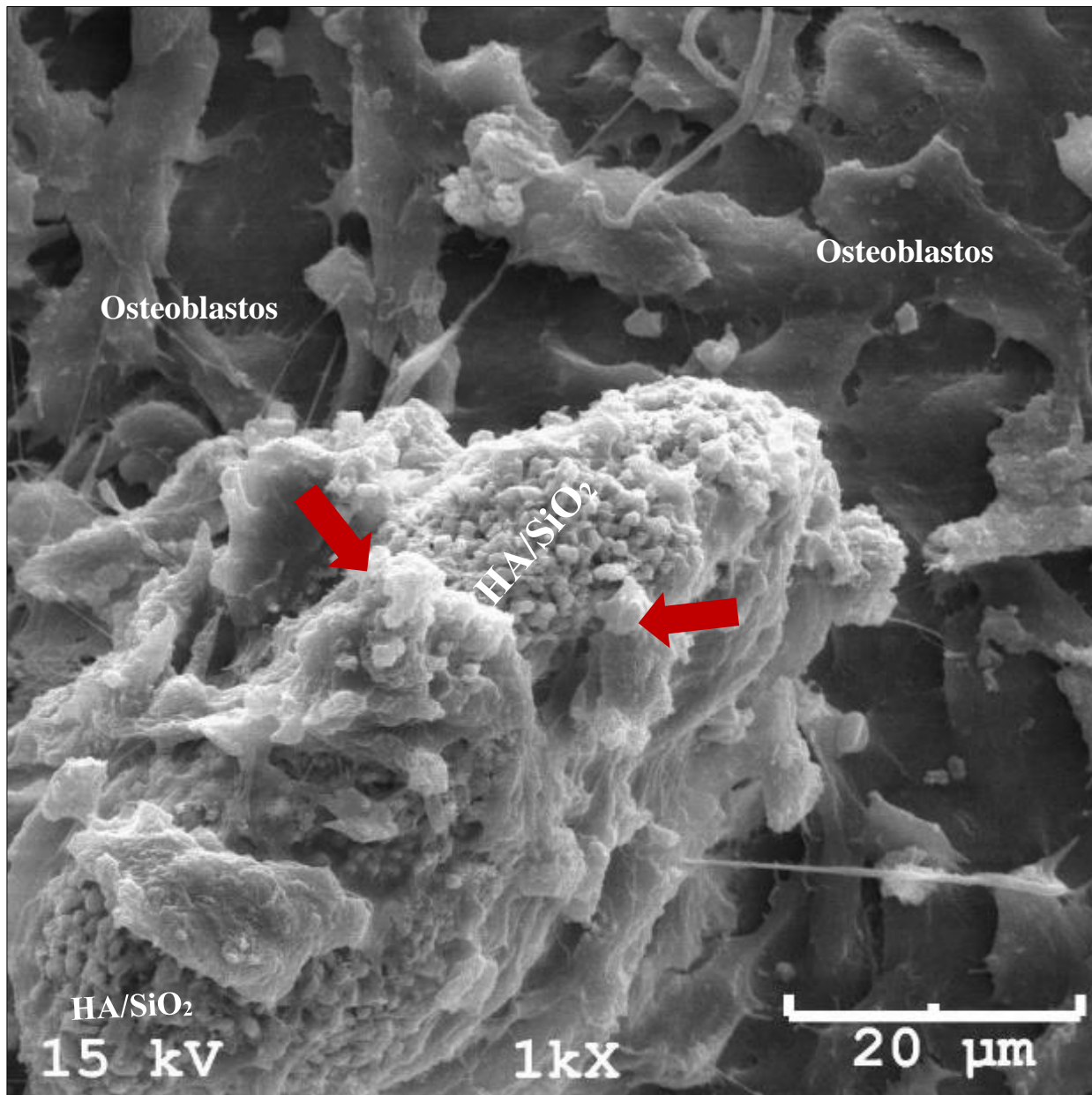
Fonte: produção do próprio autor, 2016. BR=biomaterial remanescente, OP=osso primário, OS=osso secundário, TF=tecido fibroso. H&E, aumento 100x.

Figura 24 - Análise histológica demonstrando a presença de biomaterial remanescente no grupo HA/SiO<sub>2</sub> a 5% aos 60 dias de pós-operatório. Observar o processo de absorção do biomaterial e substituição deste por tecido ósseo neoformado (setas brancas). Neste detalhe, pode ser identificada uma lacuna deixada pela degradação do grânulo de biomaterial, onde se observa a presença de células grandes (osteoclastos – seta preta) responsáveis por este processo; além disso, é possível perceber o fechamento da lacuna pelo avanço centrípeto do tecido ósseo neoformado.



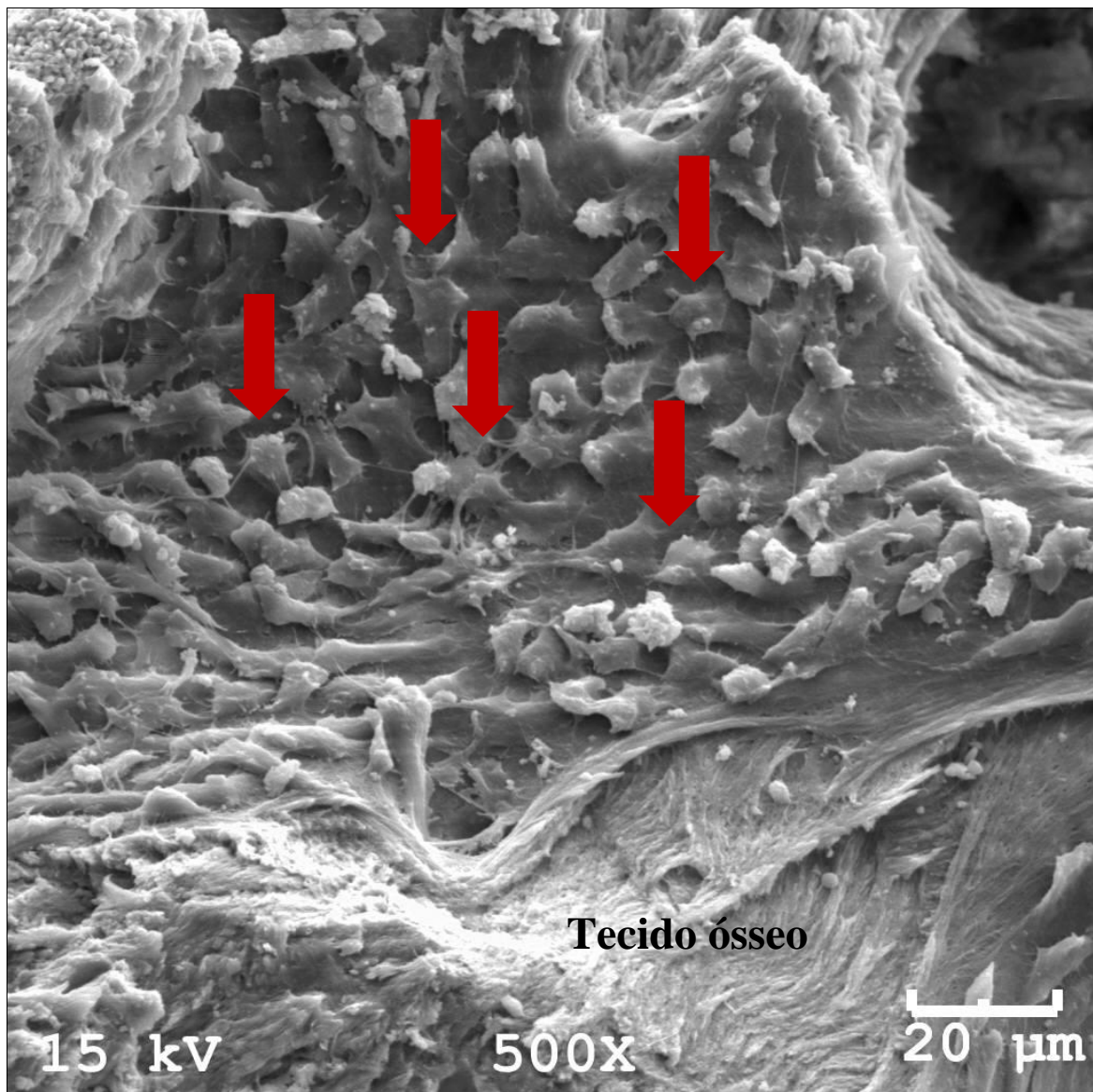
Fonte: produção do próprio autor, 2016. BR=biomaterial remanescente, TF=tecido fibroso. H&E, aumento 100x.

Figura 25 - Análise por MEV de um grânulo de biomaterial remanescente do grupo HA/SiO<sub>2</sub> 5% envolvido por tecido ósseo em formação (setas vermelhas), demonstrando a área de interface entre o tecido ósseo neoformado e o grânulo do biomaterial, em um ovino aos 60 dias de pós-operatório.



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT – Joinville, 2016. Aumento 1000x.

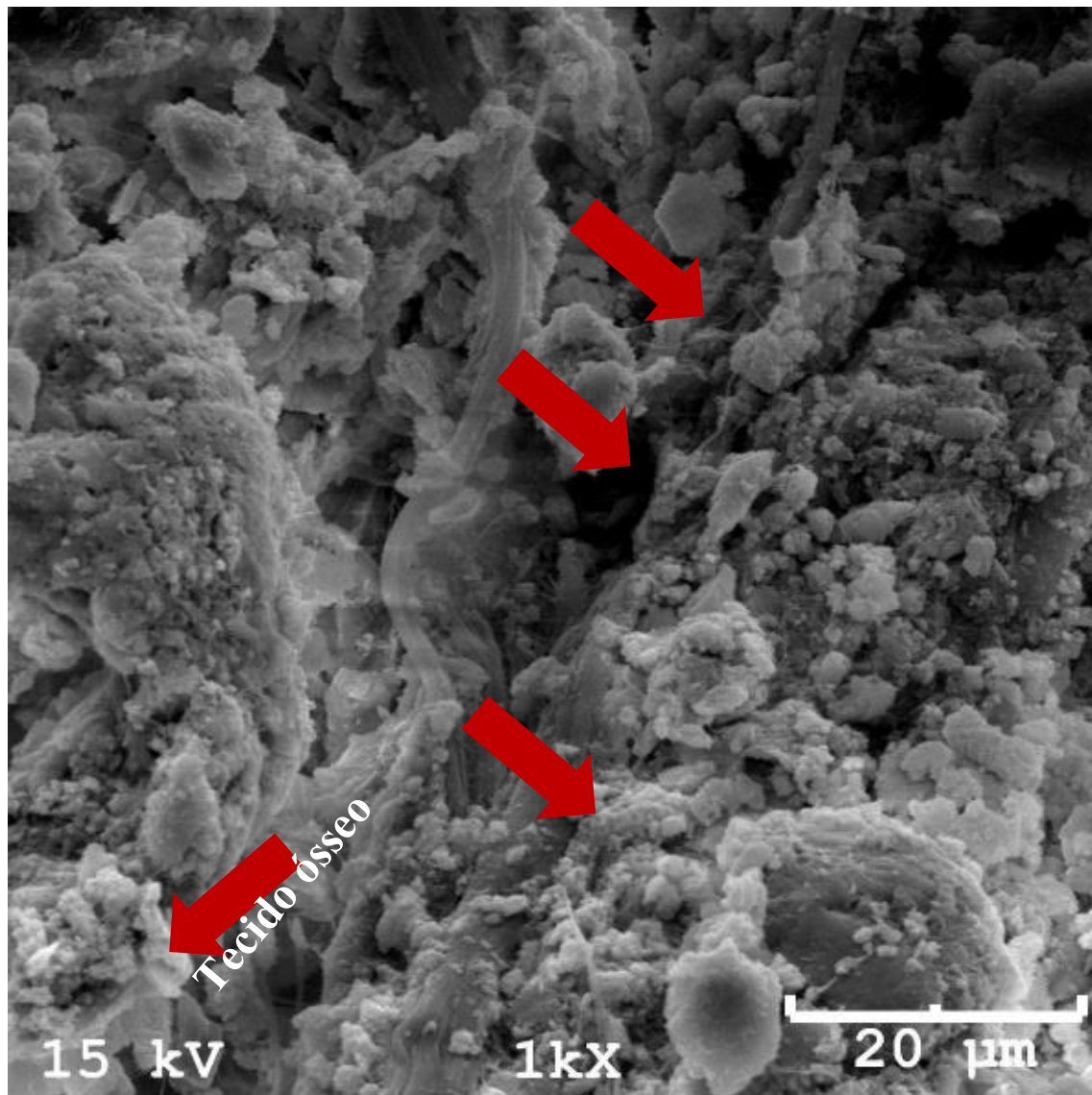
Figura 26 – Presença marcante de osteoblastos (setas) na superfície óssea, indicando atividade osteogênica, em um ovino do grupo HA/SiO<sub>2</sub> 5% aos 60 dias de pós-operatório.



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT – Joinville, 2016. Aumento 500x.

Aos 90 dias de pós-operatório, foi possível observar uma marcante redução na presença de biomaterial remanescente, com fragmentação de grânulos e liberação de pequenas apatitas deste composto, o que ficou bem demonstrado pelas imagens da MEV (figura 27). Houve um incremento também na proporção de tecido ósseo neoformado, variando entre moderado a acentuado (figura 28); a formação de tecido fibroso também se mostrou acentuada nesse momento.

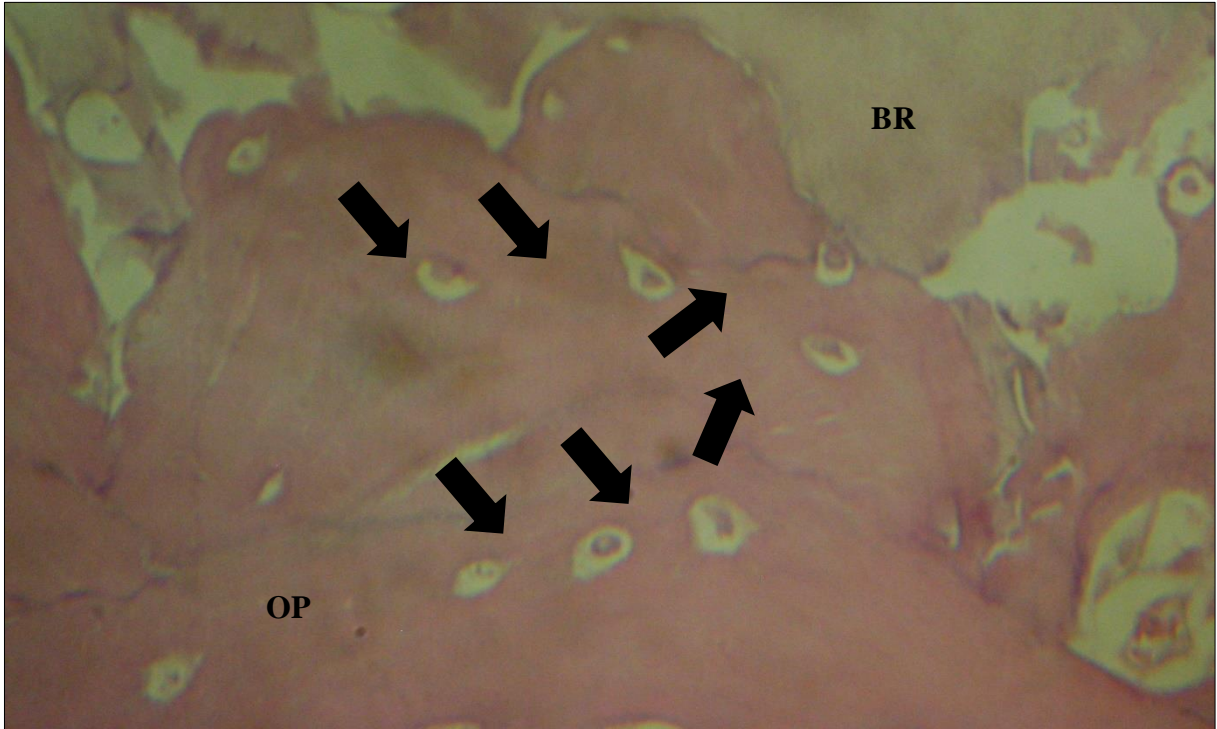
Figura 27 - Aos 90 dias de pós-operatório, no grupo HA/SiO<sub>2</sub> 5%, foi observada pela MEV, mínima presença de grânulos concisos e evidenciada a presença de seus fragmentos, na forma de apatitas deste biomaterial (setas vermelhas) entremeados ao tecido ósseo neoformado.



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT – Joinville, 2016. Aumento 1000x.



Figura 28 - Imagem histológica evidenciando área com grande neoformação óssea no grupo HA/SiO<sub>2</sub> a 5% aos 90 dias de pós-operatório. Observa-se uma quantidade reduzida de grânulos de biomaterial remanescente, circundadas por grande quantidade de tecido ósseo primário (osteócitos - setas pretas).

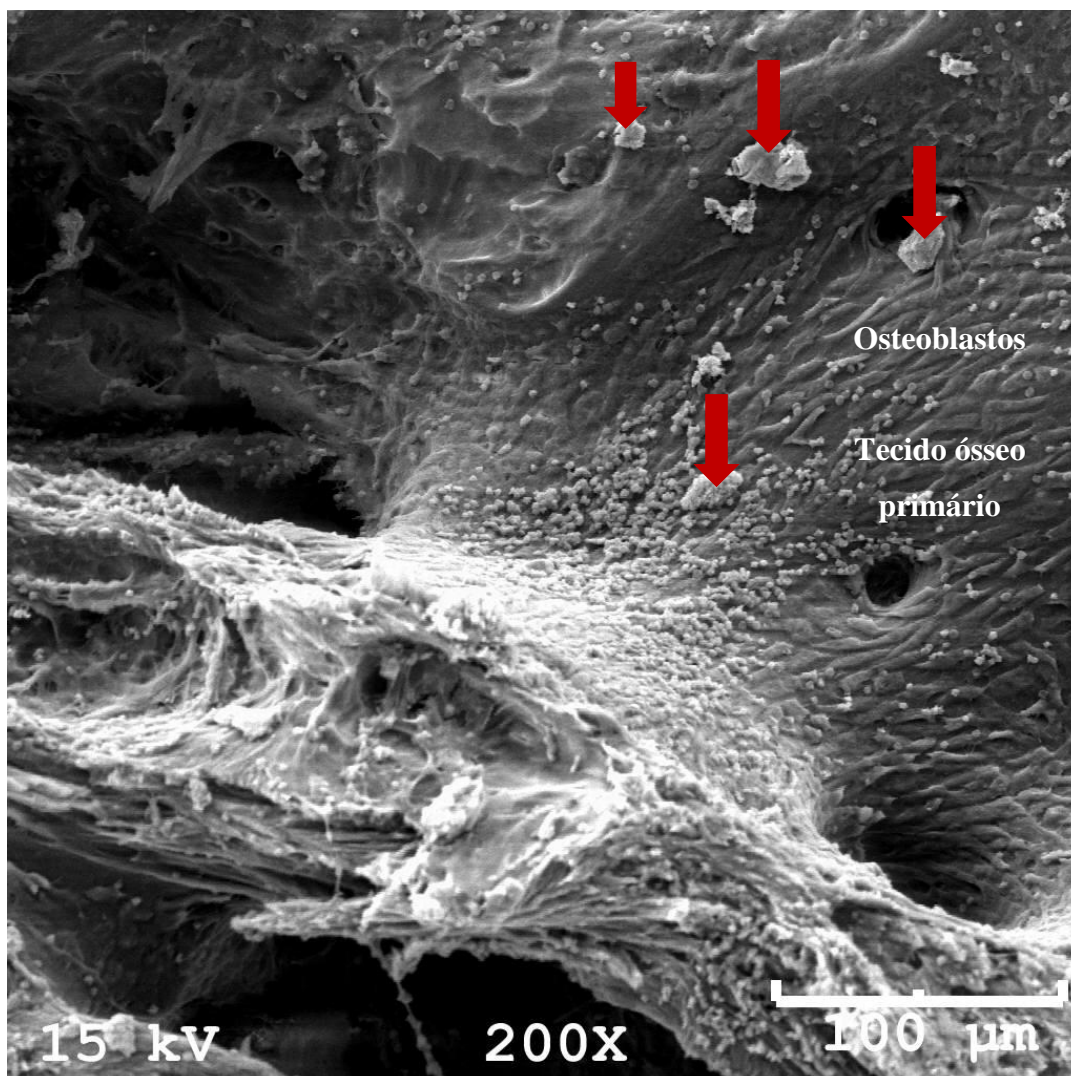


Fonte: produção do próprio autor, 2016. BR=biomaterial remanescente; OP=osso primário. H&E, aumento 400x.

### 5.4.3 CONTROLE

Aos 60 dias de pós-operatório, o grupo controle apresentou moderada a acentuada quantidade de osso esponjoso remanescente (figura 29) e moderada proporção de neoformação óssea, contendo tecido ósseo primário (imaturo) e secundário (maduro ou lamelar). Da mesma forma como nos demais grupos, também foi observada a presença moderada a acentuada de tecido fibroso (figura 30).

Figura 29 - Imagem de MEV ilustrando o aspecto da neoformação óssea no grupo controle (autoenxerto de osso esponjoso) aos 60 dias de pós-operatório. Observa-se a presença de osso esponjoso remanescente (setas vermelhas) bem como intensa atividade osteoblástica, promovendo neoformação óssea.



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT – Joinville, 2016. Aumento 200x.

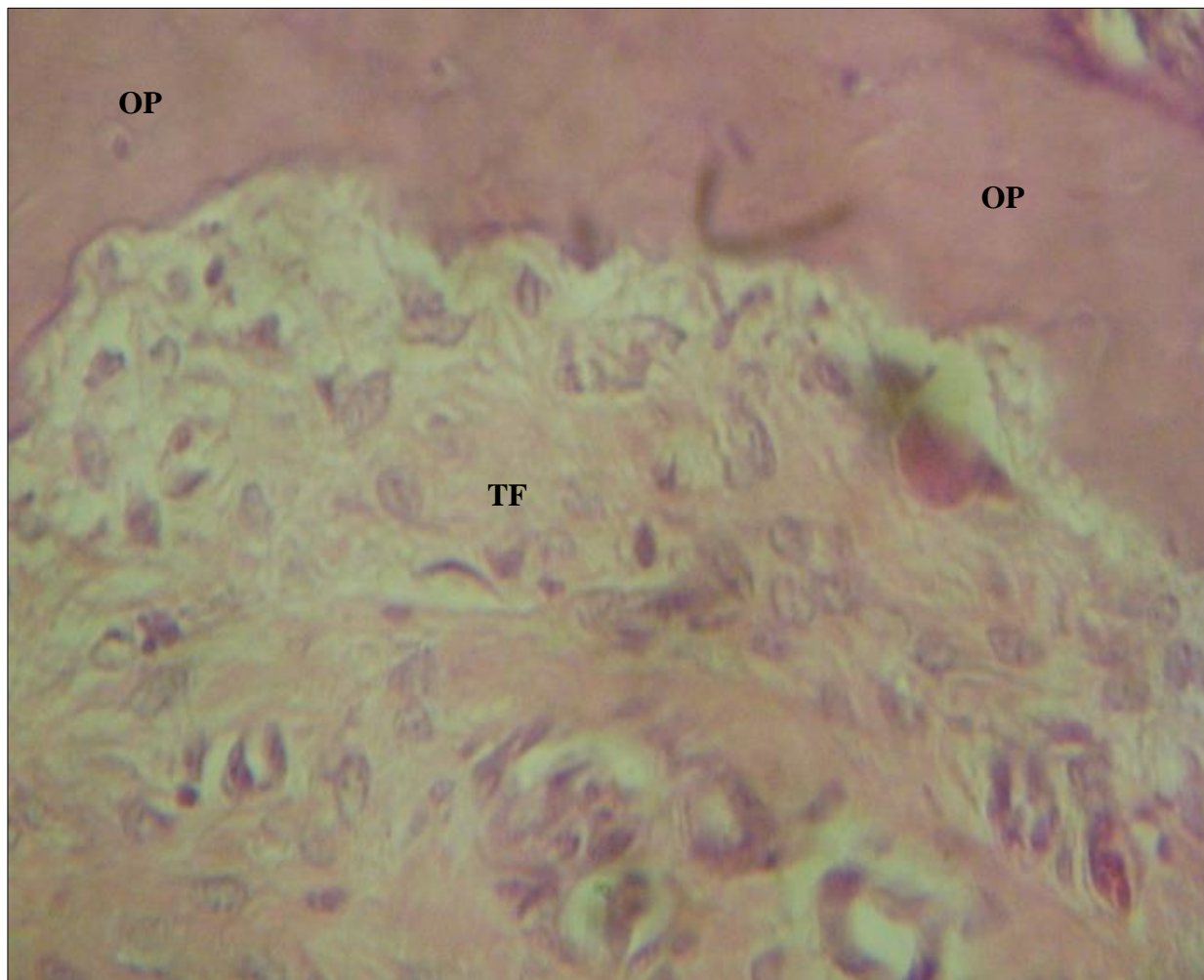
Figura 30 - Análise histológica do grupo controle (autoenxerto de osso esponjoso) aos 60 dias de pós-operatório, demonstrando presença moderada a acentuada de osso esponjoso remanescente e moderada neoformação de tecido ósseo.



Fonte: produção do próprio autor, 2016. CR=cartilagem remanescente, OER=osso esponjoso remanescente, OP=osso primário, TF=tecido fibroso. H&E, aumento 400x.

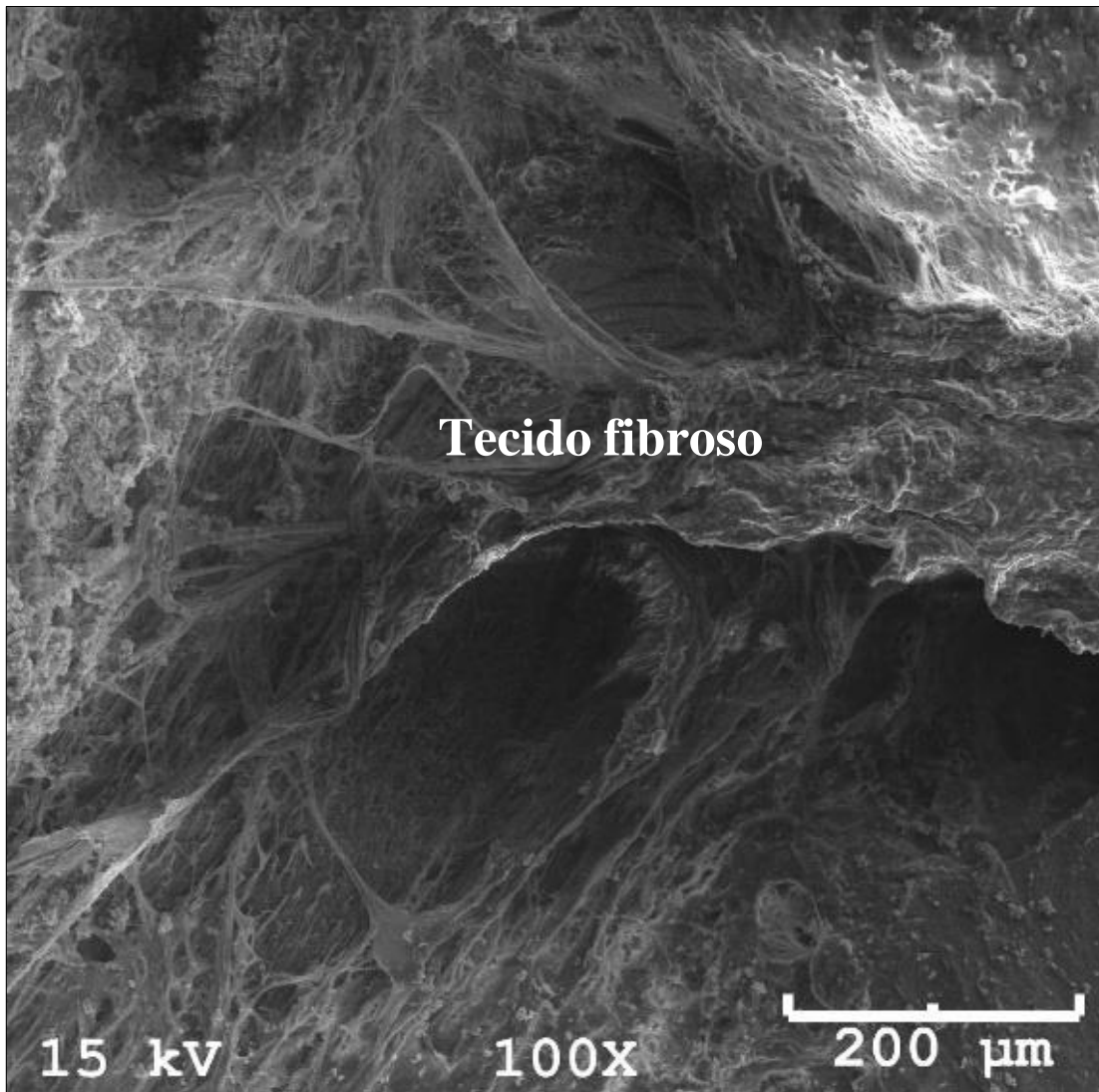
Aos 90 dias de pós-operatório, no grupo controle, era praticamente inexistente a presença de osso esponjoso remanescente, sendo classificada como ausente a leve. A neoformação óssea foi levemente incrementada, ganhando a classificação de moderada a acentuada, semelhante à proporção de tecido fibroso observada (figura 31 e 32). Em algumas áreas, próximo às ilhas de cartilagem remanescente, foi possível observar a presença de fibrocartilagem, cuja presença foi considerada leve neste grupo; este tecido está em estreito contato com o tecido ósseo neoformado (figura 33).

Figura 31 - Análise histológica do grupo controle (autoenxerto de osso esponjoso) aos 90 dias de pós-operatório, demonstrando presença de tecido ósseo primário e tecido fibroso desorganizado.



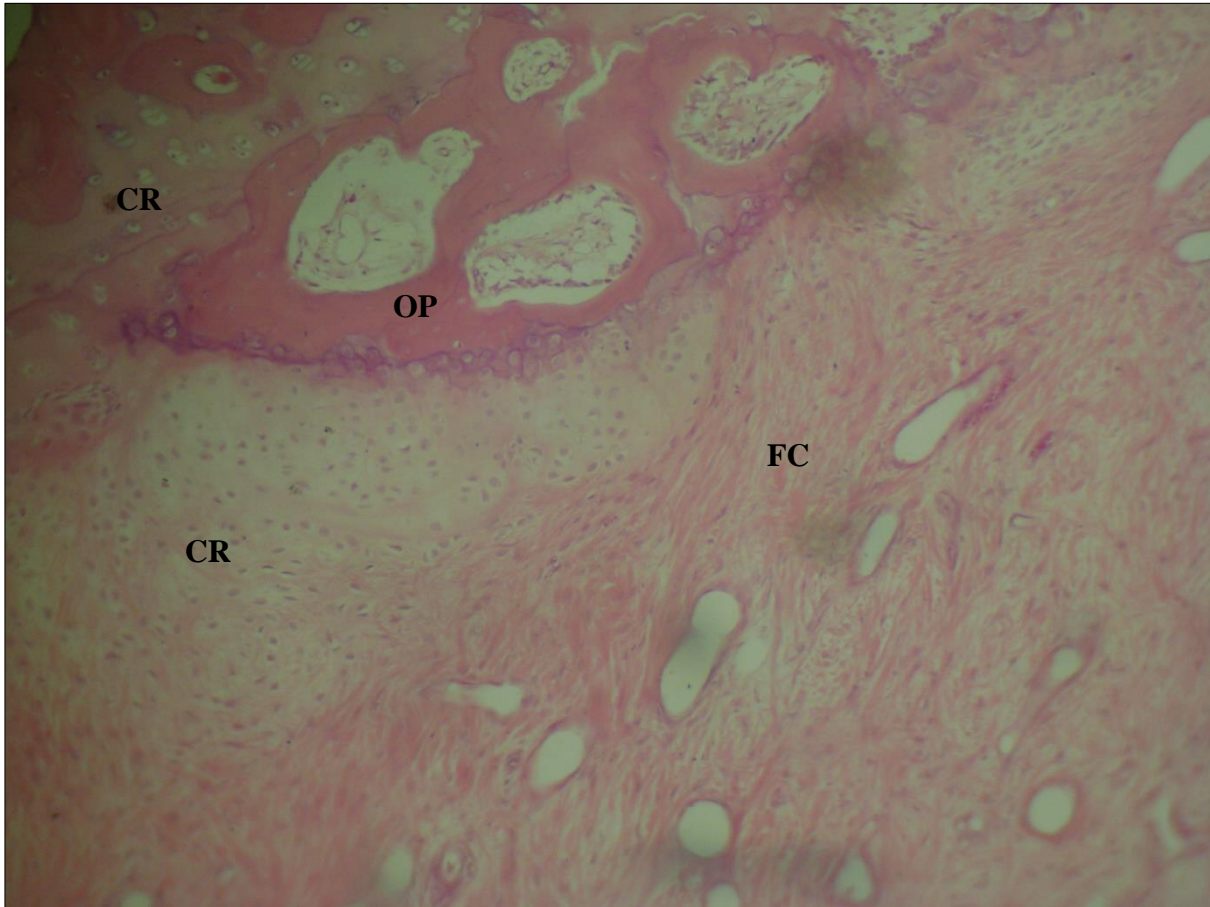
Fonte: Produção do próprio autor, 2016. OP=osso primário, TF=tecido fibroso. H&E, aumento 400x.

Figura 32 - Imagem da MEV demonstrando área com tecido fibroso entremeado ao tecido ósseo neoformado, em um ovino do grupo controle aos 90 dias de pós-operatório.



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT – Joinville, 2016. Aumento 100x.

Figura 33 - Análise histológica do grupo controle aos 90 dias de pós-operatório, evidenciando uma área contendo cartilagem remanescente, circundada por tecido ósseo neoformado, e a presença de fibrocartilagem.



Fonte: produção do próprio autor, 2016. CR=cartilagem remanescente, FC=fibrocartilagem, OP=osso primário. H&E, aumento 100x.

## 6 DISCUSSÃO

A espécie ovina se mostrou adequada para o presente estudo, em que foi realizada artrodese tarsometatarsal, por sua estrutura anatômica e por seu temperamento dócil, que permitiram uma adequada execução da técnica cirúrgica e acompanhamento pós-operatório minucioso. Estudos na área de ortopedia vem empregando com frequência ovinos como modelo experimental, por sua estrutura e capacidade de remodelação óssea (NUSS et al., 2006; VAN DER POL et al., 2010; ALBUQUERQUE et al., 2015; COSTA et al., 2015). Além disso, grande parte destes estudos envolvem eutanásia em algum momento pós-operatório, e esta não se torna um impasse para esta espécie mediante comissões de ética e bem-estar animal, desde que sejam respeitadas as resoluções nº1000/2012, de 11 de maio de 2012, do CFMV e nº13, de 26 de setembro de 2013, do CONCEA, para a realização do procedimento.

As placas metálicas são dispositivos comumente empregados nas artrodeses por promoverem boa estabilidade e fixação articulares, e seu emprego foi efetivo neste estudo, uma vez que os animais apresentaram deambulação e comportamento normais durante todo o pós-operatório, sem sinais de infecção ou má-união óssea. Artrodeses em região distal de membros são mais comumente realizadas, de forma bem-sucedida, com o emprego de placas metálicas (WININGER et al., 2007; POZZI et al., 2012) e fixadores esqueléticos externos (DÓREA NETO et al., 2007a; LEITE et al., 2013), tanto em humanos quanto em animais. Até o presente momento, não há descrição na literatura de técnicas cirúrgicas para artrodese tarsometatarsal em ovinos, entretanto, a escolha pelo emprego de placas ósseas neste estudo, foi feita com base no ambiente em que estes animais são mantidos, baias com camas de maravalha, o que dificultaria a manutenção da higiene do fixador esquelético externo, podendo predispor à contaminação da ferida e dos implantes, com risco de desenvolvimento de complicações graves, como osteomielite; além disso, o número de animais por baia, que neste estudo variou de dois a quatro, poderia ser outro agravante, podendo levar a danos nos implantes pelo atrito com os respectivos implantes de outros animais. Além da maior praticidade e segurança pós-operatória, as placas forneceram suporte rígido e estável à articulação imobilizada, levando à consolidação óssea em todos os animais deste estudo.

A técnica cirúrgica empregada para a realização do procedimento consistiu em uma incisão cutânea no aspecto lateral do membro, do terço distal da tíbia até o terço médio dos metatarsos, correspondente ao tamanho total ocupado pela placa óssea. A bandagem de Robert Jones modificada reforçada com talas metálicas, moldadas para acompanhar a anatomia do membro pélvico esquerdo, empregadas neste estudo, garantiram o suporte pós-operatório

necessário, conforme recomendado por Denny & Butterworth (2006) e foram mantidas durante todo o período de avaliação, 60 e 90 dias. A literatura recomenda que seja empregado um sistema de estabilização externo após o procedimento de artrodese a fim de auxiliar no suporte conferido pelo sistema de fixação interna, o qual deve permanecer por oito a 12 semanas, condizente com o que foi realizado neste estudo (DENNY; BUTTERWORTH, 2006). Não houve nenhuma complicação relacionada à imobilização externa pela colocação de bandagem pós-operatória neste estudo, diferindo dos achados de Bristow et al. (2015), que observaram uma maior morbidade pós-operatória em decorrência do emprego de coaptação externa.

Alguns autores sugerem a localização da articulação tarsometatarsal com auxílio de uma agulha hipodérmica (POZZI et al., 2012), entretanto, neste estudo foi realizada a localização com uma lâmina de bisturi número 10, a qual também se mostrou satisfatória, pois permitiu a localização articular e auxiliou na separação inicial das superfícies ósseas para posterior inserção da broca para desgaste da cartilagem articular.

O desbridamento da cartilagem articular foi realizado por intermédio de um motor de alta rotação com uma broca de desgaste acoplada, sendo que durante o funcionamento desta, havia um auxiliar irrigando o local com solução fisiológica, a fim de minimizar o risco de necrose tecidual por lesão térmica, conforme realizado também por Abdulrazaq; Issa; Abdulrazzak (2015). Embora o desbridamento da cartilagem articular seja um dos requisitos básicos para a realização da artrodese (POZZI et al., 2012), alguns estudos já vem sugerindo que técnicas menos invasivas como compressão do espaço articular e fixação rígida sem desbridamento articular (LAUGE-PEDERSEN; ASPENBERG, 2002); depleção do líquido sinovial e perfuração da cartilagem até a exposição do osso subcondral (LAUGE-PEDERSEN; ASPENBERG, 2003) ou distração da articulação com criação de orifícios na cartilagem capazes de expor o osso subcondral (JONES et al., 2009), além de se mostrarem eficientes no quesito fusão óssea, ainda tendem a causar menor trauma aos tecidos moles adjacentes e ao suprimento sanguíneo regional, essenciais para o processo de consolidação óssea (POZZI et al., 2012). No presente estudo, mesmo com a abordagem padrão, mais invasiva, nenhum animal apresentou isquemia em região distal do membro, claudicação ou não-união óssea, sugerindo ausência de danos excessivos aos tecidos e suprimento vascular local, corroborando com o estudo de ROCH et al. (2008), que avaliaram as complicações pós artrodeses tarsais em cães e observaram que não houve diferença significativa na taxa de complicações severas, como necrose plantar, deiscência de sutura, perda ou deformidade dos implantes e sepse em artrodeses tarsometatarsais com ou sem desbridamento da cartilagem articular. Ainda, no presente estudo, após as análises histológicas, foi observado que, em alguns animais, houve a presença de



cartilagem remanescente, todavia, sem comprometer o processo de neoformação óssea, confirmando as informações dos autores citados, em que a exposição do osso subcondral por si só já permite a estimulação do processo de neoformação óssea e, atrelado à estabilização rígida e compressão das superfícies ósseas, além do uso de enxertos osteoindutores e osteocondutores, é capaz de promover com sucesso a fusão das superfícies ósseas (LAUGE-PEDERSEN; ASPENBERG, 2003; JONES et al., 2009, POZZI et al., 2012).

A analgesia pós-operatória à base de 0,4mg/kg de meloxicam a cada 24 horas, e 25mg/kg de dipirona a cada 8 horas, ambos durante três dias, se mostrou efetiva, levando-se em consideração que os animais não apresentaram comportamento diferente do basal ou qualquer sinal de desconforto aparente. A utilização isolada de anti-inflamatórios não esteroidais, como flunixin meglumine, fenilbutazona e metamizol (dipirona) já tem sido relatada por outros autores como método de analgesia pós-operatória após procedimentos ortopédicos, como artrodeses e osteotomias com ou sem coleta de autoenxerto, em ovinos e equinos, de maneira efetiva (DIAS et al., 2007; JONES et al., 2009; WIEDING et al., 2015).

Aos 15 dias de pós-operatório, um animal do grupo controle apresentou reação periosteal exuberante na região da crista da tíbia, local doador do autoenxerto, além de dor no membro pélvico esquerdo, evitando seu apoio. Esta morbidade pós-operatória relaciona-se com o trauma gerado durante a coleta do osso esponjoso e é amplamente relatada, por diversos autores, que citam a morbidade da área doadora de autoenxerto como uma importante desvantagem do seu uso (MOORE et al., 2001; LEGEROS, 2002; NUSS et al., 2006). Em humanos, um estudo relacionou alterações a curto, médio e longo prazo após a coleta de osso esponjoso, sendo as de curto prazo: sangramento, fratura tibial, hematoma, equimose, dor severa, infecção e perda de sensibilidade temporária (CHEN et al., 2006). O animal do presente estudo que apresentou complicações na área doadora do enxerto, manifestou dor e reação periosteal, que, embora não esteja descrita pelo referido autor, pode se encaixar em uma complicação a curto prazo.

Em outro animal, também aos 15 dias de pós-operatório, foi detectada crepitação da região tarsometatarsal esquerda, sendo que após avaliação radiográfica foi evidenciado o afastamento da placa em relação às superfícies ósseas, por afrouxamento dos parafusos fixados no calcâneo. Roch et al. (2008), avaliaram complicações diversas após artrodeses tarsais em cães, e consideraram como complicações menores os casos em que ocorreu movimentação dos implantes, sem a necessidade de remoção dos mesmos. Neste mesmo estudo, eles relatam que estas complicações ocorreram por volta dos 28 dias de pós-operatório, diferindo do observado no presente estudo, em que, aos 15 dias de pós-operatório, o deslocamento já era evidente. A provável causa para este afrouxamento, relaciona-se à movimentação lateral da broca no

momento da confecção do orifício, produzindo um defeito maior do que o diâmetro do parafuso, predispondo ao seu deslocamento. Prova disso, é que na radiografia obtida no pós-operatório imediato observou-se ambos os parafusos fixados ao calcâneo, tanto na cortical lateral quanto na medial e, aos 30 dias de pós-operatório, as imagens demonstraram fixação dos parafusos apenas na cortical lateral.

As imagens radiográficas são ferramentas importantes dentro da ortopedia. Neste estudo, permitiram monitorar o comportamento dos implantes metálicos empregados, como no caso do deslocamento mencionado anteriormente, bem como confirmar o correto posicionamento nos demais animais. Além disso, contribuíram para indicar a velocidade de absorção dos biomateriais empregados, ainda que de maneira subjetiva, e a remodelação do espaço articular em decorrência do seu preenchimento por tecido ósseo. Esta avaliação pode ser realizada por meio da observação do desaparecimento da linha entre o material enxertado e o osso, bem como pela redução na densidade dos implantes, corroborando com o que foi identificado no estudo de Mayr et al. (2015). O grupo controle aos 90 dias de pós-operatório ainda apresentou radiodensidade inferior ao osso cortical normal, da mesma forma como observado por Dias et al. (2007). Devido à sua subjetividade, esse método não deve ser empregado como forma única de avaliar a osteointegração de biomateriais e a neoformação óssea, devendo sempre vir acompanhada de análises microscópicas, como a histologia e a microscopia eletrônica de varredura.

O preenchimento do espaço articular com osso esponjoso autólogo é considerado o padrão-ouro para a realização de artrodeses, sendo, ainda hoje, o método mais comumente empregado para este tipo de procedimento (POZZI et al., 2012; BRISTOW et al., 2015). Dias et al. (2007), compararam três diferentes quantidades (1,5g, 3g e 5g) de autoenxerto de osso esponjoso empregados no preenchimento de defeitos corticais criados na diáfise tibial de ovelhas, e concluíram que a resposta esperada no que diz respeito à neoformação óssea independe da quantidade de material colocado, desde que seja preenchida toda a superfície do defeito. No presente estudo, não foi mensurada a quantidade exata de osso esponjoso coletado, entretanto, foi preconizado um volume total capaz de cobrir a superfície óssea distal do defeito, preenchendo completamente o espaço criado, após a aposição dos fragmentos ósseos, corroborando com os achados de Dias et al. (2007), uma vez que foi observada a fusão das superfícies ósseas em todos os animais.

Herford et al. (2003) recomendam que a coleta de osso esponjoso envolvendo a porção proximal da tíbia seja feita através da sua face medial e com um instrumento circular, a fim de

minimizar o risco de fratura no período pós-operatório, exatamente como foi realizado neste estudo. Neste caso, foi utilizada uma trefina de 6mm de diâmetro, estando de acordo com o estudo feito por Abdulrazaq; Issa: Abdulrazzak (2015), que coletaram osso esponjoso da crista ilíaca por meio de orifícios criados com trefinas de aproximadamente 10mm de diâmetro e observaram um pós-operatório satisfatório, com mínimas complicações em humanos. Os autores recomendam a aplicação de uma esponja estéril absorvível após a coleta do enxerto (HERFORD et al., 2003), o que não foi realizado neste estudo, uma vez que o fragmento ósseo cortical removido pela trefina foi reposicionado, previamente à sutura dos planos teciduais.

No presente estudo, apenas um animal de quatro coletados (25%), apresentou dor e reação periosteal exuberante na área doadora do enxerto, considerada uma complicação leve, assim como sensibilidade, formação de seroma ou hematoma e infecção, conforme citado por outros autores (MYEROFF & ARCHDEACON, 2011; O'MALLEY, 2015). Herford et al. (2003) relataram que a taxa de complicações pós-coleta de osso esponjoso na tíbia proximal é baixa, especialmente pelo aspecto medial; quando o acesso se dá pela face lateral, os autores consideram que haja um incremento na probabilidade de complicações, principalmente pela proximidade com estruturas anatômicas, como vasos e nervos, aumentando o risco de lesões iatrogênicas. Em 2006, Chen et al. investigaram a morbidade pós-operatória na tíbia proximal e observaram 15% de complicações leves, como presença de equimoses e perda temporária de sensibilidade em humanos. Em virtude destas e de outras limitações, é contínua a pesquisa por biomateriais capazes de substituir o tecido ósseo autógeno.

O resultado obtido no presente estudo com o grupo controle demonstrou, após 8 semanas do procedimento cirúrgico, a presença de osso esponjoso remanescente, porém com neoformação óssea ao seu redor, demonstrando sua capacidade osteoindutiva e osteocondutiva. Isso se deve ao emprego de osso esponjoso no leito desbridado, uma vez que o autoenxerto de osso cortical promove osteocondução e possui importância estrutural, com mínima atividade osteoindutiva e propriedades osteogênicas, enquanto que o osso esponjoso apresenta alta capacidade osteoindutiva, osteocondutiva e osteogênica, além de uma grande área de superfície, o que leva a um rápido remodelamento e incorporação óssea (MYEROFF & ARCHDEACON, 2011). Após 12 semanas, maior tempo de avaliação neste estudo, ainda havia a presença de osso esponjoso remanescente; avaliações mais tardias poderiam ser sugeridas a fim de investigar o momento em que ocorre a reabsorção total do enxerto ósseo, visto que, após a implantação, uma parte dos osteócitos transplantados sobrevive e, combinados com a porosidade do enxerto e as citocinas locais, promove angiogênese e recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas, promovendo vascularização completa do enxerto em dois dias,

neoformação óssea em algumas semanas, com remodelação por volta de oito semanas e completa renovação do enxerto em torno de um ano após a implantação (MYEROFF & ARCHDEACON, 2011).

A avaliação comparativa entre o autoenxerto de osso esponjoso e biomateriais à base de fosfatos de cálcio, realizada neste estudo, corrobora com a pesquisa de outros autores que utilizaram estas substâncias com a finalidade de substituição óssea. A justificativa para tal aplicação está relacionada ao fato de que a hidroxiapatita, um importante representante desse grupo, é o principal componente inorgânico dos ossos, o que torna estes compostos bioinertes e biocompatíveis (LAURENCIN; KHAN; EL-AMIN, 2006). Quando comparado aos biomateriais à base de fosfatos de cálcio, o osso autógeno exibe maior neoformação e maturação óssea, entretanto com mais rápida absorção do enxerto (BROGGINI et al., 2014), o que pode não ser sempre desejado.

Os resultados obtidos com a composição HA/TCP- $\beta$  80/20 indicaram acentuada presença de osso primário, ou seja, osso jovem aos 60 dias de pós-operatório, corroborando com autores que sugerem que concentrações mais baixas do TCP- $\beta$  aumentam a viabilidade celular (CURRAN; GALLAGHER; HUNT, 2005). Os referidos autores, realizaram estudos *in vitro* e observaram que quanto maior a proporção de tricálcio fosfato (TCP), menor o número de células viáveis na superfície do biomaterial, enquanto que o TCP em proporções mais baixas (20 a 50%), sustenta a viabilidade celular por mais tempo. Nessa fase de maturação óssea, foi observada a presença de grande número de osteócitos em suas lacunas e osteoblastos nas bordas do tecido ósseo em formação, indicando atividade osteogênica. Aos 90 dias, foi possível observar presença moderada tanto de osso primário, quanto secundário, este último indicando a formação de osso maduro, com presença de lamelas concêntricas e dos canais de Havers. Estes achados corroboram com os estudos de outros autores (KIM et al., 2012; BROGGINI et al., 2014; COSTA et al., 2015), os quais observaram boa capacidade osteorregenerativa de uma composição bifásica contendo 60% de hidroxiapatita e 40% de TCP- $\beta$ .

Com relação à neoformação óssea, os resultados obtidos com o grupo HA/SiO<sub>2</sub> foram bastante semelhantes ao bifásico. Houve formação de osso primário e secundário de forma moderada aos 60 dias, os quais tiveram um leve incremento aos 90 dias. Brogini et al. (2014) avaliaram a capacidade osteorregenerativa da HA/SiO e também identificaram a presença de osso denso e maduro após oito semanas de implantação. Chan et al. (2012) implantaram espumas manufaturadas contendo fosfatos de cálcio associados à sílica com diferentes porosidades na musculatura lombar em ovinos, e observaram que em todas as amostras foi detectada a formação óssea em até oito semanas. Estes resultados, associados ao observado

neste estudo, ilustram a alta capacidade osteoindutiva da biosslica, contribuindo de forma significativa para o incremento da neoformação óssea.

O tempo de permanência dos biomateriais no organismo é outro foco bastante investigado em pesquisas, uma vez que as composições alteram a velocidade deste processo por aliar cerâmicas de degradação conhecidamente lenta, como a hidroxiapatita, àquelas de absorção rápida, como o TCP- $\beta$  (CHO; CHUNG; RHEE, 2011; COSTA et al., 2015; DALLABRIDA, 2016). No presente estudo, em ambos os grupos contendo biomaterial, aos 60 dias após a implantação, a presença de biomaterial remanescente foi alta, sendo considerada acentuada a muito acentuada no grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 e muito acentuada no grupo HA/SiO<sub>2</sub>. Entretanto, após 90 dias, houve uma marcante redução na quantidade de biomaterial remanescente no grupo contendo sílica, atingindo níveis considerados leve a moderados, enquanto no grupo HA/TCP- $\beta$  80/20 a redução foi mínima, ficando entre moderada e acentuada. Esses achados corroboram com os resultados obtidos por outros autores, demonstrando que compostos com grande proporção de HA apresentam biomaterial remanescente por longos períodos, ultrapassando 12 a 15 meses (DRAENERT; DRAENERT; DRAENERT, 2014; DALLABRIDA, 2016). Jensen et al. (2009) avaliaram quatro compostos bifásicos, entre eles HA/TCP- $\beta$  80/20, para o preenchimento ósseo de defeitos criados na mandíbula de minipigs, e observaram que compostos com maiores concentrações de HA demoraram mais tempo para serem absorvidos, entretanto, sugerem que esta característica parece preservar e oferecer suporte ao tecido ósseo neoformado na fase inicial, condizente com o que foi observado neste estudo, em que a neoformação óssea está em íntimo contato com os grânulos remanescentes, não tendo sido observado prejuízos na osteogênese.

Com relação ao grupo HA/SiO<sub>2</sub>, que apresentou uma importante redução entre os 60 e 90 dias, estudos sugerem que a porcentagem de material residual é reduzida com o passar do tempo, de maneira semelhante ao observado com o TCP- $\beta$ , sendo o processo de neoformação óssea também similar ao referido biomaterial (LIN et al., 2015). Hutchens et al. (2016) implantaram fosfatos de cálcio associados à sílica em fêmur de ovelhas e observaram biomaterial remanescente após 12 semanas da implantação, embora, assim como no presente estudo, este biomaterial estivesse completamente circundado por tecido ósseo. Coathup et al. (2016) compararam fosfatos de cálcio associados à sílica com duas diferentes porosidades e observaram, em ambas, uma adequada neoformação óssea em até 12 semanas, porém a composição com maior porosidade, apresentou uma absorção maior, corroborando com o resultado deste grupo neste estudo, uma vez que os biomateriais empregados no presente estudo possuem como característica uma estrutura microporosa.

Nos três grupos avaliados neste estudo (HA/TCP- $\beta$  80/20, HA/SiO<sub>2</sub> e autoenxerto) foi observada presença moderada a acentuada de tecido fibroso, em sua maior parte, denso e maduro, além de uma apresentação leve de fibrocartilagem, conforme observado também em outros estudos (DALLABRIDA, 2016; HUTCHENS et al., 2016). Seo et al. (2014) observaram a formação de tecido fibroso denso após artrodese interfalangeal em equinos, no ponto de perfuração da cartilagem articular, o qual fez uma espécie de “ponte” entre os dois lados da cartilagem, unindo o osso subcondral subjacente em ambos os fragmentos ósseos. Sadeghilar et al. (2014) implantaram na musculatura de coelhos blocos esponjosos contendo diferentes composições bifásicas de HA e TCP, além destes dois puros, e observaram que todos estavam recobertos por tecido fibroso no momento da retirada, após três meses da implantação. É possível que o tecido fibroso identificado neste estudo pudesse ter sido substituído gradativamente por tecido ósseo, caso avaliações mais tardias tivessem sido realizadas, de acordo com o observado por Dallabrida (2016), que avaliou o comportamento de compostos bifásicos em diferentes proporções durante 12 meses e identificou a substituição gradativa do tecido fibroso por tecido ósseo.

## **7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

### **7.1 BIOMATERIAL GRANULADO**

O biomaterial nesta apresentação dificultou sua deposição uniforme na superfície óssea, após o desgaste da articulação tarsometatarsal. O sangramento do osso subcondral facilitava a saída dos grânulos do espaço articular e foi necessária uma quantidade grande de cada composto para evitar a falha no preenchimento. Além disso, foi necessário o cuidado para que fosse removido ao máximo os grânulos que se acomodavam nos tecidos moles adjacentes à articulação.

### **7.2 APARELHO DE RAIOS-X**

Durante o estudo, o aparelho de raios-x do Hospital de Clínica Veterinária do CAV/UEDESC apresentou diversos problemas técnicos, sendo que seu uso foi interrompido por alguns períodos. Algumas avaliações radiográficas precisaram ser realizadas com o aparelho de raios-x portátil empregado para grandes animais, cuja qualidade da imagem é inferior ao convencional. Isso não prejudicou as análises em si, mas limitou o número de fotos adequadas para a ilustração do estudo.

As revelações dos filmes radiográficos foram realizadas por processador automático, exceto nas avaliações ocorridas durante o período de recesso do Hospital de Clínica Veterinária do CAV/UEDESC, em que este equipamento se encontrava desligado e foi necessária a revelação manual dos mesmos.





## CONCLUSÃO

Conclui-se com o presente estudo que a neoformação óssea promovida pelos biomateriais HA/TCP- $\beta$  80/20 e HA/SiO<sub>2</sub> é equivalente àquela induzida pelo autoenxerto de osso esponjoso, tornando estes compostos aptos à substituição do tecido ósseo;

A presença moderada a acentuada de HA/TCP- $\beta$  80/20 remanescente não traz danos à osteogênese com base nas análises realizadas neste estudo;

O emprego de placa metálica de compressão dinâmica fixada por oito parafusos corticais no aspecto lateral da articulação tarsometatarsal foi adequada para a estabilização da artrodese neste estudo, podendo ser empregada com segurança em ovinos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULRAZAQ, S.S.; ISSA, S.A.; ABDULRAZZAK, N.J. Evaluation of the Trephine Method in Harvesting Bone Graft From the Anterior Iliac Crest for Oral and Maxillofacial Reconstructive Surgery. **The Journal of Craniofacial Surgery**. v.26, n.8, p.e744-e746, 2015.
- ALBUQUERQUE, P. B. **Aloexerto ósseo cortical desvitalizado com nitrogênio líquido – estudo experimental em ovelhas**. 2012. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- ALBUQUERQUE, P. B.; et al. Aloexerto ósseo cortical desvitalizado com nitrogênio líquido – estudo experimental em ovelhas. **Ciência Rural**. v.45, n.4, p.718-723, 2015.
- BEEVER, L.; GILES, K.; MEESON, R. Postoperative complications associated with external skeletal fixators in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.19, n.7, p.727-736, 2017.
- 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.
- BRISTOW, P.C.; et al. Clinical Comparison of the Hybrid Dynamic Compression Plate and the Castless Plate for Pancarpal Arthrodesis in 219 Dogs. **Veterinary Surgery**. v.44, n.1, p.70-77, 2015.
- BROGGINI, N.; et al. Bone healing around nanocrystalline hydroxyapatite, deproteinized bovine bone mineral, biphasic calcium phosphate, and autogenous bone in mandibular bone defects. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. v.103, n.7, p.1478-1487, 2014.
- BURG, K. J.; PORTER, S.; KELLAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**. v.21. n.23, p.2347-2359, 2000.
- CAMACHO, B. **Artrodese tibiotársica com utilização de parafusos de aço inoxidável 304L auto-atarraxantes: estudo experimental em cães**. 2005. 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa.
- CAIXETA, T. B.; et al. Tibiotocalcaneal arthrodesis with retrograde intramedullary nailing: 29 patients' clinical and functional evaluation. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v.49, n.1, p.56-61, 2014.
- CHAN, O.; et al. The effects of microporosity on osteoinduction of calcium phosphate bone graft substitute biomaterials. **Acta Biomaterialia**. v.8, n.7,p.2788-2794, 2012.
- CHEN, Y.; et al. Donor site morbidity after harvesting of proximal tibia bone. **Journal of the Sciences and Specialties of the Head and Neck**. v.28, n.6, p.496-500, 2006.
- 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, E. P. & BALFOUR, R. J. Tarsometatarsal Arthrodesis Using Tarsometatarsal Intramedullary Pin Stabilization. **Veterinary Surgery**. v.41, n.6, p.733-737, 2012.
- COATHUP, M. J.; et al. The effect of increased microporosity on bone formation within silicate-substituted scaffolds in an ovine posterolateral spinal fusion model. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. v.0, n.0, p.00-00, 2016.
- CONCEIÇÃO, R.T.; et al. Goniometria dos membros torácicos e pélvicos de ovinos em duas faixas etárias. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, n.8, p, 812-816, 2012.
- COSTA, B. D.; et al. Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.35, n.2, p.177-187, 2015.
- COUGHLIN, M. J.; et al. Tibiotalocalcaneal Arthrodesis with lateral compression Plate. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v.47, n.4, p.467-473, 2012.
- CUNNINGHAM, B. W.; et al. Ceramic granules enhanced with B2A peptide for lumbar interbody spine fusion: an experimental study using an instrumented model in sheep. **Journal of Neurosurgery: Spine**. v.10, n.4, p.300-307, 2009.
- CURRAN, J.M.; GALLAGHER, J.A.; HUNT, J.A. The inflammatory potential of biphasic calcium phosphate granules in osteoblast/macrophage co-culture. **Biomaterials**. v.26, n.26, p.5313-5320, 2005.
- DALLABRIDA, A. **Neoformação óssea e osteointegração de biocerâmicas de fosfatos de cálcio micro estruturados em diferentes composições em ovinos**. 2016. 131f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina.
- DRAENERT, M.; DRAENERT, A.; DRAENERT, K. Osseointegration of Hydroxyapatite and Remodeling-Resorption of Tricalciumphosphate Ceramics. **Microscopy Research And Technique**. v.76, n.4, p.370-380, 2013.
- DENNY, H. R. & BUTTERWORTH, S. J. Tarso. In: **Cirurgia Ortopédica em Cães e Gatos**. Roca, São Paulo, 4. ed., cap.44, p. 444–461, 2006.
- 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 tíbia. **Acta Médica Portuguesa**. v.20, n.1, p.37-46, 2007.
- DÓREA NETO, F.A., et al. The use of hydroxyapatite for arthrodesis in dogs and cats: a clinical study. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.59, n.4, p.932-938, 2007a.
- DÓREA NETO, F. A. **Avaliação do cimento de alfa-fosfato tricálcico em artrodeses tarsocrurais experimentais em cães**. 2007b. 67f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- DOROZHKIN, S. Calcium orthophosphates. **Journal of Materials Science**. v.42, n.4, p.1061-1095, 2007.

DYCE, J.; et al. Arthrodesis of the tarsometatarsal joint using a laterally applied plate in 10 dogs. **Journal of Small Animal Practice**. v.39, n.1, p.19-22, 1998.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. O Aparelho Locomotor. In: **Tratado de Anatomia Veterinária**. Elsevier, Rio de Janeiro, 4.ed, p. 32-99, 2010.

FERNANDES, T. D.; et al. Estabilização da artrodese da articulação tarsometatársica: estudo biomecânico. **Acta Ortopédica Brasileira**. v.16, n.1, p.45-48, 2008.

FREITAS, S. H.; et al. Ângulos de artrodese nas principais articulações do esqueleto apendicular em caninos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.36, n.3, p. 322-326, 2014.

GOODMAN, S. B.; et al. The future of biologic coatings for orthopaedic implants. **Biomaterials**. v.34, n.13, p.3174-3183, 2013.

GRIFFON, D. **Evaluation of osteoproduktive biomaterials: allograft, bone inducing agent, bioactive glass, and ceramics**. 2002. 105f. Dissertation (Division of Surgery) - Department of Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland.

HEINECK, J.; et al. Fracture Models in the Lumbar Sheep Spine: A Biomechanical Investigation. **Journal of Orthopaedic Research**. v.28, n.6, p.773-777, 2010.

HENSTOCK, J.R.; CANHAM, L.T.; ANDERSON, S.I. Silicon: the evolution of its use in biomaterials. **Acta Biomaterialia**. v.11, n.1, p.17-26, 2015.

HERFORD, A.S.; et al. Medial Approach for Tibial Bone Graft: Anatomic Study and Clinical Technique. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.61, n.3, p.358-363, 2003.

HING, K. A.; WILSON, L. F.; BUCKLAND, T. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. **The Spine Journal**. v.7, n.4, p.475-490, 2007.

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.

HUTCHENS, S. A.; et al. Efficacy of silicate-substituted calcium phosphate with enhanced strut porosity as a standalone bone graft substitute and autograft extender in an ovine distal femoral critical defect model. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v.27, n.1, p. 1-12, 2016.

JENSEN, S.S.; et al. Comparative Study of Biphasic Calcium Phosphates With Different HA/TCP Ratios in Mandibular Bone Defects. A Long-Term Histomorphometric Study in Minipigs. **Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials**. v.90B, n.1, p.171-181, 2009,

JONES, P.; et al. A limited surgical approach for pastern arthrodesis in horses with severe osteoarthritis. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**. v.22, n.4, p.303-308, 2009.

- KAINER, R. A. Anatomia funcional do aparelho locomotor. In: STASHAK, T.S **Claudicação em equinos Segundo Adams**. Roca, São Paulo, 5. ed, p. 01-54, 2006.
- KHAN, S. N. & LANE, J. M. Spinal fusion surgery: animal models for tissue-engineered bone constructs. **Biomaterials**. v.25, n.9, p.1475-1485, 2004.
- 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.
- LAUGE-PEDERSEN, H. & ASPENBERG, P. Arthrodesis by percutaneous fixation: Patellofemoral arthrodesis in rabbits without debridement of the joint. **Acta Orthopaedica Scandinavica**. v.73, n.2, p. 186-189, 2002.
- LAUGE-PEDERSEN, H. & ASPENBERG, P. Synovial fluid depletion: successful arthrodesis without operative cartilage removal. **Journal of Orthopaedic Science**. v.8, n.4, p.591-595, 2003.
- LAURENCIN, C.; KHAN, Y.; EL-AMIN, S.F. Bone graft substitutes. **Expert Review of Medical Devices**. v.3, n.1, p.49-57, 2006.
- LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. n.1, p.81-98, 2002.
- LEITE, A. M.; et al. Tibiocalcaneal arthrodesis using an Ilizarov fixator. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v.48, n.1, p.57-61, 2013.
- LESSER, A. S. Artrodese. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. Manole, Barueri, 3. ed, p. 2170-2179, 2007.
- LIN, K.; et al. Degradation and silicon excretion of the calcium silicate bioactive ceramics during bone regeneration using rabbit femur defect model. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v.26, n.6, p.1-8, 2015.
- LYONS, A. S.; et al. Failure of resorbable plates and screws in an ovine model of anterior cervical discectomy and fusion. **The Spine Journal**. v.11, n.9, p.876-883, 2011.
- MAGALHÃES, D; MENEZES, H. H. M.; OLIVEIRA, S. R. Reparação óssea e reconstrução periodontal. **Jornal Brasileiro de Endo/Periodontia**. v.1, n.1, p.72-77, 2000.
- MAGALHÃES, L. Q.; et al. Uso de placa de compressão dinâmica com acesso lateral para artrodese tarsometatarsica em equídeo. In: **Encontro Nacional de Engenharia Biomecânica**, 2015, Uberlândia. Disponível em: <[https://ssl4799.websiteseuro.com/swge5/PDF/EEB-2015-0146\\_18016.PDF](https://ssl4799.websiteseuro.com/swge5/PDF/EEB-2015-0146_18016.PDF)>. Acesso em 06 de maio de 2016.
- MAYR, H. O.; et al.  $\beta$ -Tricalcium phosphate for bone replacement: Stability and integration in sheep. **Journal of Biomechanics**. v.48, n.6,p.1023-1031, 2015.
- McLENNAN, M. J. Ankylosis of tarsometatarsal luxations using external fixation. **Journal of Small Animal Practice**. v.48, n.9, p.508-513, 2007.

MIN, W., et al. Proliferation and osteoblastic differentiation of bone marrow stem cells: comparison of vertebral body and iliac crest. **European Spine Journal**. v.19, n.10, p.1753-1760, 2010.

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.

MYEROFF, C. & ARCHDEACON, M. Autogenous Bone Graft: Donor Sites and Techniques. **The journal of bone and joint surgery**. v.93, n.23, p.2227-2236, 2011.

NUSS, K. M. R.; et al. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. **BMC Musculoskeletal Disorders**. v.7, n.67, p.1-14, 2006.

O'MALLEY, M. J.; et al. Morbidity and Complications Following Percutaneous Calcaneal Autograft Bone Harvest. **Foot & Ankle International**. v.35, n.1, p.30-37, 2014.

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.

PORTER, A. E.; et al. Ultrastructural comparison of dissolution and apatite precipitation on hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite in vitro and in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. v.69A, n.4, p.670-679, 2004.

POZZI, A.; et al. Percutaneous Plate Arthrodesis in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v.42, n.5, p.1079-1096, 2012.

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

REID, J.J.; JOHNSON, J.S.; WANG, J.C. Challenges to bone formation in spinal fusion. **Journal of Biomechanics**. v.44, n.2, p.213-220, 2011.

ROCH, S. P.; et al. Complications following tarsal arthrodesis using bone plate fixation in dogs. **Journal of Small Animal Practice**. v.49, n.3, p.117-126, 2008.

SADEGHILAR, A.; et al. Local Tissue Reaction and Biodegradation of Hydroxyapatite/ Tricalcium Phosphate Composites. **World Journal of Medical Sciences**. v.11, n.3, p.301-305, 2014.

SEO, J.; et al. Minimally invasive proximal interphalangeal joint arthrodesis using a locking compression plate and tissue engineering in horses: A pilot study. **The Canadian Veterinary Journal**. v.55, n.11, p.1050-1056, 2014.

SOBALLE, K.; et al. Hydroxyapatite coating modifies implant membrane formation. **Acta Orthopaedica Scandinavica**. v.63, n.2, p.128-140, 1992.

SOLCHAGA, L. S.; et al. Augment Bone Graft Products Compare Favorably With Autologous Bone Graft in an Ovine Model of Lumbar Interbody Spine Fusion. **Spine**. v.37, n.8, p.E461-E467, 2012.

VAN DER POL, U.; et al. Augmentation of bone defect healing using a new biocomposite scaffold: An in vivo study in sheep. **Acta Biomaterialia**. v.6, n.9, p. 3755-3762, 2010.

WANG, X.; SCHRÖDER, H. C.; MÜLLER, W. E. G. Enzyme-based biosilica and biocalcite: biomaterials for the future in regenerative medicine. **Trends in Biotechnology**. v.32, n.9, p.441-447, 2014.

WHEELER, D. L.; et al. Efficacy of silicated calcium phosphate graft in posterolateral lumbar fusion in sheep. **The Spine Journal**, v.7, n.3, p.308-317, 2007.

WIEDING, J.; et al. Biomechanical stability of novel mechanically adapted open-porous titanium scaffolds in metatarsal bone defects of sheep. **Biomaterials**. v.46, n.1, p.35-47, 2015.

WININGER, F. A.; et al. Failure Mode and Bending Moment of Canine Pancarpal Arthrodesis Constructs Stabilized with Two Different Implant Systems. **Veterinary Surgery**. v.36, n.8, p.724-728, 2007.

WOODS, S.; WALLACE, R. J.; MOSLEY, J. R. The effect of external coaptation on plate deformation in an ex vivo model of canine pancarpal arthrodesis. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**. v.25, n.6, p.439-444, 2012.