

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL – PPGCA
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

ADEMAR LUIZ DALLABRIDA

NEOFORMAÇÃO ÓSSEA E OSTEOINTEGRAÇÃO DE BIOCERÂMICAS DE
FOSFATOS DE CÁLCIO MICRO ESTRUTURADOS EM DIFERENTES
COMPOSIÇÕES EM OVINOS

LAGES, 2016

ADEMAR LUIZ DALLABRIDA

**NEOFORMAÇÃO ÓSSEA E OSTEINTEGRAÇÃO DE BIOCERÂMICAS DE
FOSFATOS DE CÁLCIO MICRO ESTRUTURADOS EM DIFERENTES
COMPOSIÇÕES EM OVINOS**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em ciência animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para defesa do Doutorado para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Oleskovicz.

LAGES, SANTA CATARINA

2016

ADEMAR LUIZ DALLABRIDA

**NEOFORMAÇÃO ÓSSEA E OSTEINTEGRAÇÃO DE BIOCERÂMICAS DE
FOSFATOS DE CÁLCIO MICRO ESTRUTURADOS EM DIFERENTES
COMPOSIÇÕES EM OVINOS**

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

Banca Examinadora:

Orientador:_____

Prof. Dr. Nilson Oleskovicz
PPGCA/CAV/UDESC

Membro:_____

Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini
PPGCV/UFRGS/Porto Alegre

Membro:_____

Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi
PPGCV/UFRGS/Porto Alegre

Membro:_____

Prof. Dr. Nelson Heriberto Almeida Camargo
PPGEM/UDESC/Joinville

Membro:_____

Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes
PPGCA/CAV/UDESC

Lages, SC, 01/07/2016

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho a minha mulher Luciana e as
minhas filhas Manuella e Marina.
As mulheres da minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Desde que nascemos percorremos um longo caminho em nossa existência, durante essa caminhada passamos por vários desafios e todos eles são enfrentados com a ajuda de muitas pessoas. Familiares e amigos normalmente são as pessoas que sempre estão ao nosso lado quando precisamos de qualquer tipo de ajuda. Agradecimentos se tornam necessários para podermos dizer MUITO OBRIGADO a essas pessoas.

Não existem palavras para agradecer a minha mulher Luciana e minhas filhas Manuella e Marina. Sem a ajuda, incentivo e a paciência de vocês seria impossível realizar este trabalho. Vocês são as coisas mais importantes que Deus colocou na minha vida, amo muito vocês.

Aos meus pais Ademar e Iolanda pelo amor incondicional, por sempre me incentivar, sempre acreditarem em mim e estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Aos meus irmãos Adauto, Alexandre e Elaine por serem os meus melhores amigos. Amo muito essa família maravilhosa.

Ao amigo e professor de Anestesiologia Dr. Nilson Oleskovicz, que mesmo a cirurgia não sendo a sua área de atuação, foi capaz de me possibilitar a realização do meu doutorado aqui na Udesc. Só eu e minha família sabemos o quanto isso foi importante, pois seria impossível realizar minha capacitação em outra cidade.

Ao professor Aury Nunes de Moraes por sempre me incentivar na realização do doutorado como forma de aprimoramento e crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Nelson Camargo, pelo fornecimento dos biomateriais e por todo o apoio fornecido nestes quatro anos.

Agradeço à Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (PGCCA), ao Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) e ao Departamento de Medicina Veterinária (DMV) pela infraestrutura oferecida para a realização do presente trabalho.

Aos professores Aldo Gava e Celso Pilati pela elaboração e avaliação dos exames histológicos realizados no presente estudo.

Aos Professores que compuseram a Banca Examinadora, pela presença, colaboração e atenção despendida ao trabalho.

Os pós-graduandos Douglas Regalin, Bruna Dietzel da Costa, Carina Freccia, Marcos Paulo de Lima, Martielo Ivan Gehrcke e Felipe Coimasseto pela ajuda na realização das cirurgias.

A todos os funcionários que de alguma forma ajudaram no desenvolvimento deste estudo, em especial a Marizete e a Marli que prestaram serviços essenciais para a realização deste trabalho.

A todos os amigos que estiveram ao meu lado e que de uma forma ou de outra me apoiaram nesta caminhada.

RESUMO

DALLABRIDA, Ademar Luiz. Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais microestruturados em ovinos. 2016. 131 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de neoformação óssea de biomateriais em diferentes composições. Foram utilizadas 24 ovelhas mestiças Texel, híbridas, com 12 meses de idade e peso médio de 30 kg (\pm 5kg). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e de Bem-Estar Animal - CETEA da Universidade do Estado de Santa Catarina, com o protocolo número 1.70.12. Foram produzidos três orifícios de seis milímetros de diâmetro em ambas as tíbias dos animais, totalizando seis defeitos. Quatro foram preenchidos por biomateriais e dois por autoenxerto cortical, tratados como controle. Os materiais implantados foram: hidroxiapatita (HA), tricálcio fosfato- β (TCP- β) e os bifásicos HA/TCP- β 80/20, HA/TCP- β 20/80, HA/TCP- β 70/30 e HA/TCP- β 30/70. Foram realizadas radiografias antes da realização das cirurgias e nos períodos: imediatamente após o procedimento cirúrgico, 01, 03, 06 e 12 meses de pós-operatório, como acompanhamento da cicatrização óssea. Após a eutanásia aos 03, 06 e 12 meses as tíbias foram coletadas para avaliação microscópica, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia óptica. Todos os biomateriais testados se mostraram biocompatíveis, apresentando capacidade osteoindutiva, osteocondutiva, osteointegrativa e de neoformação óssea. As avaliações radiográficas demonstraram que todos os biomateriais apresentaram cicatrização completa na região compreendida pela cortical óssea aos 03 meses, porém eles ainda puderam ser visibilizados dentro do canal medular e que os bifásicos 20/80 e 30/70 foram os que demonstraram menor radiopacidade nesse local. A avaliação histológica e de microscopia eletrônica de varredura demonstraram que a HA foi o material que mais demorou a ser absorvido apresentando grande quantidade de biomaterial remanescente aos 12 meses. Por outro lado os bifásicos 20/80, 30/70 e o TCP- β foram os que mais rapidamente foram absorvidos e substituídos por osso neoformado, não sendo mais visibilizados na região cortical das amostras aos 12 meses. Os bifásicos 70/30 e 80/20 apresentaram absorção intermediária quando comparada com os outros biomateriais. Os resultados encontrados no presente estudo demonstram que os bifásicos HA/TCP- β 20/80 e o HA/TCP- β 30/70 foram os que apresentaram absorção e formação óssea mais rápida, seguido pelos biomateriais TCP- β , HA/TCP- β 70/30, HA/TCP- β 80/20 e a HA, respectivamente.

Palavras-chave: Biomaterial. Hidroxiapatita. Tricálcio fosfato- β . Tíbia. Ovinos. Cirurgia.

ABSTRACT

DALLABRIDA, Ademar Luiz. Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais microestruturados em ovinos. 2016. 131 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

The objective of this study was to evaluate the bone formation capabilities of biomaterials in different compositions. They used 24 sheep crossbred Texel, otherwise healthy, with 12 months of age and average weight of 30 kg (\pm 5 kg). This study was approved by the Ethics Committee and Animal Welfare - CETEA of Santa Catarina State University, with the 1.70.12 protocol number. Three holes were produced six millimeters in diameter in both tibias, totaling six defects. Four were filled by Biomaterials and two by cortical autograft treated as control. The materials were implanted: hydroxyapatite (HA), β -tricalcium phosphate (β -TCP) and biphasic HA/ β -TCP 80/20, HA/ β -TCP 20/80, HA/ β -TCP 70/30 and HA/ β -TCP 30/70. Radiographs were taken prior to the surgery and during the periods: immediately after surgery, 01, 03 06 and 12 months postoperatively as monitoring of bone healing. After euthanasia to 03, 06 and 12 months tibias were collected for microscopic evaluation by means of scanning electron microscopy (SEM) and histological exam. All biomaterials tested proved biocompatible, with osteoinductive, osteoconductive, osteointegrative capacity and bone formation. Radiographic assessments showed that all biomaterials showed complete healing in the region encompassed by cortical bone to 03 months, but they could still be visualized within the spinal canal and the biphasic 20/80 and 30/70 were those who showed less radiopacity at that location. Histological evaluation and scanning electron microscopy showed that HA was the material that most took to be absorbed presenting large amount of remaining biomaterial to 12 months. On the other hand biphasic 20/80, 30/70 and TCP- β were those who were more readily absorbed and replaced by newly formed bone, no longer visualized in the cortical region of the samples to 12 months. Biphasic 70/30 and 80/20 showed intermediate absorption when compared to other biomaterials. The results of this study demonstrate that biphasic HA/TCP- β 20/80 and HA/TCP- β 30/70 showed the absorption and faster bone formation, followed by biomaterials TCP- β , HA/TCP- β 70/30 HA/TCP- β 80/20 and HA, respectively.

Keywords: Biomaterial. Hydroxyapatite. Tricalcium phosphate - β . Tibia. Sheep. Surgery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Acesso à tíbia direita de uma ovelha com orifícios a serem preenchidos com os respectivos biomateriais (setas pretas) e grupo controle (seta branca).....37
- Figura 2** - Orifícios de 06 milímetros de diâmetro realizados nas tíbias direita e esquerda de ovelhas, para posterior preenchimento com seus respectivos biomateriais e o grupo controle, sendo “n” o número de orifícios preenchidos com cada tratamento, totalizando 144 orifícios.....38
- Figura 3** - Preparo dos biomateriais para posterior implantação no orifício correspondente. (A) Biomaterial granulado colocado em cuba estéril. (B) Colocação de algumas gotas de sangue do próprio animal para deixar os grânulos com consistência pastosa. (C) Mistura pronta para aplicação nos orifícios elaborados na tíbia.....39
- Figura 4** - (A) Acesso cirúrgico demonstrando os orifícios preenchidos com seus respectivos biomateriais (setas). Notar o início da sutura do periósteo (círculo) durante a síntese dos planos anatômicos. Abaixo deste ponto se encontra o autoenxerto (grupo controle). (B) Detalhe do autoenxerto após ter sido feita a osteotomia com trefina circular e reposicionado em seu leito (seta preta) e orifício a ser preenchido com biomaterial (seta amarela).....40
- Figura 5** - Colocação de bandagens de Robert Jones modificada com calhas metálicas em ambos os membros pélvicos das ovelhas, após a realização das radiografias do pós-operatório imediato, com a finalidade de se prevenir fraturas espontâneas....41
- Figura 6** - Fragmento ósseo coletado de tíbia de ovelha do grupo I (03 meses) com o biomaterial HA. Notar o biomaterial contrastando com o osso em região cortical e canal medular.....43
- Figura 7** - Radiografia de tíbias esquerda (E) e direita (D) colhidas de ovelha após 12 meses da implantação do biomaterial e os tecidos moles terem sido ressecados. Observar os biomateriais dentro do canal medular, as corticais ósseas (colchetes) onde foram realizados os orifícios encontram-se cicatrizadas, o que dificultou a identificação macroscópica do local exato de deposição dos biomateriais. Observar ainda que os grupos controles não são mais visibilizados (círculos).....47
- Figura 8** - Radiografia do pós-operatório imediato em incidências médio-lateral (A) e ântero-posterior (B), evidenciando o local das perfurações corticais com seus respectivos biomateriais (setas cheias) e o local do grupo controle (setas vazadas).....48

Figura 9 - Radiografias do pós-operatório (PO) de membro direito de ovelhas, em incidências médio-lateral (esquerda) e ântero-posterior (direita), evidenciando os biomateriais em canal medular (proximal HA e distal 80/20). (A) pós-operatório imediato demonstrando o local da osteotomia e colocação dos biomateriais (setas brancas) e o controle (seta vazada). (B) Um mês de PO, notar biomateriais bem evidentes em canal medular (setas brancas) e grupo controle parcialmente visibilizado em projeção médio-lateral (seta vazada). (C) Três meses de PO, biomateriais facilmente visibilizados no canal medular (setas Brancas), porém a região cortical apresenta-se totalmente fechada (colchetes) e grupo controle não mais visibilizado. (D) Seis meses de PO, biomateriais ainda podem ser facilmente visibilizados em canal medular (setas). (E) 12 meses de PO, HA e o bifásico 80/20 apresentam a mesma radiopacidade entre eles (setas). Notar a ausência de reação periosteal em todos os momentos avaliados.....49

Figura 10 - Radiografias do pós-operatório (PO) de membro esquerdo de ovelhas, em incidências médio-lateral (esquerda) e ântero-posterior (direita), evidenciando os biomateriais em canal medular (proximal TCP- β e distal 20/80). (A) pós-operatório imediato demonstrando o local da osteotomia e colocação dos biomateriais (setas cheias) e o controle (seta vazada). (B) Um mês de PO, notar biomateriais bem evidentes em canal medular (setas brancas) e grupo controle parcialmente visibilizado em projeção médio-lateral (seta vazada). (C) Três meses de PO, biomateriais facilmente visibilizados no canal medular (setas brancas), porém a região cortical apresenta-se totalmente fechada (colchetes) e grupo controle não mais visibilizado. (D) Seis meses de PO, biomateriais ainda podem ser facilmente visibilizados em canal medular (setas cheias). (E) 12 meses de PO, HA ainda pode ser visibilizado em canal medular (seta cheia), bifásico 20/80 quase totalmente absorvido (setas vazadas). Notar a ausência de reação periosteal em todos os momentos avaliados.....50

Figura 11 - Radiografias de 2 animais (A) e (B) em incidência ântero-posterior, nos períodos: dia 0, 03 meses, 06 meses e 12 meses, evidenciando os biomateriais HA, TCP- β , HA/TCP- β 70/30 e HA/TCP- β 30/70 no canal medular. Notar que o bifásico 30/70 foi que apresentou diminuição mais acentuada da radiopacidade dentro do canal medular quando comparado com os outros biomateriais. Em todas as radiografias da esquerda para a direita demonstram-se os tempos: pós-operatório imediato, 03, 06 e 12 meses de pós-operatório.....51

Figura 12 - Radiografias de 2 animais (A) e (B) em incidência ântero-posterior, nos períodos: dia 0, 03 meses, 06 meses e 12 meses, evidenciando os biomateriais HA, TCP- β , HA/TCP- β 80/20 e HA/TCP- β 20/80 no canal medular. Notar que o bifásico 20/80 foi o que apresentou diminuição mais acentuada da radiopacidade dentro do canal medular quando comparado com os outros biomateriais. Em todas as radiografias da esquerda para a direita demonstram-se os tempos: pós-operatório imediato, 03, 06 e 12 meses de pós-operatório.....52

Figura 13 - Micrografias de MEV dos biomateriais HA, TCP- β e o bifásico 80/20, antes (esquerda) e após 03 meses da implantação (direita) em ovelhas. Notar que todas as amostras apresentam grande microporosidade antes da implantação nos animais e que elas são preenchidas por tecido ósseo neoformado.....58

- Figura 14** - Micrografias de MEVs dos bifásicos 20/80, 70/30 e 30/70 antes (esquerda) e após 03 meses da implantação (direita) nas ovelhas. Notar que todas as amostras apresentam grande microporosidade antes da implantação nos animais e que elas são preenchidas por tecido ósseo neoformado.....59
- Figura 15** - Fotomicrografias de MEVs demonstrando o preenchimento das microporosidades para os grupos II (esquerda) e grupo III (direita), para cada biomaterial, utilizados em ovelhas. Notar que existe muita semelhança no preenchimento das microporosidades para todos os biomateriais.....60
- Figura 16** - Fotomicrografia de microscopia óptica de ovelha do tratamento controle aos 03 meses. Notar a presença de osso lamelar com osteócitos distribuídos em seu interior, canal de Havers, tecido mielóide e células de limpeza (setas amarelas) envoltas por pequena quantidade de tecido fibroso (*) (H&E. Objetiva 40x).....61
- Figura 17** - Fotomicrografia de microscopia óptica de ovelha do tratamento controle aos 03 meses. Notar osso maduro com presença de osteócitos distribuídos em seu interior (pontos pretos) e sistemas osteonais (setas) (H&E. Objetiva 10x).....62
- Figura 18** - Fotomicrografia de microscopia óptica de ovelha do tratamento controle aos 12 meses. Notar osso lamelar compacto retenção de pequena quantidade de osso primário. Presença de tuneis de formação e remodelação óssea (sistemas osteonais - setas). (H&E. Objetiva 10x). Os osteócitos (pontos pretos) apresentam-se mais afastados uns dos outros o que caracteriza osso maduro.....63
- Figura 19** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses do controle (autoenxerto) direito (A e B) e esquerdo (C e D). (A) À esquerda da linha branca observa-se osso compacto com algumas áreas a serem preenchidas por tecido ósseo. À direita da linha branca observa-se osso jovem em formação apresentando grandes espaços a serem preenchidos por osso novo. (B) Notar que as fibras ósseas apresentam estrutura não organizada característica de tecido ósseo jovem. (C) Grande área de osso cortical apresentando aspecto de osso denso (círculo). (D) Osso de região mais próxima da região central do orifício onde foi colocado o autoenxerto. Notar que esta área apresenta-se com grandes espaços a serem preenchidos durante a cicatrização óssea.....65
- Figura 20** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 06 meses do controle (autoenxerto) direito (A e B) e esquerdo (C e D). Imagens das regiões corticais do autoenxerto direito (A) e esquerdo (C) demonstrando a completa cicatrização de ambas com estrutura óssea compacta e homogênea em toda a sua extensão. (B) Imagem ilustrando a ótima qualidade do osso. Notar a grande quantidade de osteócitos (setas brancas) e alguns vasos sanguíneos (setas pretas) distribuídos por toda a superfície óssea. (D) Imagem demonstrando grande quantidade de osteoblastos sobre a superfície óssea (círculo).....66

- Figura 21** - Fotomicrografia de microscopia óptica de ovelha do tratamento HA aos 03 meses. Notar a formação óssea entre o os grânulos de HA (H&E objetiva 10x).....67
- Figura 22** - Fotomicrografia da HA aos 06 meses demonstrando o biomaterial foi totalmente envolvido por osso neoformado, fazendo com ele se apresente de forma a estar sendo encapsulado (setas pretas). Presença de pequena quantidade de tecido mielóide (setas azuis) (H&E. Objetiva 10x).....68
- Figura 23** - Fotomicrografia da HA aos 06 meses. Notar neoformação de osso com sistema osteonal (seta vermelha) junto ao perióstio (seta preta) e presença de cristais de hidroxiapatita circundado por tecido fibroso (*) (H&E, Objetiva 10x).....69
- Figura 24** - Fotomicrografia da HA aos 12 meses. Notar neoformação de osso lamelar sobre cristais de hidroxiapatita sem apresentar sinais de absorção previa. Pequena quantidade de macrófagos (setas) (H&E. Objetiva 10X).....70
- Figura 25** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o biomaterial HA. Notar o biomaterial neoformado osteointegrado pelo osso novo. A maior parte do biomaterial já foi absorvido e substituído por osso neoformado.....71
- Figura 26** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o biomaterial HA. (A) Notar a área cortical de osso neoformado (círculo branco) onde os biomateriais foram totalmente absorvidos. O restante da área correspondente à porção do osso cortical ainda apresenta biomaterial (colchetes). A porção mais interna corresponde a HA dentro do canal medular (círculo preto). (B) Biomaterial totalmente envolvido por osso neoformado apresentando a adesão entre osso e biomaterial (círculo) e osteócitos (setas pretas).....72
- Figura 27** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 06 meses com o biomaterial A. (A) Extensão de osso cortical neoformado (seta branca). A porção de osso cortical que ainda apresenta HA remanescente esta indicada pelos colchetes. (B) Osso neoformado denso, com a presença de osteócitos e biomaterial remanescente em porção mais próxima ao canal medular. (C) Osteoblastos sobre a superfície óssea (setas amarelas) e sobre a HA (seta preta vazada). A seta branca mostra um orifício no osso neoformado que corresponde a um vaso sanguíneo.....73
- Figura 28** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 12 meses com o biomaterial HA. (A) Notar a pequena região cortical (esquerda da linha preta) onde o biomaterial foi totalmente reabsorvido e substituído por osso novo. A maior porção da região cortical (direita da linha preta) apresenta grande quantidade de HA embebida em osso neoformado. (B) HA remanescente osteointegrada ao osso neoformado apresentando características de osso compacto, com a presença de osteócitos e adesão entre os biomateriais e o osso neoformado. (C) HA e osso neoformado com adesão entre eles tornando difícil a distinção dos seus limites (círculo). (D) Osso compacto com estrutura não lamelada e presença de osteócitos (setas pretas), vasos sanguíneos (setas brancas) e canais de Wolkman (seta vazada).....74

- Figura 29** - Fotomicrografia de avaliação histológica de osso de ovelha aos 03 meses com enxerto de TCP- β . Notar a formação de tecido ósseo denso com grande quantidade de osteócitos (pontos pretos) e a presença de biomaterial remanescente sendo absorvido osso novo.....75
- Figura 30** - Fotomicrografia de avaliação histológica de osso de ovelha aos 06 meses com enxerto de TCP- β . Notar a presença de biomaterial remanescente envolto por osso predominantemente secundário (H&E. Objetiva 10x).....76
- Figura 31** - Fotomicrografia de microscopia óptica de ovelha aos 12 meses de osso com enxerto de TCP- β . Notar grânulo de biomaterial remanescente circundado por osso neoformado com predomínio de osso secundário. Presença de osteócitos (pontos pretos) com distância maior entre eles, indicativo de osso maduro, quando comparado com osso primário (jovem) onde os osteócitos se apresentam próximos entre si (H&E. Objetiva 10x).....77
- Figura 32** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o biomaterial TCP- β . Notar interface entre biomaterial e osso neoformado (setas) o que caracteriza a osteointegração deste biomaterial.....78
- Figura 33** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o biomaterial TCP- β . Notar a presença abundante de osteoblastos na superfície óssea (setas) caracterizando boa osteoindução, osteocondução e demonstrando intensa proliferação óssea.....79
- Figura 34** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 06 meses com o biomaterial TCP- β . (A) Linha preta que divide região onde o TCP- β foi totalmente absorvido (esquerda) e região onde ainda apresenta biomaterial remanescente (direita). (B) Região de transição entre área que não apresenta mais biomaterial (esquerda) e a que ainda tem biomaterial remanescente (direita). Notar que existe osteócitos distribuídos por toda extensão do osso neoformado, presença de muitos vasos sanguíneos (setas pretas). (C) Cavidade óssea com presença de osteoblastos em sua superfície (setas brancas) e orifícios correspondentes a vasos sanguíneos (setas pretas).....80
- Figura 35** - Fotomicrografias de MEVs de ovelhas aos 12 meses do biomaterial TCP- β . (A) Notar que toda a extensão do osso cortical que é de aproximadamente de 3 mm, apresenta-se com reabsorção total dos biomateriais e substituição por osso neoformado. À direita da linha preta ainda é possível visibilizar o biomaterial. (B) TCP- β remanescente envolto por osso neoformado jovem com a presença de osteócitos (setas brancas) e vasos sanguíneos (setas pretas). (C) Região de interface entre osso e TCP- β demonstrando a adesão entre eles (retângulo).....81
- Figura 36** - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 03 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 80/20. Corte histológico demonstrando região de transição entre osso cortical e canal medular. Notar a presença grânulos de biomaterial remanescente nesta região (H&E objetiva 4x).....82

- Figura 37** - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 06 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 80/20. Notar a grande quantidade de macrófagos mononucleares – setas pretas), osteoclastos mononucleares (setas verdes) e osteoclastos multinucleares (círculo verde). Notar também a pequena quantidade de osso neoformado na superfície do biomaterial (seta amarela) (H&E. Objetiva 40x).....83
- Figura 38** - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 12 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 80/20. Notar quantidade moderada de biomaterial circundado predominantemente por osso secundário com presença de pequena quantidade de osteócitos (pontos pretos). Pouca atividade celular e presença de pequena quantidade de tecido fibroso na região do endóstio (setas) (H&E. Objetiva 10x).....84
- Figura 39** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o bifásico HA/TCP- β 80/20 demonstrando a relação de osso neoformado à esquerda da linha preta e o biomaterial remanescente à direita da linha preta.....85
- Figura 40** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 06 meses com o bifásico HA/TCP- β 80/20. (A) Linha preta dividindo região cortical à esquerda com osso neoformado. Notar que os biomateriais foram totalmente absorvidos. À direita presença de biomaterial osteointegrado pelo novo osso formado. (B) Biomaterial remanescente osteointegrado em osso neoformado compacto. Notar as fibras ósseas com características de osso não lamelar, com osteócitos (setas vazadas) e vasos sanguíneos, características de osso jovem (setas pretas).....86
- Figura 41** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 12 meses com o bifásico HA/TCP- β 80/20. (A) Linha preta dividindo área cortical totalmente substituído por osso neoformado (esquerda) e área com biomaterial remanescente (seta) (B) Biomaterial remanescente osteointegrado em osso neoformado com osteócitos e vasos sanguíneos (setas). (C) Cavidade óssea mostrando osteoblastos sobre a superfície óssea (setas pretas) e sobre os biomateriais granulados (setas vazadas).....87
- Figura 42** - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 03 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 20/80. Observar a formação óssea com presença de osteócitos (setas) e ausência de biomaterial em região cortical. Formação de tecido jovem com lamela concêntrica ainda em formação (círculo) (H&E. Objetiva 40x).....88
- Figura 43** - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 06 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 20/80. Notar presença de biomaterial completamente envolto por tecido ósseo compacto com presença de osteócitos (pontos pretos). Presença de osso primário e secundário (lamelar – seta azul) com sistemas osteonais (setas pretas) e canis de Volkmann (setas brancas) (H&E. Objetiva 10x).....89

- Figura 44** - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 12 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 20/80. Notar o biomaterial circundado por tecido ósseo predominantemente secundário. Neste grupo a atividade celular se encontra bastante reduzida. Presença de osteócitos (pontos pretos) distantes entre si característica de osso maduro (H&E. Objetiva 10x).....90
- Figura 45** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o bifásico HA/TCP- β 20/80. Notar a extensão de osso cortical de aproximadamente 2 mm (à direita da linha preta) onde o biomaterial foi totalmente absorvido e substituído por osso neoformado. À esquerda biomaterial remanescente sendo envolvido por osso neoformado. Pode se observar ainda que a formação óssea esta ocorrendo da porção mais externa do osso cortical em direção ao canal medular (seta).....91
- Figura 46** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 06 meses com o bifásico HA/TCP- β 20/80. (A) Região de osso cortical demonstrando a extensão de osso neoformado e a quantidade de biomaterial remanescente (círculos pretos). (B) Biomaterial remanescente totalmente envolvido por osso neoformado com aspecto de osso compacto, revelando a presença de osteócitos e vasos sanguíneos (setas). (C) Biomaterial totalmente osteointegrado pelo osso neoformado. Notar a presença de osteócitos (setas pretas) e vasos sanguíneos (setas brancas) em sua volta. (D) Círculo demonstrando a interface entre osso e biomaterial revelando adesão entre eles caracterizando a osteointegração.....92
- Figura 47** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 12 meses com o bifásico HA/TCP- β 20/80. (A) Osso cortical neoformado com absorção completa do biomaterial neoformado. Notar que o biomaterial remanescente se encontra a partir de 3,8 mm da superfície cortical (círculo). (B) Macroporos entre o biomaterial granulado sendo preenchido por osso. Notar que o biomaterial esta sendo recoberto pelo osso neoformado. (C) Osteoblastos em superfície óssea demonstrando intensa produção óssea.....93
- Figura 48** - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 03 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 70/30. (A) Notar a presença de biomaterial (setas pretas) envolvido por osso cortical neoformado (setas brancas), H&E objetiva 10x. (B) Tecido fibroso (círculo) presente em osso cortical de um animal do grupo 70/30 (H&E. Objetiva 40x).....94
- Figura 49** - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 06 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 70/30. Notar que o biomaterial apresentau osteoclastos em sua periferia (setas) com pequena neoformação óssea entre eles (H&E. Objetiva 40x).....95
- Figura 50** - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 12 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 70/30. Notar a formação de tecido fibroso (setas pretas) distribuido de forma aleatória entre o biomaterial granulado e que entre eles existe pouca formação óssea (setas vermelhas) (H&E. Objetiva 10x).....96

- Figura 51** - Fotomicrografia de MEVs de osso de ovelha aos 03 meses com o bifásico HA/TCP- β 70/30. (A) À direita da linha preta região onde o biomaterial foi absorvido. À esquerda da linha preta o biomaterial remanescente envolto por osso neoformado. (B) Osteoblastos na superfície óssea (círculo).....97
- Figura 52** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o bifásico HA/TCP- β 70/30. (A) À direita da linha preta pode se observar a área com mais de um milímetro de extensão onde o biomaterial foi totalmente absorvido e substituído por osso neoformado. À esquerda da linha preta observa-se biomaterial remanescente. (B) Osso compacto com osteócitos (setas brancas) e vasos sanguíneos (setas pretas). (C) Região de interface entre biomaterial e osso (círculo). Notar a perfeita adesão entre eles.....98
- Figura 53** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 12 meses com o bifásico HA/TCP- β 70/30. (A) À esquerda da linha preta se observa área de osso cortical onde o biomaterial foi totalmente absorvido e substituído por osso novo. À direita da linha preta pode se observar o biomaterial remanescente osteointegrado pelo osso neoformado. (B) Osso de região cortical onde houve a substituição completa do biomaterial por osso. Notar a presença de osteócitos o que indica osso denso e maduro, (setas pretas) e orifícios correspondentes a vasos sanguíneos (setas vazadas). (C) MEV evidenciando a região de interface entre osso e biomaterial. Notar a perfeita adesão entre eles (círculo).....100
- Figura 54** - Fotomicrografia de exame histológico de osso de ovelha aos 03 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 30/70. Observar osso cortical lamelar (setas brancas) com pequena presença de biomaterial (setas amarelas), tecido mielóide (setas pretas) e células inflamatórias e de limpeza distribuídas aleatoriamente (setas vermelhas) (H&E objetiva 4x).....101
- Figura 55** - Fotomicrografia de exame histológico de osso de ovelha aos 06 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 30/70. Biomaterial circundado por células de limpeza composta por macrófagos (setas). Predomínio de osso secundário (H&E. Objetiva 10x).....102
- Figura 56** - Fotomicrografia de exame histológico de osso de ovelha aos 06 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 30/70. Notar a presença de macrófagos mononucleares com citoplasma vacuolizado e com a presença de grânulos de biomaterial no seu interior (setas verdes). Também pode se observar osteoclastos na superfície dos biomateriais (setas pretas) (H&E. Objetiva 40x).....103
- Figura 57** - Fotomicrografia de óptica de osso de ovelha aos 12 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 30/70. Notar a formação óssea com a presença de osteócitos distribuídos no seu interior (pontos pretos) e o biomaterial remanescente sendo absorvido. Presença de sistemas osteonais (setas) o que demonstra a formação óssea em curso (H&E. Objetiva 10x).....104

- Figura 58** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o bifásico HA/TCP- β 30/70. Observar a porção do osso cortical onde o biomaterial foi absorvido e substituído por osso novo (linhas brancas). O restante da região cortical que ainda apresentou biomaterial remanescente esta representada pela linha preta. Notar que o biomaterial está envolto por osso neoformado.....105
- Figura 59** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 06 meses com o bifásico HA/TCP- β 30/70. (A) Região de osso cortical demonstrando extensão com osso neoformado (linha branca) e pouco biomaterial remanescente. (B) Osso compacto demonstrando orifícios correspondentes a vasos sanguíneos (setas). (C) Região de interface entre osso e biomaterial caracterizando a adesão entre eles (círculo).....106
- Figura 60** - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 12 meses com o bifásico HA/TCP- β 30/70. (A) Região à direita da linha preta demonstra a porção de osso cortical em que o biomaterial foi absorvido e substituído por osso novo. À esquerda da linha preta biomaterial que não foi absorvido. (B) Osso cortical com o biomaterial remanescente. Notar a grande quantidade de vasos sanguíneos (setas brancas) e osteócitos (setas pretas) distribuídos por todo osso neoformado. (C) Região de interface entre osso novo e o biomaterial demonstrando a adesão entre eles (círculo).....107
- Figura 61** - Fotomicrografia de MEV dos biomateriais aos 03 meses de pós-operatório, demonstrando a relação entre a neoformação óssea e os biomateriais remanescentes. Nesse período de avaliação os bifásicos 30/70 e 20/80 foram os que demonstraram melhor neoformação óssea e osteointegração do biomaterial pelo novo tecido ósseo formado e consequentemente maior formação de osso * = osso neoformado X = biomaterial remanescente.....109
- Figura 62** - Fotomicrografia de MEV dos biomateriais aos 06 meses de pós-operatório, demonstrando a relação entre a neoformação óssea e o biomaterial remanescente. Nesse período de avaliação os bifásicos 30/70 e 20/80 foram os que demonstraram melhor neoformação óssea e osteointegração do biomaterial pelo novo tecido ósseo formado e consequentemente maior formação de osso * = osso neoformado X = biomaterial remanescente.....110
- Figura 63** - Fotomicrografia de MEV dos biomateriais aos 12 meses de pós-operatório, demonstrando a relação entre a neoformação óssea e o biomaterial remanescente. Nesse período de avaliação os bifásicos 30/70 e 20/80 foram os que demonstraram melhor neoformação óssea e osteointegração do biomaterial pelo novo tecido ósseo formado e consequentemente maior formação de osso * = osso neoformado X = biomaterial remanescente.....111
- Figura 64** - Fotomicrografias de MEV de biomateriais enxertados em tíbias de ovelhas evidenciando a interface entre o biomaterial e o osso neoformado em quatro tipos de biomateriais (círculos). Notar que em todas elas existe uma estreita adesão entre osso e biomaterial.....112

Figura 65 - Fotomicrografias de MEV demonstrando grande quantidade de osteoblastos na superfície óssea de tíbias de ovelhas de diferentes grupos. (A) Bifásico HA/TCP- β 30/70 03 meses (setas), (C) Bifásico HA/TCP- β 70/30 06 meses (setas) e (E) TCP- β 06 meses (setas). (B) HA 06 meses, (D) Bifásico HA/TCP- β 20/80 12 meses e (F) Bifásico HA/TCP- β 20/80 12 meses evidenciando osteoblastos com grande quantidade de projeções citoplasmáticas (filapodia). Em (F) detalhe do osteoblasto totalmente envolto por osso neoformado, momentos antes de se tornar um osteócito.....113

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Critérios semi-quantitativos utilizados na avaliação histológica dos biomateriais HA e TCP- β e seus bifásicos HA/TCP- β 80/20, HA/TCP- β 20/80, HA/TCP- β 70/30 e HA/TCP- β 30/70. Foram classificados quanto: neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), osso secundário (OS), presença de osteoclastos (PO), formação de tecido mielóide (FTM) e macrófagos (MA) utilizados para análise por microscopia óptica.....44
- Tabela 2** - Resultados obtidos quanto ao biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), osso secundário (OS), presença de osteoclastos (PO), formação de tecido mielóide (FTM) e macrófagos (MA), dos biomateriais implantados e no grupo controle após 03 meses, obtidos dos fragmentos ósseos de tíbias de ovinos.....55
- Tabela 3** - Resultados obtidos quanto ao biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), osso secundário (OS), presença de osteoclastos (PO), formação de tecido mielóide (FTM) e macrófagos (MA), dos biomateriais implantados e o grupo controle após 06 meses, obtidos dos fragmentos ósseos de tíbias de ovinos.....56
- Tabela 4** - Resultados obtidos quanto ao biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), osso secundário (OS), presença de osteoclastos (PO), formação de tecido mielóide (FTM) e macrófagos (MA), dos biomateriais implantados e o grupo controle aos 12 meses, obtidos dos fragmentos ósseos de tíbias de ovinos.....57

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Escala de cicatrização óssea para avaliação radiográfica do grupo controle e biomateriais no pós-operatório imediato, 01, 03, 06 e 12 meses de pós-operatório.....42
- Quadro 2** - Avaliação radiográfica aos 03 meses caracterizando a cicatrização óssea do controle e dos biomateriais nos tempos: pós-operatório imediato, 01 e 03 meses de pós-operatório, sendo 0 = cicatrização ausente, 1 = parcial e 2 = total.....53
- Quadro 3** - Avaliação radiográfica aos 06 meses caracterizando a cicatrização óssea do grupo controle e os biomateriais nos tempos: pós-operatório imediato, 01, 03 e 06 meses de pós-operatório, sendo 0 = cicatrização ausente, 1 = parcial e 2 = total.53
- Quadro 4** - Avaliação radiográfica aos 12 meses caracterizando a cicatrização óssea do controle e dos biomateriais nos tempos: pós-operatório imediato, 01, 03, 06 e 12 meses de pós-operatório, sendo 0 = cicatrização ausente, 1 = parcial e 2 = total.....54

LISTA DE ABREVIATURAS

μm	milimícron
BCP	fosfato de cálcio bifásico
BMPs	proteínas morfogenéticas ósseas
HÁ	hidroxiapatita
HA/TCP- β	hidroxiapatita/tricálcio fosfato- β
HA/TCP- β 20/80	hidroxiapatita/tricálcio fosfato- β 20/80
HA/TCP- β 30/70	hidroxiapatita/tricálcio fosfato- β 30/70
HA/TCP- β 70/30	hidroxiapatita/tricálcio fosfato- β 70/30
HA/TCP- β 80/20	hidroxiapatita/tricálcio fosfato- β 80/20
HECV	Hematoma epidural da coluna vertebral
IGF	Fatores de crescimento da insulina
MEVs	microscopias eletrônica de varredura
MO	microscopia óptica
Nm	nanômetro
PDGF	Fatores de crescimento derivados das plaquetas
PO	pós-operatório
PTTE	politetrafluoretileno

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO OSSO.....	26
2.2	CICATRIZAÇÃO ÓSSEA.....	28
2.3	BIOMATERIAIS E ENXERTOS ÓSSEOS.....	29
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	ANIMAIS.....	35
4.2	PREPARO PRÉ-OPERATÓRIO.....	35
4.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	36
4.4	PÓS-OPERATÓRIO.....	40
4.5	AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA.....	41
4.6	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.....	42
4.6.1	Avaliação Histológica.....	43
4.6.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44
5	RESULTADOS.....	46
5.1	AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA.....	57
5.2	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	54
5.2.1	Avaliação dos Grânulos dos Biomateriais Antes e Após a Implantação	57
5.2.2	Controle – Tratamento com Autoenxerto.....	60
5.2.2.1	Avaliação Histológica.....	60
5.2.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	63
5.2.3	Hidroxiapatita (HA).....	67
5.2.3.1	Avaliação Histológica.....	67
5.2.3.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	70
5.2.4	Fosfato Tricálcico Beta (TCP-β).....	75
5.2.4.1	Avaliação Histológica.....	75
5.2.4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	77
5.2.5	Bifásico HA/TCP-β 20/80.....	82

5.2.5.1	Avaliação Histológica.....	82
5.2.5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	84
5.2.6	Bifásico HA/TCP- β 20/80.....	88
5.2.6.1	Avaliação Histológica.....	88
5.2.6.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	90
5.2.7	Bifásico HA/TCP- β 70/30.....	94
5.2.7.1	Avaliação Histológica.....	94
5.2.7.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	96
5.2.8	Bifásico HA/TCP- β 30/70.....	105
5.2.8.1	Avaliação Histológica.....	101
5.2.8.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	104
6	DISCUSSÃO.....	114
6.1	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	123
7	CONCLUSÃO.....	125
	REFERÊNCIAS.....	126

INTRODUÇÃO

A aplicação de biomateriais remonta à pré-história, como indicia a descoberta de crânios com trepanações nas quais foram utilizadas placas de ouro e prata. Estão também descritas, há milhares de anos, a aplicação de implantes dentários e a utilização de fios de sutura. Mais recentemente, a sua utilização sofreu um forte impulso com o aparecimento de lentes intra-oculares, próteses articulares, implantes mamários, próteses valvulares e vasculares. No entanto, a palavra “biomaterial” como se aplica atualmente, só há poucos anos foi introduzida na nomenclatura médica.

Na conferência de Chester, em 1991, definiu-se biomaterial como um “material destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo”. Ao ser aplicado, deve manter as suas propriedades e características estruturais, mas simultaneamente substituir a função para a qual foi criado. É também importante que permita boa adesão celular à sua superfície, tenha resistência mecânica adequada, não tenha características oncogênicas, seja hemostático, esterilizável e, por fim, que a sua produção em grandes quantidades seja fácil e com custos aceitáveis (GUTIERRES et al. 2006).

Segundo Willians (1987), biomaterial é toda substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que não sejam drogas ou fármacos, e que podem ser usadas durante qualquer período de tempo, como parte ou como todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo.

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

Diante destas limitações, alguns materiais biocompatíveis são pesquisados para aplicação clínica. Com o propósito de evitar enxertos ósseos autógenos, o material deve responder a determinados requisitos, como possuir estrutura estável, rapidez na incorporação com o tecido ósseo, promover osteocondução e gerar pouca ou nenhuma complicação associada ao seu uso (MELLONIG, 1991). Respeitando estas exigências, o fosfato de cálcio, um biomaterial cerâmico comercializado desde 1970 na forma de hidroxiapatita e tricálcio

fosfato, tem recebido considerável atenção no campo da cirurgia plástica, ortopédica e odontológica (ONO et al.1992; OONISHI, 1991).

Os biomateriais micro e nanoestruturados de fosfatos de cálcio e nanocompósitos, são uma nova classe de biomateriais que vem sendo pesquisados e desenvolvidos por diferentes laboratórios de pesquisa, capazes de oferecer características microporosas com elevada área superficial de grãos e microporos, condições favoráveis a molhabilidade, capilaridade, adesão celular na superfície de grãos e de microporos (DALMÔNICO, 2012).

O advento da nanociência traz a humanidade uma nova perspectiva em biologia: todos os sistemas biológicos são governados pelos comportamentos moleculares em escalas nanométricas. Todos os tecidos biológicos têm suas mais básicas estruturas, propriedades e funções definidas em nano escalas a partir dos seus primeiros níveis de organização (HONG et al. 2010).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento da formação óssea in vivo da hidroxiapatita (HA) e do tricálcio fosfato beta (TCP- β), e seus bifásicos, hidroxiapatita/tricálcio fosfato- β 80/20 (HA/TCP- β 80/20), hidroxiapatita/tricálcio fosfato- β 20/80 (HA/TCP- β 20/80), hidroxiapatita/tricálcio fosfato- β 70/30 (HA/TCP- β 70/30) e hidroxiapatita/tricálcio fosfato- β 30/70 (HA/TCP- β 30/70), implantados em tíbias de ovelhas.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO OSSO

O osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004), extremamente duro, mas com grande plasticidade, apresentando um metabolismo altamente complexo, com potencial de reparação envolvendo íons, células, hormônios, proteínas e fatores nutricionais (LAUREANO FILHO et al. 2007).

Macroscopicamente o osso divide-se em cortical e esponjoso, o osso cortical é denso, presente no eixo de ossos longos, em que a matriz de colágeno está organizada em forma de lamelas concêntricas, geralmente ao redor de um canal vascular central constituindo o sistema de Havers. Os canais centrais, contendo nervos e vasos sanguíneos, comunicam-se entre si e com a cavidade medular óssea através dos canais de Volkmann. A superfície óssea externa é revestida por uma membrana denominada perióstio e a superfície interna, pelo endóstio. Ambas têm a função de nutrir o osso, além de servir como fonte de osteoblastos para a osteogênese (ISOLA, 2012).

O osso é constituído basicamente por dois componentes: orgânicos e inorgânicos. A porção orgânica é formada por células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos), fibras colágenas e substância base (proteoglicanos e glicoproteínas). As células que compõem a estrutura óssea exercem funções diferentes, conforme descrição feita por diferentes autores (LAUREANO FILHO et al. 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005, NOBLE, 2008; PELISSIER et al. 2004; ROSS; ROWRELL, 1993). Segundo eles, osteoblastos são células osteogênitoras responsáveis pela formação da estrutura óssea e produzem grande quantidade de proteínas, principalmente o colágeno, fundamental na organização da matriz óssea. Geralmente encontrados sobre a superfície da estrutura óssea em regiões onde está ocorrendo o processo de reparação e formação óssea.

Os osteoblastos são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz e em fase de síntese mostram as características ultra estruturais das células produtoras de proteínas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Os osteoblastos, além da produção dos componentes da matriz, funcionam como transmissores de sinais para a remodelação. Estas células são completamente diferenciadas e não apresentam capacidade de migração e proliferação. Assim, para permitir que ocorra a formação óssea em um sítio determinado, células progenitoras mesenquimais indiferenciadas (células osteoprogenitoras)

podem migrar para o sítio e proliferar para se tornar então osteoblastos. A diferenciação e o desenvolvimento dos osteoblastos pelas células osteoprogenitoras são dependentes da liberação das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e de outros fatores de crescimento tais como fatores de crescimento da insulina (IGF), fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e fatores de crescimento dos fibroblastos (SANTOS, 2011).

Osteócitos são células provenientes dos osteoblastos que ficam retidos na matriz óssea durante o processo de reparação e formação óssea. Estas células regulam a quantidade de minerais no tecido ósseo pela difusão de nutrientes dentro da estrutura óssea através de lacunas das quais partem canalículos, cada lacuna contém apenas um osteócito. Dentro dos canalículos os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contatos através de junções comunicantes, por onde podem passar pequenas moléculas e íons de um osteócito para o outro. Esse arranjo permite aos osteócitos participar na regulação da homeostasia do cálcio sanguíneo e perceber a carga mecânica e transmitir essa informação às outras células dentro do osso. Os osteócitos são células com a forma estrelada, achatadas, que exibem pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi pouco desenvolvido e com núcleo com cromatina condensada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas derivadas dos macrófagos e responsáveis pela remoção do osso, processo denominado osteoclasia. Possuem os mecanismos celulares necessários para dissolução dos materiais ósseos e para a digestão da matriz orgânica. Estas células têm numerosos núcleos no interior do citoplasma acidófilo e vacuolizado. São polarizadas, e os núcleos deslocados para a periferia celular oposta ao osso. Acredita-se que o osteoclasto bombeie íons hidrogênio (H^+) e cloro (Cl^-) através da borda em escova, originando ácido clorídrico (HCl) que dissolve a hidroxiapatita e secrete collagenase e outras proteases que degradam a matriz orgânica óssea (ISOLA, 2012).

A parcela inorgânica da matriz óssea é secretada principalmente pelos osteoblastos. O principal componente inorgânico é o fosfato de cálcio, responsável por dois terços do peso ósseo. O fosfato de cálcio interage com o hidróxido de cálcio transformando-se em hidroxiapatita. Conforme ocorre a formação dos cristais de hidroxiapatita, outros materiais inorgânicos como o carbonato de cálcio, sódio, magnésio e fluoreto vão se incorporando a ele (CONSTANTINESCU, 2002).

2.2 CICATRIZAÇÃO ÓSSEA

Dentre os diversos processos de reparação tecidual, a reparação óssea se apresenta como um dos mais complexos, sendo foco de interesse nas pesquisas na área de cirurgia e traumatologia (LAUREANO FILHO et al. 2007).

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

Quando ocorre uma fratura, há hemorragia, devido aos danos causados nos vasos sanguíneos, além de destruição da matriz e de células ósseas. O início do processo de reparação ocorre através da remoção dos coágulos sanguíneos e fragmentos celulares por macrófagos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A cicatrização não ocorre sem angiogênese, que é reconhecida como passo essencial na osteogênese, em função da proximidade das células capilares com osteoblastos e células osteoprogenitoras nos sítios de nova formação óssea (PELISSIER et al. 2004).

A matriz óssea mineralizada é coberta por duas membranas não calcificadas de natureza conjuntiva, que, embora geralmente seja dito que a separam dos outros tecidos, devem ser consideradas membranas que possibilitam uma gradual relação entre um tecido mineralizado e o restante do organismo. São elas o perióstio e o endóstio. O perióstio, mais externamente, é constituído de fibras colágenas e fibroblastos, e na sua região mais interna, além de uma camada de células de revestimento potencialmente osteogênica, possui células indiferenciadas. Já o endóstio é constituído apenas por uma camada de osteoblastos ou de células de revestimento e apresenta, em geral, mais atividade que o perióstio (SANTOS, 2011).

A associação da hidroxiapatita com fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo. Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: o imaturo ou primário, e o maduro, secundário ou lamelar. Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz. No tecido primário as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida, no lamelar, as fibras se organizam em lamelas. O osso primário tem menor quantidade de minerais e maiores proporções de osteócitos do que o lamelar. Este por sua vez possui fibras colágenas organizadas em lamelas de três a sete micrômetros de espessura, que ficam paralelas umas às outras, ou se dispõem em camadas

concêntricas em torno de canais com vasos, formando o sistema de Havers ou ósteons. Cada ósteon é um cilindro, às vezes bifurcado, formado por quatro a 20 lamelas ósseas concêntricas. No centro desse cilindro ósseo existe um canal revestido de endóstio, o canal de Havers, que contém vasos e nervos. Os canais de Havers comunicam-se entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso por meio de canais transversais ou oblíquos, que atravessam as lamelas, os canais de Volkmann (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004, MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005, ROSS; ROWRELL, 1993).

Em um osso maduro, geralmente dois tipos de tecidos podem ser diferenciados macroscopicamente: o osso esponjoso e o osso compacto. Entretanto em ambos a estrutura é basicamente a mesma, sendo constituídos por sistemas lamelares e existindo diferenças apenas na quantidade e disposição das lamelas e na existência ou não de espaços entre os referidos sistemas. O osso esponjoso é formado por lamelas, na sua maioria paralelas entre si. As lamelas formam delgadas trabéculas que deixam, entre elas, amplos espaços preenchidos por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e tecido hematopoiético, constituindo, portanto, parte da medula óssea. O osso compacto é formado por numerosos sistemas de lamelas concêntricas (SANTOS, 2011).

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

A violação dos princípios da cirurgia ortopédica, podem causar distúrbios na reparação de fraturas, tendo como consequência a união retardada ou não-união óssea (MORAES, 2006; SCHMAEDECKE et al. 2003). Além disso, traumas, anormalidades do desenvolvimento, neoplasias e diversas doenças podem provocar defeitos ósseos (ARINZEH et al. 2003).

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

2.3 BIOMATERIAIS E ENXERTOS ÓSSEOS

A procura por biomateriais ganhou força devido à necessidade de se encontrar substitutos para o enxerto autógeno. Quando tecidos orgânicos sofrem doenças severas ou são

perdidos por câncer, anormalidades congênitas ou traumas, os tratamentos convencionais não são mais aplicáveis. Órgãos artificiais (incluindo tecidos) ou transplantes de órgãos são a primeira escolha para reconstruir os tecidos ou órgãos danificados. A elaboração de órgãos artificiais tem apresentado grandes avanços na engenharia biomédica nas últimas décadas, mas eles ainda precisam de superior biocompatibilidade e biofuncionalidade. Os problemas com os transplantes de órgãos incluem dificuldade para se encontrar os doadores e a rejeição, embora a terapia imunossupressiva tenha apresentado grandes avanços (SAHITHI et al. 2010).

Na engenharia de tecidos existe a necessidade de estrutura que dê suporte para a reparação dos tecidos. Para essa estrutura tecidual desempenhar as funções de suporte, elas devem apresentar alguns pré-requisitos: ter microporos interconectados para que várias células possam migrar para dentro do tecido, aumentar o número de células e suprir com quantidades suficientes de nutrientes. Os microporos possibilitam tanto a formação vascular quanto o transporte através deles. Isto é muito importante para a sobrevivência das células dentro dessas estruturas teciduais (JENSEM et al. 2007; OKAMOTO et al. 2006) .

O tamanho indicado dos microporos fica entre 100 e 500 μ m. Além disso, devem possuir adequada área de superfície e resistência mecânica. A absorção cinética das estruturas de suporte também é crítica e depende do tecido a ser reparado. Se as microestruturas de suporte forem utilizadas em engenharia do tecido esquelético, a degradação da estrutura de sustentação (biomaterial) deverá ser relativamente lenta, para que possa ser mantida a força mecânica até que a reparação tecidual esteja quase completa (LIM et al. 2015; MAYR et al. 2015; SAHITHI et al. 2010; WANG et al. 2007).

Biomateriais que são utilizados como implantes ortopédicos, como por exemplo, o titânio e suas ligas, apresentam uma vida média entre 10 – 15 anos. Uma das maiores razões para a falha dos implantes ortopédicos é a falta de suficiente integração do material implantado e a superfície óssea. A pobre integração do implante com a superfície óssea pode causar a formação de fragmentos, bem como tensão entre a interface do implante e o osso, causando eventuais falhas no dispositivo de fixação. Por causa destes problemas, existe o interesse pelo desenvolvimento de biomateriais para promover o crescimento ósseo para o campo da ortopedia (SAHITHI et al. 2010). Como a matriz mineral óssea é composta por um tipo de fosfato de cálcio, vários fosfatos de cálcio são pesquisados e desenvolvidos com interesse de aplicação como substitutos ósseos (DOROZHKIN, 2007).

Shirane et al. (2010), por sua vez, avaliaram a importância do colágeno e hidroxiapatita na reparação de fraturas provocadas experimentalmente na fíbula de ratos e

concluíram que os biomateriais utilizados possuem capacidade osteocondutora mesmo observando-se baixa neoformação óssea. Além disso, a hidroxiapatita é capaz de se incorporar ao tecido ósseo por meio da estimulação osteocondutiva e osteoindutiva, não apresenta rejeição e oferece resistência biomecânica no local do implante (MELLONIG, 1991; ONO et al. 1992).

Para que o biomaterial seja considerado bom é importante que ele apresente as características de osteoindução, osteocondução e osteointegração e segundo Albrektsson; Johansson (2001), *osteoindução* significa que as células primitivas, indiferenciadas e pluripotentes são de alguma forma estimuladas a se desenvolver em linhagem de células formadoras de osso, ou seja, é o processo pelo qual a osteogênese é induzida. A osteoindutividade é a capacidade de um biomaterial para recrutar e induzir células indiferenciadas ou células progenitoras para formação de células de linhagem osteoblástica (SAMAVEDI et al. 2013). A *osteocondução* significa que o osso cresce na superfície do biomaterial. Uma superfície osteocondutiva é aquela que permite crescimento ósseo em sua superfície ou dentro dos microporos e canais. A *osteointegração* é o contato direto (em nível microscópico) entre tecido ósseo vivo e o implante sem a formação de tecido fibroso entre eles.

Nas últimas décadas, biomateriais sintéticos incluindo a hidroxiapatita (HA) e o tricálcico fosfato beta (TCP- β), foram amplamente pesquisados como biomateriais de substituição óssea. Esses biomateriais sintéticos de substituição óssea demonstraram ser biocompatíveis e possuem características que permitem a formação óssea, isto é, osteocondutividade. No entanto, esses biomateriais mostraram em muitos casos, comportamento diversificado da solubilidade que restringem as suas propriedades de regeneração óssea. Por um lado, biomateriais de substituição óssea de hidroxiapatita são conhecidos por persistir dentro do local de implantação por um longo período, o que restringe a nova formação óssea dentro da área receptora. Embora a hidroxiapatita sintética demonstre boa osteocondutividade, sua bioreabsorção é baixa e ela permanece no organismo por muito tempo após a implantação; a hipótese é de que o material implantado seja reabsorvido por meio da formação óssea, seguido pela total substituição por tecido ósseo natural, após estimular a formação óssea (KAMITAKAHARA; OTHSUKI; MIYASAKI, 2008). Hidroxiapatita é amplamente utilizada como substituto ósseo, porque a sua composição é a que mais se aproxima a do osso. Entre as diferentes cerâmicas monofásicas, a hidroxiapatita é a mais estável e menos solúvel (SAMAVEDI et al. 2013). Em contraste, substitutos ósseos a

base de TCP- β são caracterizados por uma taxa de degradação rápida, que pode levar a falha do implante devido à sua inadequada propriedade osteocondutora (GHANAATI et al. 2012).

O fosfato tricálcico- β (TCP- β), por sua vez, foi um dos primeiros compostos de fosfato de cálcio a ser usado como substituto ósseo, sendo que possui propriedades osteointegrativas e osteocondutivas (MOORE, 2001). O TCP- β apresenta maior solubilidade do que a hidroxiapatita e é degradado mais rapidamente do organismo (DUCHEYNE; RADIN; KING, 1993; SAMAVEDI et al. 2013). Biocerâmicas bifásicas à base de HA e TCP- β são desenvolvidas e demonstraram que a sua reabsorção aumenta conforme se aumenta a proporção TCP- β /HA. Com estes compósitos, se observa deposição de cristais de apatita óssea na superfície dos compostos bifásicos, que se deve, provavelmente, à precipitação de íons cálcio e fosfato liberados do componente TCP- β do bifásico (DACULSI; LEGEROS, 1996).

Os bifásicos de HA/TSC são uma família de cerâmicas que combinam a baixa solubilidade e osteocondutividade da apatita com o osteoindutividade de uma fase mais solúvel tal como o TCP. Os bifásicos HA/TCP são produzidos misturando fisicamente HA e TCP, ou quimicamente por sinterização de apatitas deficientes em cálcio, à temperaturas elevadas para resultar numa mistura de duas fases diferentes. Propriedades químicas específicas dos bifásicos, tais como a solubilidade, depende grandemente das características das fases individuais e as suas quantidades relativas (SAMAVEDI et al. 2013).

No entanto, a capacidade de bioreabsorção dos fosfatos de cálcio depende não somente da solubilidade dos constituintes do material, mas também da morfologia, de grãos da microporosidade do biomaterial. A importância da microestrutura dos poros dos fosfatos de cálcio tem sido reportada por muitos pesquisadores e já se sabe que controlando as microestruturas das cerâmicas de fosfatos de cálcio, podem se desenvolver substitutos ósseos com propriedades osteoindutivas intrínsecas. As cerâmicas TCP- β microporosas podem ser úteis, pois as células relacionadas à formação óssea podem ser atraídas. As cerâmicas serão degradadas com a formação óssea (KAMITAKAHARA; OTHSUKI; MIYASAKI, 2008). Entre as cerâmicas com melhor desempenho, estão os biovidros, a alumina, o fosfato tricálcico- β e a hidroxiapatita (HENCH, 1991).

Tem sido relatado que os microporos maiores do que 150 μm podem facilitar a formação interna do osso mineralizado. Além disso, microporos de diâmetro inferior a 50 μm foram observados nas paredes dos macroporos, que será útil para a colonização fibrovascular e transporte de nutrientes. Um dos principais desafios no desenvolvimento de estruturas de sustentação para engenharia de tecido ósseo é o conflito de interesses entre a porosidade do

material e sua resistência mecânica. Uma microestrutura altamente microporosa é preferida em favor do crescimento e proliferação celular, mas conseguida à custa da diminuição da resistência mecânica. Embora não haja qualquer critério claramente definido de equilíbrio entre a porosidade e a resistência mecânica requerida para engenharia de tecido ósseo, é geralmente considerado que o material de sustentação deve ter uma resistência mecânica tão perto quanto possível da força de osso natural (BOHNER et al. 2004; WANG et al. 2007).

Em resumo, estes estudos indicam fortemente que a alta microporosidade das cerâmicas favorece a adsorção de proteínas e que a adsorção pode ser independente do tamanho de poro para os diâmetros de poro maior do que 20 nm (SAMAVEDI et al. 2013)

A elaboração de biomateriais nanocompósitos em uma matriz de hidroxiapatita é tendência no desenvolvimento de novos biomateriais nanoestruturados (BAŞAR et al. 2011; CAMARGO et al. 2012; CORRÊA, 2013; REGALIN, 2014; SOUZA, 2009), no entanto o comportamento dos compósitos hidroxiapatita (HA) e do fosfato tricálcico beta (TCP- β), e seus bifásicos, hidroxiapatita/fosfato tricálcico- β 80/20 (HA/TCP- β 80/20), hidroxiapatita/fosfato tricálcico- β 20/80 (HA/TCP- β 20/80), hidroxiapatita/fosfato tricálcico- β 70/30 (HA/TCP- β 70/30) e hidroxiapatita/fosfato tricálcico- β 30/70 (HA/TCP- β 30/70), na formação óssea ainda não é sabido.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Comparar o comportamento da neoformação óssea e osteointegração entre diferentes biocerâmicas de fosfatos de cálcio e avaliar o potencial de formação óssea da hidroxiapatita (HA), do fosfato tricálcico- β (TCP- β), e seus compósitos bifásicos em diferentes proporções: hidroxiapatita/fosfato tricálcico- β (HA/TCP- β 80/20), hidroxiapatita/fosfato tricálcico- β (HA/TCP- β 20/80), hidroxiapatita/fosfato tricálcico- β (HA/TCP- β 70/30) e hidroxiapatita/fosfato tricálcico- β (HA/TCP- β 30/70), com interesse de aplicações como substitutos ósseos, implantados em defeitos ósseos realizados experimentalmente em tíbias de ovelhas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se os biomateriais testados são biocompatíveis e apresentam capacidade de estimular a osteoindução, osteocondução e osteointegração, bem como, qual dos biomateriais

tem a capacidade de estimular a formação de tecido ósseo com maior rapidez e qualidade, avaliado através de estudo radiográfico, exame histológico e microscopia eletrônica de varredura em tíbias de ovinos aos 03, 06 e 12 meses após o período de implantação nos animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e de Bem-Estar Animal - CETEA da Universidade do Estado de Santa Catarina, com o protocolo número 1.70.12.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas vinte e quatro ovelhas mestiças Texel, híbridas, com peso médio de 30 kg (\pm 5 kg) e 12 meses de idade. Previamente à inclusão na pesquisa, todos os animais foram submetidos à avaliação clínica, radiográfica e laboratorial (hemograma, função renal [ureia e creatinina] e função hepática [aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, proteína sérica total, albumina, globulinas]), a fim de se excluírem indivíduos com afecções que pudessem comprometer a pesquisa. Os animais selecionados foram alocados em baias no setor de grandes animais do Hospital de Clínica Veterinária do CAV-UDESC para um período de adaptação de, no mínimo, 15 dias, recebendo medicação antiparasitária, alimentação à base de ração comercial para ovinos com 18% de proteína e silagem de milho, além de água *ad libitum*.

4.2 PREPARO PRÉ-OPERATÓRIO

Quinze dias anterior ao procedimento cirúrgico, foi realizada a tosquia dos animais e no dia anterior a cirurgia foi realizada a tricotomia completa dos membros pélvicos e subsequente higienização com água e iodopovidine degermante¹. Os animais foram mantidos em jejum sólido por 24 horas e hídrico de 8 horas, no período que antecedeu o procedimento cirúrgico.

Para a elaboração da anestesia os animais receberam medicação pré-anestésica à base de 0,3 mg/kg de morfina² pela via intramuscular e cinco minutos após, receberam 20 mcg/kg de detomidina³, pela via intravenosa. Passados 15 minutos, foram submetidos à cateterização da veia cefálica com cateter venoso periférico de calibre 18G para a indução anestésica com diazepam⁴ 0,5mg/kg e cetamina⁵ 5mg/kg pela via intravenosa. Após a indução, foi realizada intubação com sonda endotraqueal tipo Murphy, de tamanho apropriado ao diâmetro traqueal

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

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

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

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

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

do animal e a manutenção anestésica foi realizada com isofluorano⁶ diluído em oxigênio a 100%, a uma taxa de 50ml/kg/min, utilizando-se um sistema de reinalação parcial de gases. Foi realizada anestesia subaracnóide com a associação de 0,5mg/kg de levobupivacaína⁷ sem vasoconstritor e 1,25mg/kg de cetamina, completando-se para atingir um volume final de 1mL/7,5kg com solução fisiológica 0,9%. Após administração subaracnóide (no espaço lombo sacro L6-S1), o animal foi colocado em decúbito dorsal aguardando-se 30 minutos para o tempo de latência dos fármacos administrados. Nesse momento os membros foram preparados para a cirurgia, lavando-os com solução de iodopovidine degermante¹.

4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Trinta minutos antes do início da cirurgia foi administrado cefalotina sódica⁸ na dose de 30mg/kg como antibioticoterapia profilática. O procedimento cirúrgico foi realizado sempre pelo mesmo cirurgião e mesmo auxiliar. Com o animal em decúbito dorsal e o membro pélvico esquerdo preso à mesa cirúrgica, realizou-se antisepsia do membro pélvico direito em todas as suas faces, desde a região do tarso estendendo-se proximalmente até a região inguinal, empregando-se o esquema álcool-iodo-álcool. A extremidade distal do membro foi protegida por compressa estéril, enrolada e fixada ao membro por tiras de gaze. Os panos de campo foram posicionados de forma a expor a região da tíbia, desde a articulação fêmur-tíbio-patelar até a extremidade distal do membro. O mesmo procedimento foi realizado para acessar a tíbia do membro pélvico esquerdo.

O acesso à tíbia foi realizado conforme técnica descrita por Regalin et al (2014). Uma vez realizada a exposição tibial realizaram-se três orifícios de 06 milímetros de diâmetro cada na face medial da diáfise de cada uma delas (figura 1). Todos os orifícios foram realizados com uma trefina de 06 milímetros de diâmetro⁹, os quais foram preenchidos por biomateriais e o tratamento controle. O defeito preenchido com o fragmento ósseo estava localizado sempre na região proximal da diáfise tibial (Figura 1). Durante a realização dos defeitos, o local da perfuração, foi constantemente irrigado com solução salina estéril resfriada para auxiliar na prevenção de lesões térmicas.

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

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

⁸ Cefariston®, Ariston, São Paulo – SP – Brasil.

⁹ Neodent®, Curitiba – PR – Brasil.

Figura 1 - Acesso à tíbia direita de uma ovelha com orifícios a serem preenchidos com os respectivos biomateriais (setas pretas) e grupo controle (seta branca).

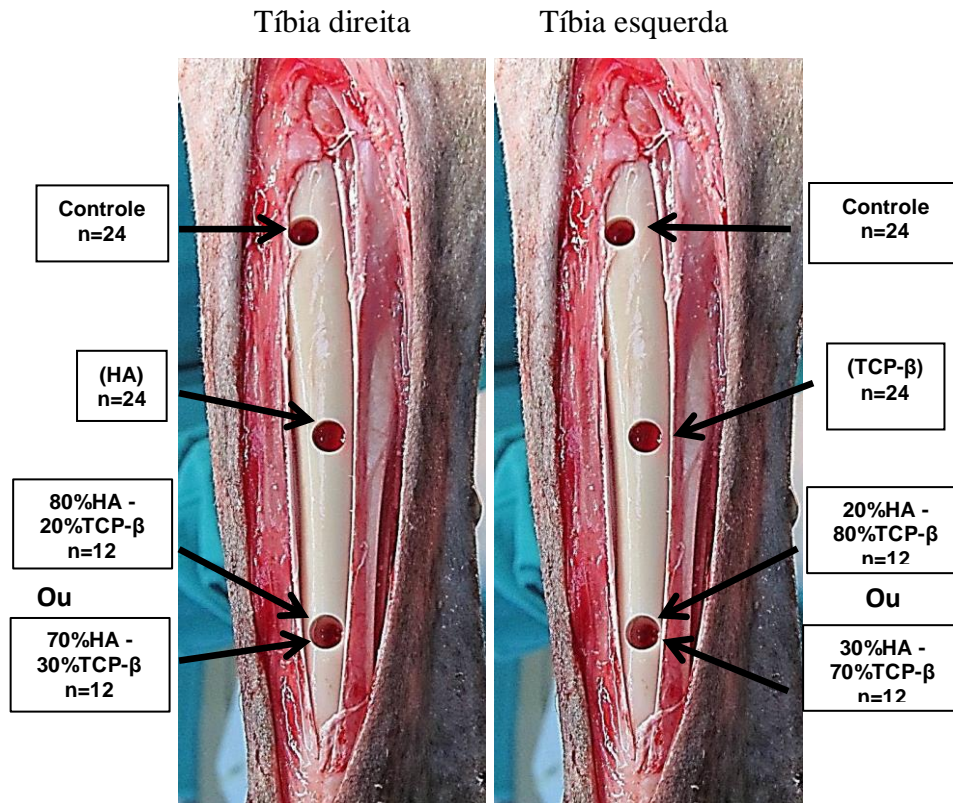


Fonte: produção do próprio autor.

Foram realizados três orifícios em cada tíbia, direita e esquerda, de cada um dos 24 animais, totalizando 144 orifícios, estes por sua vez tiveram o seus leitos preenchidos com seis diferentes tipos de biomateriais¹⁰: hidroxiapatita (HA) (n=24), tricálcio fosfato- β (TCP- β) (n=24), hidroxiapatita/tricálcio fosfato- β em diferentes proporções (HA/TCP- β 80/20) (n=12), (HA/TCP- β 20/80) (n=12), (HA/TCP- β 70/30) (n=12), (HA/TCP- β 30/70) (n=12) e grupo controle, que foram preenchidos pelos fragmentos ósseos removidos com trefina no momento da confecção do espaço a ser preenchido (n=48). Cada orifício foi previamente identificado para o material correspondente. (Figura 2).

¹⁰ Hidroxiapatita (HA), tricálcio fosfato- β (TCP- β), HA/TCP- β (80/20), HA/TCP- β (20/80), HA/TCP- β (70/30) e HA/TCP- β (30/70), produzidos pelo Departamento de Engenharia Mecânica do Centro de Ciências Tecnológicas da Universidade do Estado de Santa Catarina - Joinville.

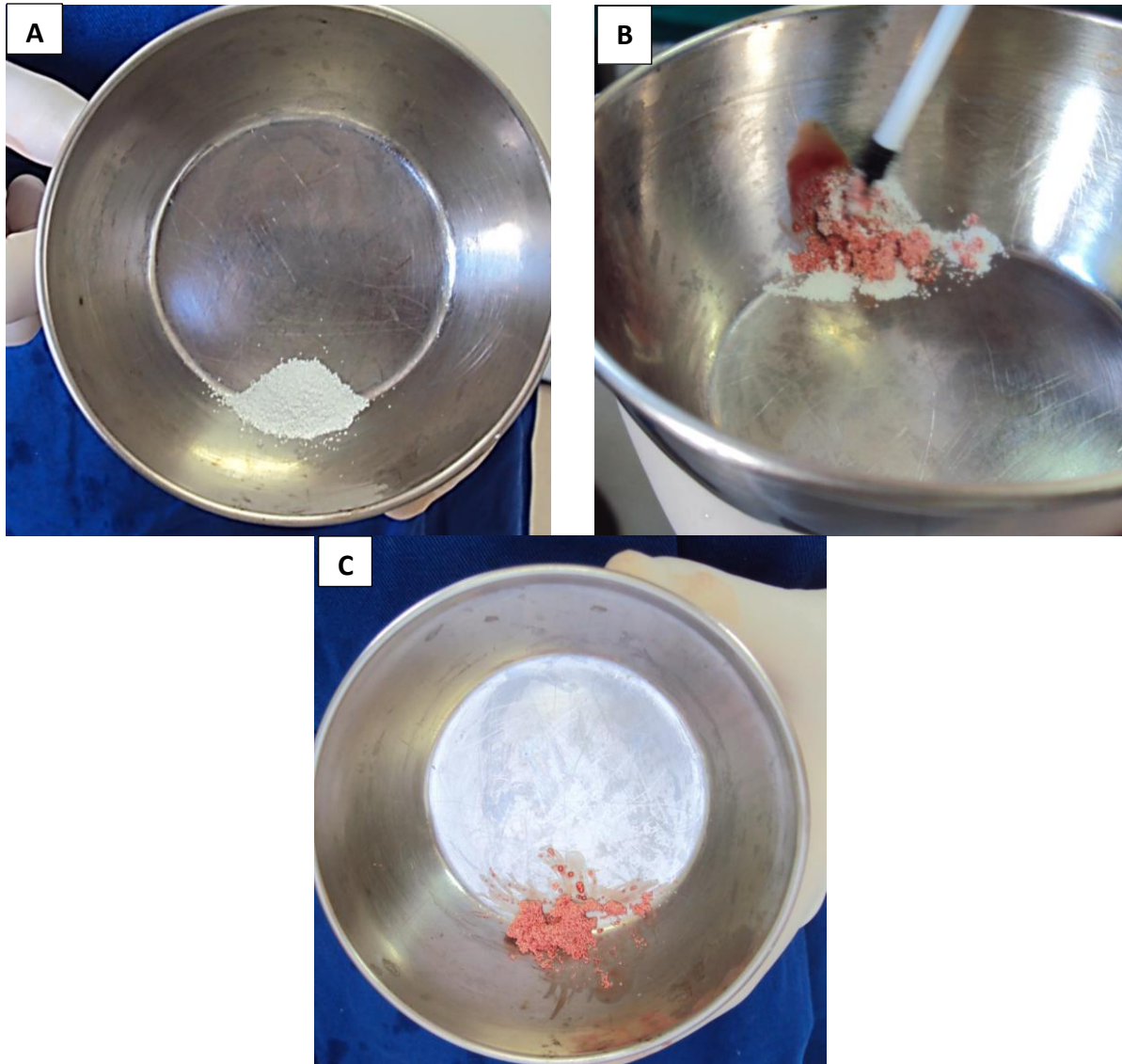
Figura 2 - Orifícios de 06 milímetros de diâmetro realizados nas tíbias direita e esquerda de ovelhas, para posterior preenchimento com seus respectivos biomateriais e o grupo controle, sendo “n” o número de orifícios preenchidos com cada tratamento, totalizando 144 orifícios.



Fonte: produção do próprio autor.

Para facilitar a colocação dos biomateriais em seus respectivos orifícios, eles foram depositados em uma cuba estéril e em seguida embebidos com sangue arterial proveniente do próprio animal. Durante o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos com acesso arterial para a coleta de sangue para exames de gasometria e por essa facilidade de obtenção o sangue arterial foi utilizado. Esta mistura deu origem a um material pastoso, que facilitou a colocação dentro dos orifícios, minimizando a perda de grânulos no momento do preenchimento dos orifícios, conforme técnica utilizada por Regalin et al. (2014) em seu estudo com orifícios em tíbias de ovelhas (Figura 03).

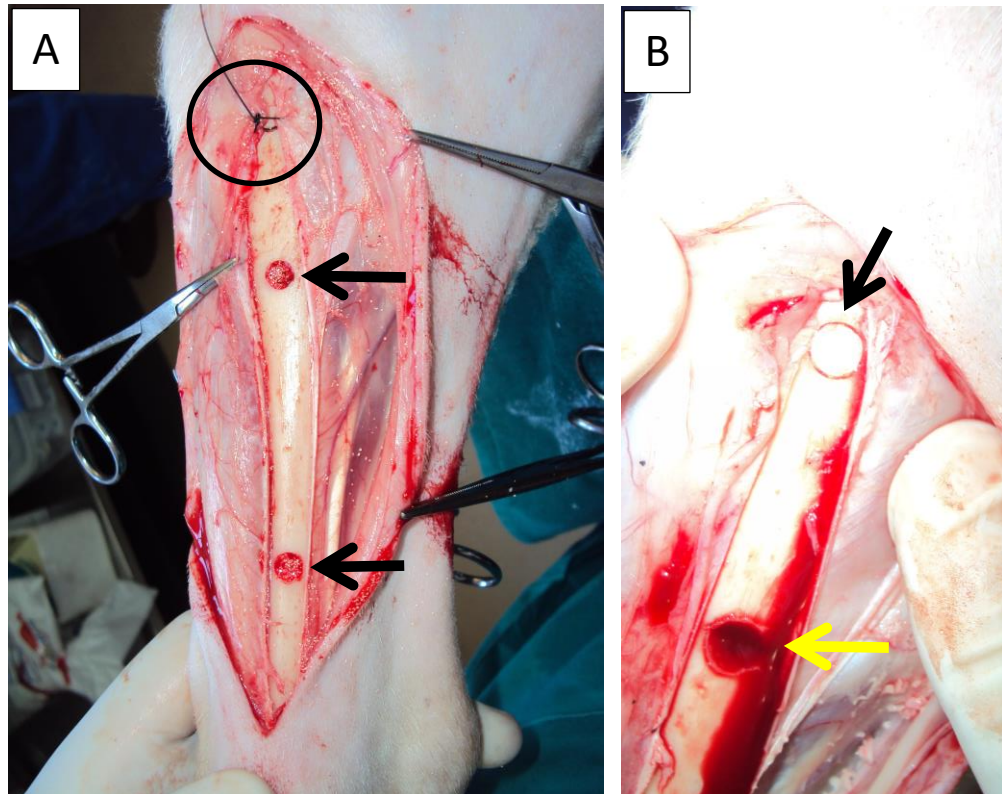
Figura 3 - Preparo dos biomateriais para posterior implantação no orifício correspondente. (A) Biomaterial granulado colocado em cuba estéril. (B) Colocação de algumas gotas de sangue do próprio animal para deixar os grânulos com consistência pastosa. (C) Mistura pronta para aplicação nos orifícios elaborados na tíbia.



Fonte: produção do próprio autor.

Finalizada a colocação dos biomateriais, bem como do fragmento ósseo (controle) (Figura 4), procedeu-se à sutura das camadas teciduais. A reaproximação dos planos anatômicos foi realizada mediante sutura do periósteo com fio de náilon nº 2-0 em padrão contínuo simples, seguido pela redução do tecido subcutâneo, também em padrão contínuo simples com o mesmo fio. Para a dermorrafia foi utilizado fio de náilon 2-0 e pontos isolados simples.

Figura 4 - (A) Acesso cirúrgico demonstrando os orifícios preenchidos com seus respectivos biomateriais (setas). Notar o início da sutura do periósteo (círculo) durante a síntese dos planos anatômicos. Abaixo deste ponto se encontra o autoenxerto (grupo controle). (B) Detalhe do autoenxerto após ter sido feita a osteotomia com trefina circular e reposicionado em seu leito (seta preta) e orifício a ser preenchido com biomaterial (seta amarela).



Fonte: produção do próprio autor.

4.4 PÓS-OPERATÓRIO

Ao término da cirurgia, os animais foram recuperados da anestesia geral e após a extubação, ainda levemente sedados, foram encaminhados ao setor de diagnóstico por imagem para obtenção das radiografias de controle do pós-operatório imediato. Em seguida, os membros operados foram imobilizados com bandagens de Robert-Jones modificada, mantendo-as durante 30 dias (Figura 5), a fim de minimizar os riscos de fraturas.

Figura 5 - Colocação de bandagens de Robert Jones modificada com calhas metálicas em ambos os membros pélvicos das ovelhas, após a realização das radiografias do pós-operatório imediato, com a finalidade de se prevenir fraturas espontâneas.



Fonte: produção do próprio autor.

Para o tratamento pós-operatório foi realizada analgesia com 5mg/kg de tramadol¹¹ por via subcutânea, a cada 8 horas, 25mg/kg de dipirona¹² por via subcutânea, a cada 8 horas, e 0,4mg/kg de meloxicam¹³ a cada 24 horas, durante três dias consecutivos.

4.5 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

Foram realizadas radiografias controle no período pré-operatório, imediatamente após o procedimento cirúrgico, e com 01, 03, 06 e 12 meses após a implantação dos biomateriais. As radiografias foram obtidas nas incidências ântero-posterior e médio-lateral.

Para estes exames, os animais foram mantidos em jejum sólido e hídrico por 12 horas, a fim de possibilitar o uso de protocolo sedativo, evitando o estresse dos animais e permitindo

¹¹ Tramadon®, Cristália, Itapira – SP – Brasil.

¹² Febrax®, Lema-injex biologic, Vespasiano – MG – Brasil.

¹³ Maxicam® 2%, Ouro Fino, Cravinhos – SP – Brasil.

correto posicionamento para a realização das radiografias. O protocolo utilizado foi 0,05 mg/kg de xilazina¹⁴, pela via intramuscular.

A interpretação das avaliações radiográficas foi verificada mediante avaliação de critérios e sempre realizada pelo mesmo avaliador. Para cada critério foi atribuído a escala 0 = Ausente, 1 = Parcial e 2 = Total, correspondente à proporção observada, conforme demonstrado no quadro 1 .

Quadro 1 - Escala de cicatrização óssea para avaliação radiográfica do grupo controle e biomateriais no pós-operatório imediato, 01, 03, 06 e 12 meses de pós-operatório

GRUPO CONTROLE		
Escala	Cicatrização	Critério
0	Ausente	Não apresenta osso formado na linha de osteotomia
1	Parcial	Fechamento parcial da linha de osteotomia
2	Total	Fechamento total da linha de osteotomia
GRUPO BIOMATERIAIS		
Escala	Cicatrização	Biomateriais
0	Ausente	Cortical sem preenchimento ósseo
1	Parcial	Cortical com preenchimento parcial
2	Total	Cortical com preenchimento total

Fonte: produção do próprio autor.

4.6 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

Os animais foram submetidos à eutanásia, conforme Resolução CFMV nº1000/2012, de 11 de maio de 2012, aos 03 (N=8), 06 (N=8) e 12(N=8) meses de pós-operatório, conforme os grupos a que pertenciam, para coleta de ambas às tíbias. As tíbias foram retiradas pela desarticulação fêmur-tíbio-patelar e tíbio-társica. A musculatura foi retirada e as porções proximal e distal das articulações serradas para possibilitar a melhor fixação do material.

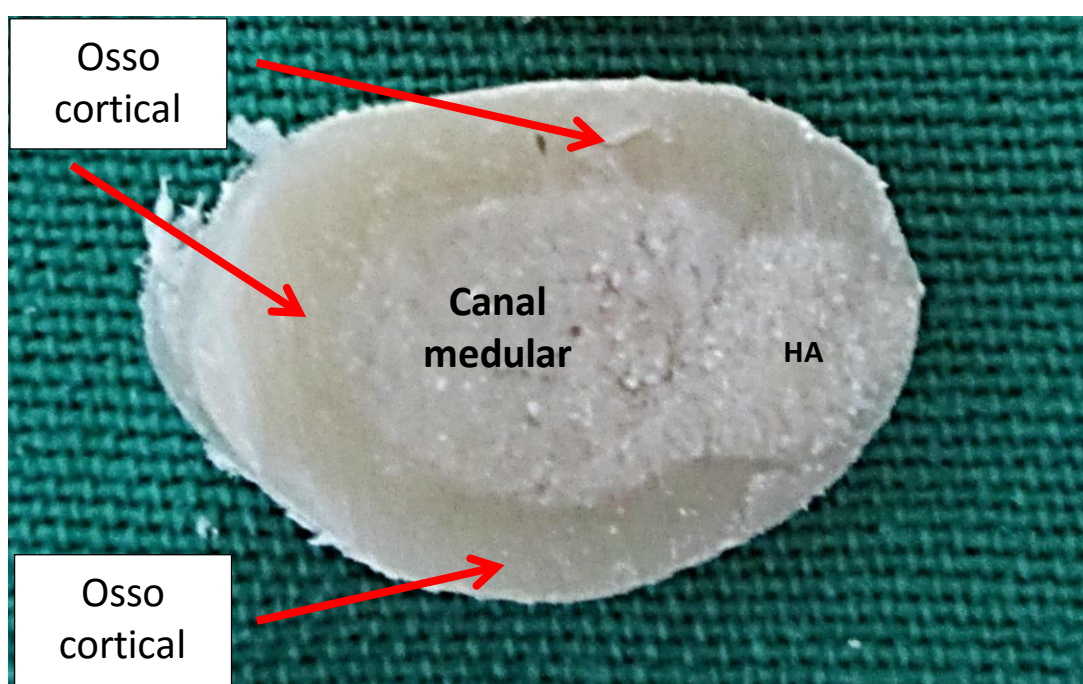
Os ossos coletados foram adequadamente identificados e acondicionados em frascos contendo formol 10%, pelo período de 30 dias. Após a fixação em formol os ossos foram divididos em três fragmentos, correspondentes a cada região implantada com o biomaterial e o autoenxerto (proximal, média e distal) perfazendo 144 amostras. Cada um dos três fragmentos obtidos foi, ainda, serrado ao meio, sendo que uma parte foi encaminhada à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a outra para análise histológica por microscopia óptica (Hematoxilina e eosina), totalizando 288 amostras.

¹⁴ Xilazin®, Syntec, Cotia – SP – Brasil.

4.6.1 Avaliação Histológica

Foram encaminhados fragmentos de tecido ósseo cortical, em frascos identificados com a numeração referente a cada defeito produzido, biomaterial implantado, número de identificação do animal e grupo ao qual pertencia, sendo identificado no fragmento os locais do osso cortical, interface e biomaterial (Figura 6).

Figura 6 - Fragmento ósseo coletado de tíbia de ovelha do grupo I (03 meses) com o biomaterial HA. Notar o biomaterial contrastando com o osso em região cortical e canal medular.



Fonte: produção do próprio autor.

Após descalcificação em ácido nítrico a 10% por três a quatro dias, as amostras foram processadas em histotécnico onde foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol para, em fim, serem incluídas em blocos de parafina. Posteriormente, as amostras foram seccionadas no micrótomo em cortes de 4-5 μ m de espessura. Finalmente, coradas pelo método de hematoxilina e eosina (H&E) como descrito por Prophet et al. (1992) e observados em microscopia óptica.

A interpretação das análises histológicas foi efetuada mediante seleção de critérios adaptados da pesquisa de Regalin, (2014) e sempre realizada pelo mesmo avaliador. Os critérios analisados foram: neoformação de tecido ósseo, deposição de fibras colágenas, preenchimento das lacunas osteocíticas, presença de osteoblastos, formação de tecido

mielóide e presença de infiltrado inflamatório, sendo, para cada critério, atribuído número de cruzes correspondente à proporção observada, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Critérios semi-quantitativos utilizados na avaliação histológica dos biomateriais HA e TCP- β e seus bifásicos HA/TCP- β 80/20, HA/TCP- β 20/80, HA/TCP- β 70/30 e HA/TCP- β 30/70. Foram classificados quanto: Biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), osso secundário (OS), presença de osteoclastos (PO), formação de tecido mielóide (FTM) e macrófagos (MA) utilizados para análise por microscopia óptica.

	BR	NTO	DFC	OP	OS	PO	FTM	MA
Ausente	0	0	0	0	0	0	0	0
Leve	+	+	+	+	+	+	+	+
Moderado	++	++	++	++	++	++	++	++
Acentuado	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Muito acentuado	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Fonte: modificado de Regalin (2014).

4.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os estudos de caracterização morfológica e microestrutural dos biomateriais granulados foram realizados antes da sua implantação (dados não informados neste estudo) e dos materiais recuperados dos fragmentos ósseos com 03, 06 e 12 meses de pós-operatório.

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

Para facilitar os trabalhos de caracterização através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram preparadas utilizando-se um “porta” amostra na forma de disco em liga de alumínio com superfície lisa, na qual uma fita de carbono dupla face foi fixada para a deposição do fragmento da amostra fraturada. Esta

amostra foi, então, alocada em metalizador¹⁵ e submetida ao processo de metalização por vaporização catódica, com deposição de filme de ouro sobre a superfície da amostra 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 filme de ouro na superfície das partículas da ordem de 30nm (SILVA, 2007).

Os estudos foram realizados com auxílio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), com o equipamento marca ZEISS¹⁶ modelo DSM 940A, por meio do método com elétrons secundários (SE) e retro-espelhados (BSE), com distância de trabalho entre 15 e 10 mm e tensão de aceleração dos elétrons de 20 kV.

A análise descritiva morfológica foi realizada pelo método visual da interface entre o material 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, sendo estas análises realizadas sempre pelo mesmo avaliador.

As análises das MEVs foram realizadas pelo Departamento de Engenharia Mecânica de Centro de Ciências Tecnológicas da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, na cidade de Joinville, sob a responsabilidade do Professor Dr. Nelson Heriberto de Almeida Camargo.

¹⁵ Bal-Tec® Sputter Coater SCD 050

¹⁶ Zeiss® DSM 940A

RESULTADOS

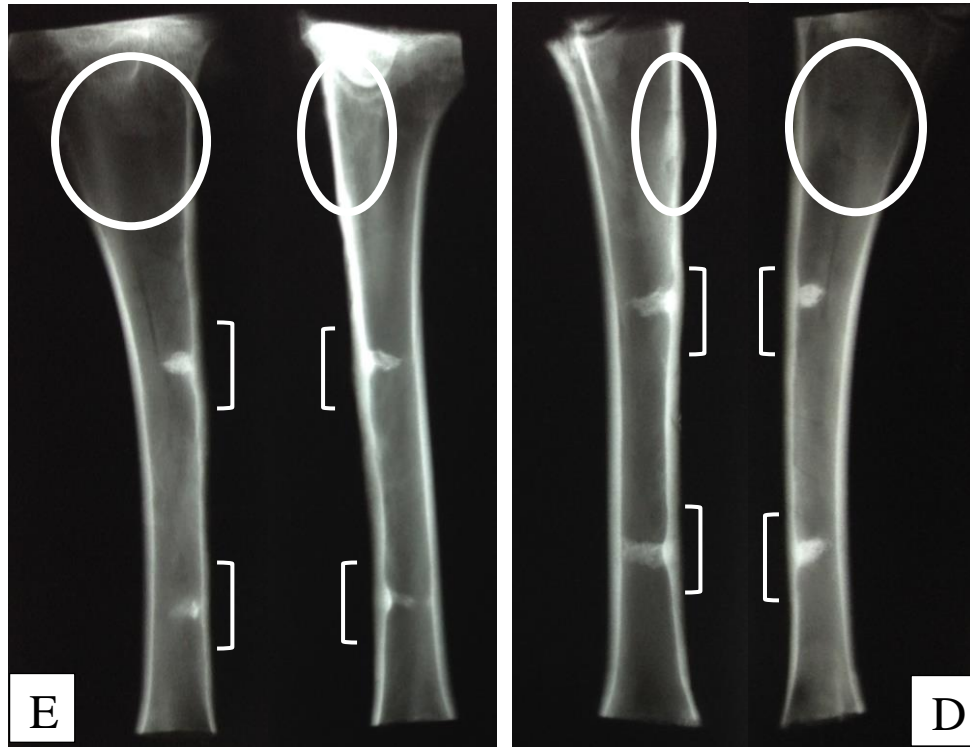
Todas as cirurgias foram realizadas sem complicações, as ovelhas se recuperaram bem e não apresentaram sinais de dor no pós-operatório. Demonstraram boa adaptação à imobilização com as calhas de Robert Jones modificada, sendo que a maioria delas ficou em estação nas primeiras 12 horas após a cirurgia.

Apenas um animal (o primeiro) apresentou dificuldade em ficar em estação. No exame clínico-neurológico apresentou incapacidade em se levantar, déficit neurológico proprioceptivo em ambos os membros pélvicos, mais acentuado em membro direito. Foi instituído o tratamento com dexametasona¹⁷ na dose de 0,1 mg/kg cada 24 horas, durante cinco dias, o animal apresentou melhora parcial, porém não conseguia levantar-se sem auxílio. Este animal foi eutanasiado aos 03 meses e as avaliações radiográficas, histológicas e microscopia eletrônica de varredura foram realizadas normalmente, sendo que não apresentou qualquer diferença quando comparada com os outros animais do mesmo grupo. Especula-se que o problema foi gerado em decorrência da punção subacnoidéa para a anestesia, a qual pode ter ocasionado à lesão. Os outros 23 animais permaneceram em boas condições clínicas não apresentando complicações como infecção, deiscência de sutura ou fraturas e foram eutanasiados de acordo com seus respectivos grupos.

Aos 03 meses foi possível visibilizar macroscopicamente os biomateriais em seus locais de implantação, devido ao contraste entre osso cortical normal e os biomateriais. No entanto, aos 06 e 12 meses não foi possível encontrar os locais de implantação devido à cicatrização da região e consequentemente a substituição do biomaterial por tecido ósseo novo. Nestes grupos foi necessário realizar radiografia das tíbias (Figura 7) para poder se identificar o local exato onde estavam os biomateriais e possibilitar a coleta das amostras para a MEV e a avaliação histológica.

¹⁷ Azium, Schering Plough, São Paulo – SP – Brasil.

Figura 7 - Radiografia de tíbias esquerda (E) e direita (D) colhidas de ovelha após 12 meses da implantação do biomaterial e os tecidos moles terem sido ressecados. Observar os biomateriais dentro do canal medular, as corticais ósseas (colchetes) onde foram realizados os orifícios encontram-se cicatrizadas, o que dificultou a identificação macroscópica do local exato de deposição dos biomateriais. Observar ainda que os grupos controles não são mais visibilizados (círculos).

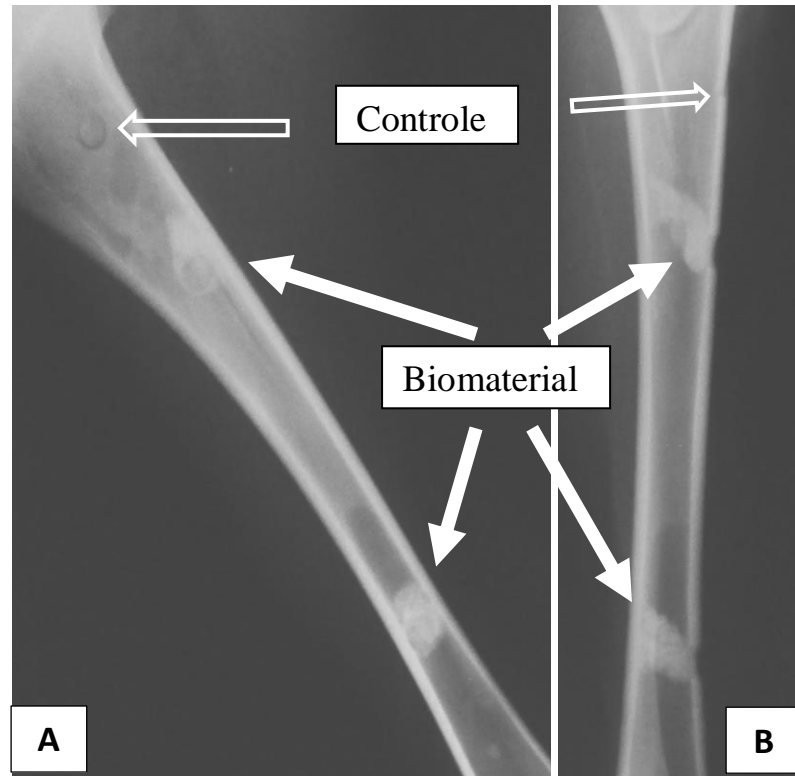


Fonte: produção do próprio autor.

5.1 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

O exame radiográfico do pós-operatório imediato de todos os animais apresentou-se conforme o planejado para o projeto, sendo todos os orifícios bem preenchidos com os biomateriais, bem como o controle alojado em seu local de retirada (Figura 8).

Figura 8 - Radiografia do pós-operatório imediato em incidências médio-lateral (A) e ântero-posterior (B), evidenciando o local das perfurações corticais com seus respectivos biomateriais (setas cheias) e o local do grupo controle (setas vazadas).



Fonte: produção do próprio autor.

Os exames radiográficos das tíbias em todos os tempos de avaliação pós-operatória revelaram não haver reação periosteal em qualquer uma delas (figura 9 e 10).

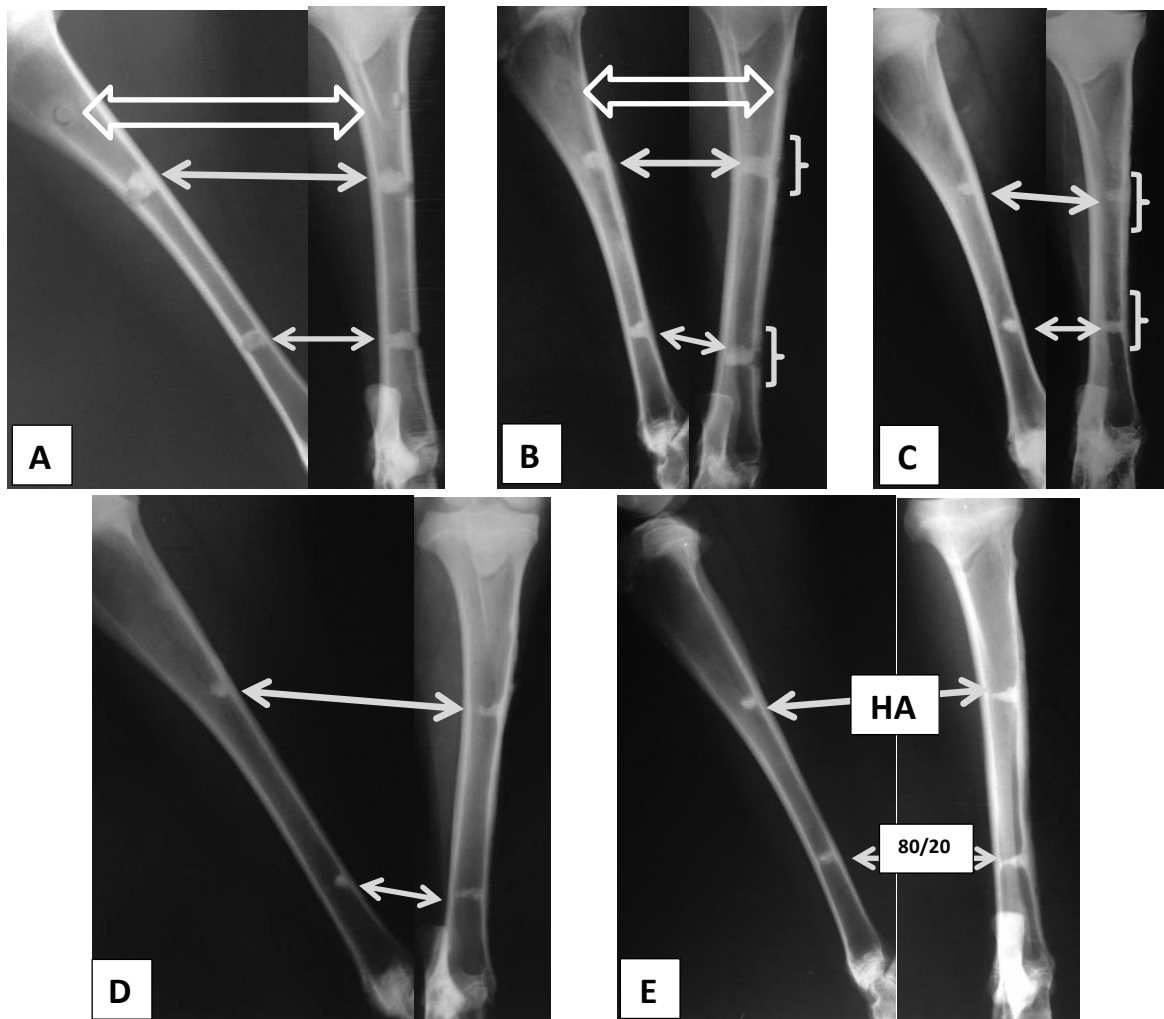
Nas radiografias realizadas no primeiro mês de pós-operatório os biomateriais não apresentaram diferença em relação àquelas realizada no pós-imediato. A cortical óssea no local da perfuração se apresentou parcialmente aberta, demonstrando cicatrização incompleta nesses 30 dias de pós-operatório. O controle também apresentou calcificação incompleta, sendo possível visibilizar parcialmente a linha de osteotomia (figura 9 A e 10 A).

Na avaliação radiográfica aos 03 meses de pós-operatório (PO), nos oito animais, a linha de osteotomia do grupo controle não foi mais visibilizada, o que caracteriza a cicatrização completa da mesma. As corticais ósseas no local da perfuração (para a colocação dos biomateriais) apresentaram-se totalmente fechadas, também evidenciando a cicatrização óssea deste local (Figuras 9 C e 10 C).

Ao analisarmos os biomateriais individualmente, observou-se que a HA não apresentou diferença no padrão da radiopacidade em todos os tempos avaliados, caracterizado

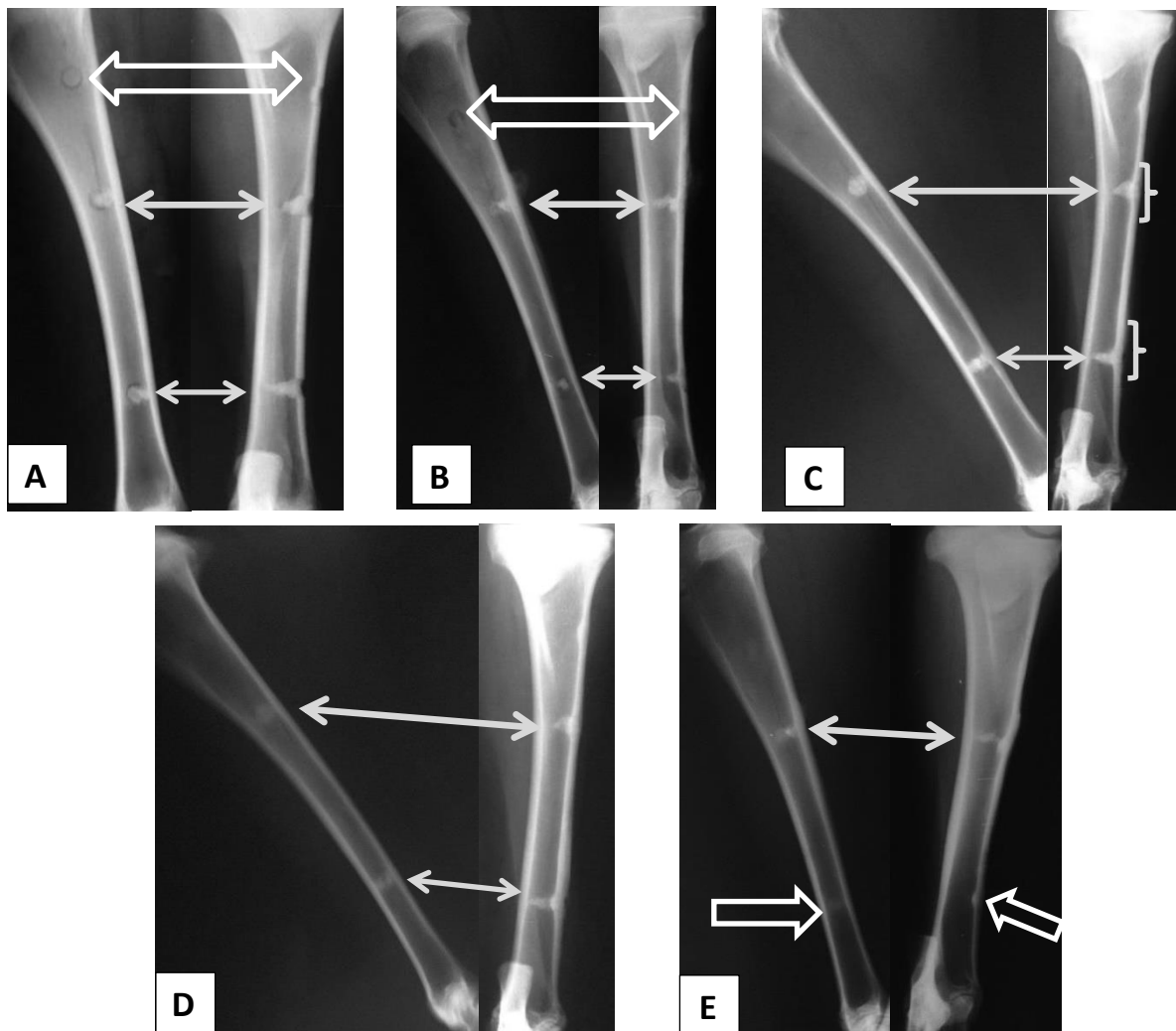
pela sua baixa solubilidade e consequente lenta absorção. Para o TCP- β ocorreu diminuição gradativa da radiopacidade dentro do canal medular.

Figura 9 - Radiografias do pós-operatório (PO) de membro direito de ovelhas, em incidências médio-lateral (esquerda) e ântero-posterior (direita), evidenciando os biomateriais em canal medular (proximal HA e distal 80/20). (A) pós-operatório imediato demonstrando o local da osteotomia e colocação dos biomateriais (setas brancas) e o controle (seta vazada). (B) Um mês de PO, notar biomateriais bem evidentes em canal medular (setas brancas) e grupo controle parcialmente visibilizado em projeção médio-lateral (seta vazada). (C) Três meses de PO, biomateriais facilmente visibilizados no canal medular (setas Brancas), porém a região cortical apresenta-se totalmente fechada (colchetes) e grupo controle não mais visibilizado. (D) Seis meses de PO, biomateriais ainda podem ser facilmente visibilizados em canal medular (setas). (E) 12 meses de PO, HA e o bifásico 80/20 apresentam a mesma radiopacidade entre eles (setas). Notar a ausência de reação periosteal em todos os momentos avaliados.



Fonte: produção do próprio autor.

Figura 10 - Radiografias do pós-operatório (PO) de membro esquerdo de ovelhas, em incidências médio-lateral (esquerda) e ântero-posterior (direita), evidenciando os biomateriais em canal medular (proximal TCP- β e distal 20/80). (A) pós-operatório imediato demonstrando o local da osteotomia e colocação dos biomateriais (setas cheias) e o controle (seta vazada). (B) Um mês de PO, notar biomateriais bem evidentes em canal medular (setas brancas) e grupo controle parcialmente visibilizado em projeção médio-lateral (seta vazada). (C) Três meses de PO, biomateriais facilmente visibilizados no canal medular (setas brancas), porém a região cortical apresenta-se totalmente fechada (colchetes) e grupo controle não mais visibilizado. (D) Seis meses de PO, biomateriais ainda podem ser facilmente visibilizados em canal medular (setas cheias). (E) 12 meses de PO, HA ainda pode ser visibilizado em canal medular (seta cheia), bifásico 20/80 quase totalmente absorvido (setas vazadas). Notar a ausência de reação periosteal em todos os momentos avaliados.

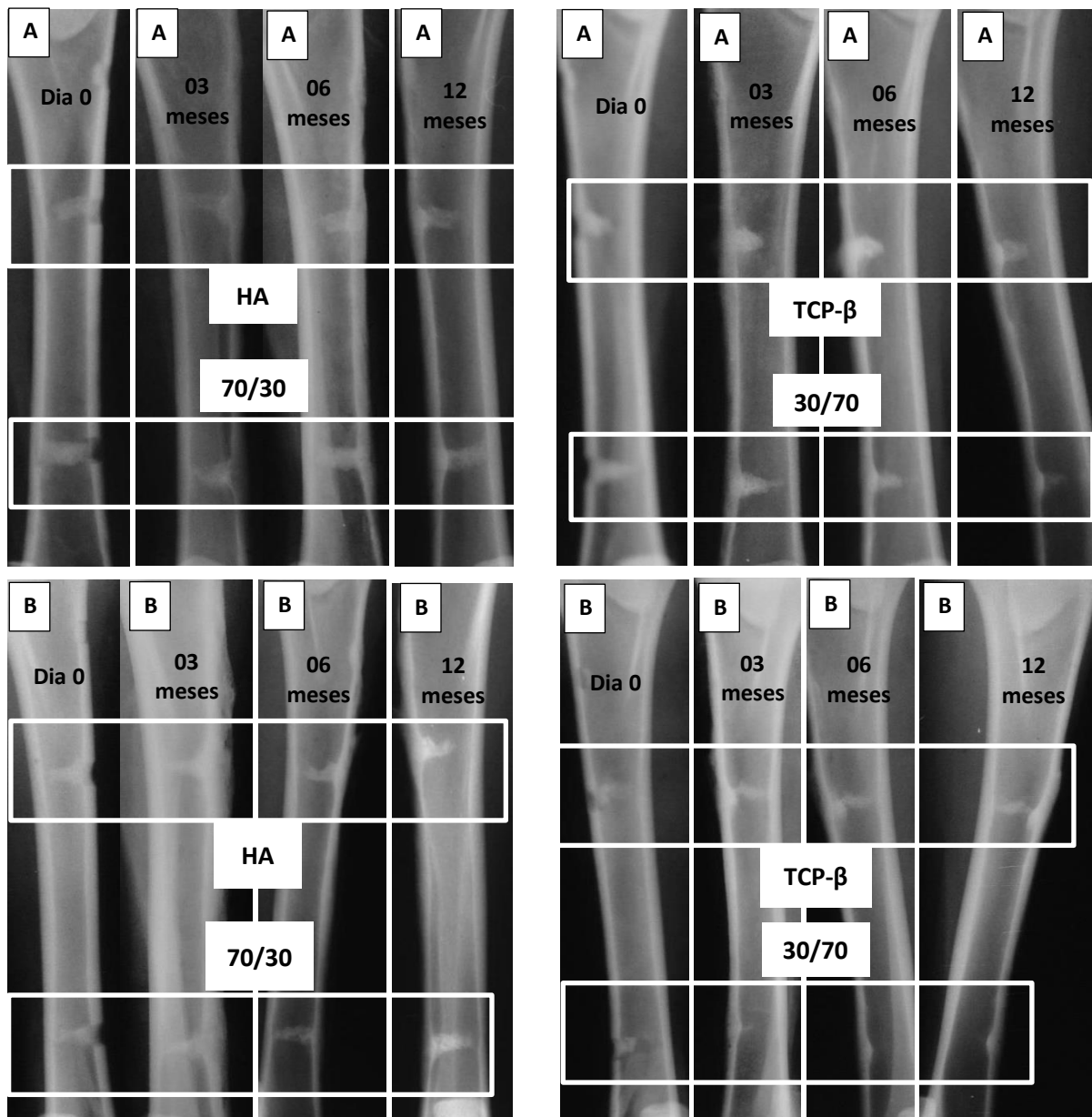


Fonte: produção do próprio autor.

A análise radiográfica dos bifásicos revelou que o HA/TCP- β 70/30 e HA/TCP- β 80/20 não apresentaram diferença em suas radiopacidades aos 03, 06 e 12 meses de avaliação. Os bifásicos HA/TCP- β 30/70 e HA/TCP- β 20/80 foram os que apresentaram diminuição

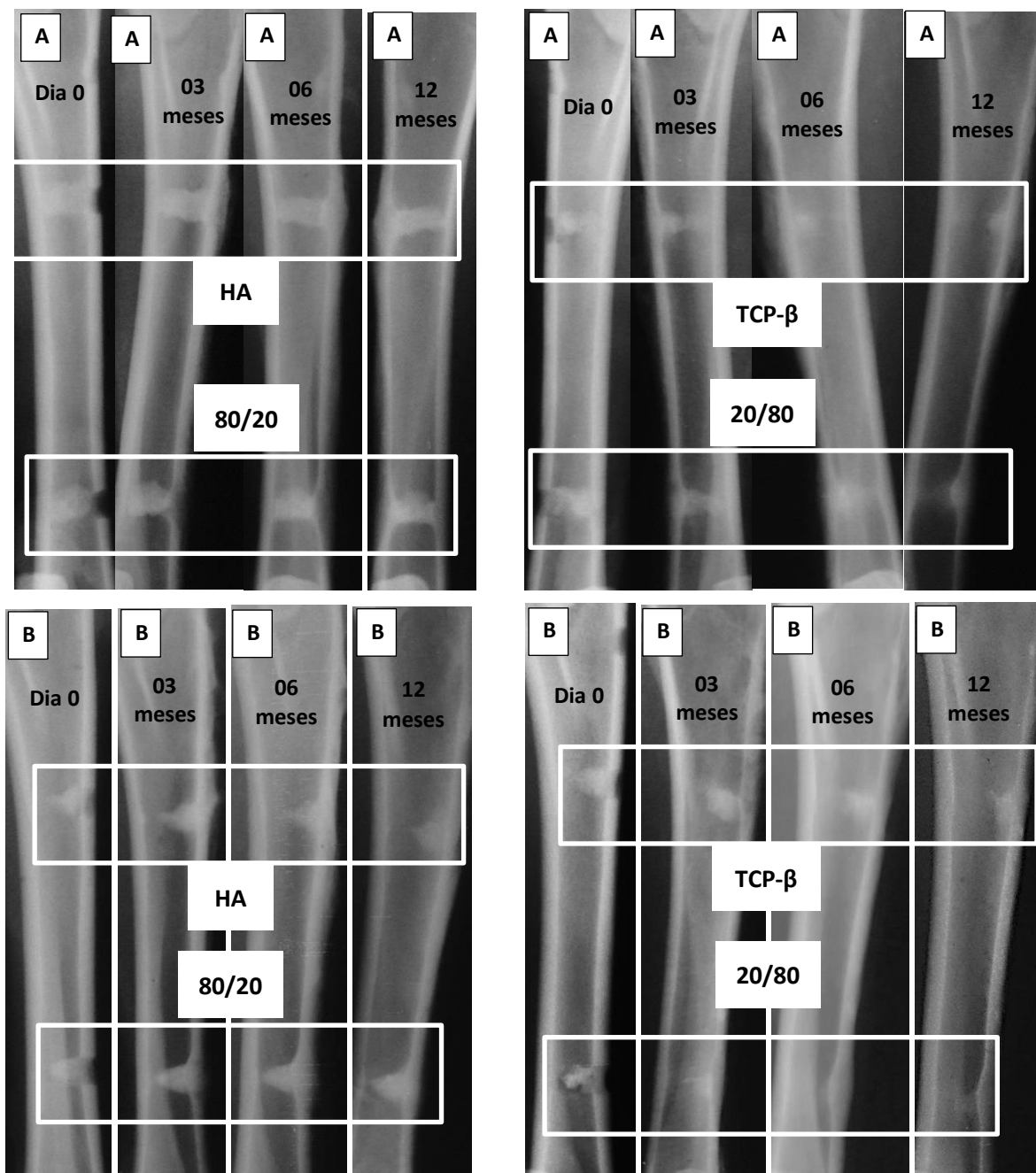
gradativa mais acentuada na radiopacidade nos tempos avaliados, sendo que na avaliação aos 12 meses tornaram-se quase que imperceptíveis nas radiografias (Figuras 11 e 12).

Figura 11 - Radiografias de 2 animais (A) e (B) em incidência ântero-posterior, nos períodos: dia 0, 03 meses, 06 meses e 12 meses, evidenciando os biomateriais HA, TCP- β , HA/TCP- β 70/30 e HA/TCP- β 30/70 no canal medular. Notar que o bifásico 30/70 foi que apresentou diminuição mais acentuada da radiopacidade dentro do canal medular quando comparado com os outros biomateriais. Em todas as radiografias da esquerda para a direita demonstram-se os tempos: pós-operatório imediato, 03, 06 e 12 meses de pós-operatório.



Fonte: produção do próprio autor.

Figura 12 - Radiografias de 2 animais (A) e (B) em incidência ântero-posterior, nos períodos: dia 0, 03 meses, 06 meses e 12 meses, evidenciando os biomateriais HA, TCP- β , HA/TCP- β 80/20 e HA/TCP- β 20/80 no canal medular. Notar que o bifásico 20/80 foi o que apresentou diminuição mais acentuada da radiopacidade dentro do canal medular quando comparado com os outros biomateriais. Em todas as radiografias da esquerda para a direita demonstram-se os tempos: pós-operatório imediato, 03, 06 e 12 meses de pós-operatório.



Fonte: produção do próprio autor.

Os quadros 2, 3 e 4 representam a avaliação radiográfica da cicatrização óssea nos tempos: pós-operatório imediato, 01, 03, 06 e 12 meses de pós-operatório, demonstrando que em todos os tempos manteve-se um padrão de cicatrização para os biomateriais avaliados.

Quadro 2 - Avaliação radiográfica aos 03 meses caracterizando a cicatrização óssea do controle e dos biomateriais nos tempos: pós-operatório imediato, 01 e 03 meses de pós-operatório, sendo 0 = cicatrização ausente, 1 = parcial e 2 = total.

Animal	Pós-imediato				01 mês				03 meses			
	D		E		D		E		D		E	
	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B
01	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2
02	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2
03	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2
04	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2
05	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2
06	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2
07	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2
08	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	1	2

D = Direito, E = Esquerdo, C = controle, B = Biomaterial.

Fonte: produção do próprio autor.

Quadro 3 - Avaliação radiográfica aos 06 meses caracterizando a cicatrização óssea do controle e dos biomateriais nos tempos: pós-operatório imediato, 01, 03 e 06 meses de pós-operatório, sendo 0 = cicatrização ausente, 1 = parcial e 2 = total.

Ovelha	Pós-imediato				01 mês				03 meses				06 meses			
	D		E		D		E		D		E		D		E	
	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B
01	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
02	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
03	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
04	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
05	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
06	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
07	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
08	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2

D = Direito, E = Esquerdo, C = controle, B = Biomaterial.

Fonte: produção do próprio autor.

Quadro 4 - Avaliação radiográfica aos 12 meses caracterizando a cicatrização óssea do controle e dos biomateriais nos tempos: pós-operatório imediato, 01, 03, 06 e 12 meses de pós-operatório, sendo 0 = cicatrização ausente, 1 = parcial e 2 = total.

Animal	Pós-imediato				01 mês				03 meses				06 meses				12 meses			
	D		E		D		E		D		E		D		E		D		E	
	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B
01	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
02	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
03	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
04	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
05	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
06	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
07	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
08	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

D = Direito, E = Esquerdo, C = controle, B = Biomaterial.

Fonte: produção do próprio autor.

5.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A formação ativa de osso foi indicada pela presença abundante de osteócitos e osteoblastos em todos os tempos avaliados. Foi constatada a presença de grande quantidade de osso maduro e imaturo, demonstrando a formação e a renovação do osso neoformado. A neoformação óssea foi observada iniciando próxima ao perióstio e nas margens dos orifícios em todos os biomateriais analisados. O osso neoformado apresentou-se compacto, porém em algumas regiões apresentou características trabeculares. Remodelação foi evidente com ósteons jovens, com largos canais vasculares embebidos em tecido ósseo. A porção da periferia do defeito estava constituída de osso neoformado com o mínimo de biomaterial remanescente nos três tempos avaliados.

Em todas as amostras histológicas analisadas foram encontradas células multinucleadas aderidas à superfície dos biomateriais granulados. Elas tinham o mesmo formato e tamanho de osteoclastos aderindo ao tecido ósseo. Sinais de reabsorção osteoclástica dos biomateriais foram evidentes, bem como lacunas de reabsorção na superfície dos biomateriais granulados.

Aos 03 meses, pode-se constatar que a quantidade de biomaterial remanescente foi maior para a HA, seguidos pelos bifásicos 70/30, 80/20, TCP- β , 30/70 e 20/80, respectivamente. Com relação à neoformação de tecido ósseo, ela foi considerada de forma moderada na região onde foi implantada a hidroxiapatita, o TCP- β , os compostos bifásicos 80/20, 70/30 e acentuado para os grupos 30/70 e 20/80. A presença de osteoclastos foi

considerada leve para todos os tratamentos com exceção do tratamento controle, que foi classificado como moderado. A formação de tecido mielóide se mostrou leve para os grupos HA, TCP- β , 80/20. Macrófagos estiveram presentes de forma leve em todos os grupos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados obtidos quanto ao biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), osso secundário (OS), presença de osteoclastos (PO), formação de tecido mielóide (FTM) e macrófagos (MA), dos biomateriais implantados e no grupo controle aos 03 meses, obtidos dos fragmentos ósseos de tíbias de ovinos.

	BR	NTO	DFC	OP	OS	PO	FTM	MA
HA	++++	+++	+	+	++	+	+	+
TCP- β	++	+++	+	++	++	++	+	+
HA/TCP- β 80/20	++	+++	+	++	+++	+	+	+
HA/TCP- β 20/80	+	++++	+	+	++	+	++	+
HA/TCP- β 70/30	+++	+++	+++	+	+	+	+	+
HA/TCP- β 30/70	++	++++	+	+	++	+	+	+
Controle	0	+++	+	+	+++	++	++	+

Fonte: produção próprio autor.

Aos seis meses os biomateriais remanescentes se apresentaram com quantidade acentuada para a HA, moderado para o TCP- β e os bifásicos 80/20 e 70/30 e leve para os bifásicos 20/80 e 30/70. Em relação à neoformação de tecido ósseo o bifásico 70/30 apresentou-se de forma moderada enquanto que os outros biomateriais apresentaram-se de forma acentuada. A deposição de fibras colágenas foi classificada como acentuada para o bifásico 70/30, leve para o bifásico 20/80, enquanto que para os outros biomateriais e o grupo controle classificou-se como moderado. Verificou-se quantidade maior de osso secundário em relação ao primário para o TCP- β e os bifásicos 80/20, 20/80 e 30/70, demonstrando que a organização óssea se apresenta bastante avançada. A presença de osteoclastos e a formação de tecido mielóide se apresentaram de forma leve a moderada para todos os biomateriais. Em relação aos macrófagos o bifásico 30/70 apresentou quantidade moderada enquanto os outros biomateriais apresentaram quantidade leve. O grupo controle apresentou neoformação de

tecido ósseo e osso secundário de forma acentuada, presença de osteoclastos e formação de tecido mielóide de forma moderada e deposição de fibras colágenas, osso primário e macrófagos de forma leve (tabela 3).

Tabela 3 - Resultados obtidos quanto ao biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), osso secundário (OS), presença de osteoclastos (PO), formação de tecido mielóide (FTM) e macrófagos (MA), dos biomateriais implantados e do grupo controle aos 06 meses, obtidos dos fragmentos ósseos de tíbias de ovinos.

	BR	NTO	DFC	OP	OS	PO	FTM	MA
HA	+++	+++	++	+	++	++	+	+
TCP- β	++	+++	++	+	+++	++	+	+
HA/TCP- β 80/20	++	+++	0	++	+++	++	++	+
HA/TCP- β 20/80	+	+++	+	+	++	+	+	+
HA/TCP- β 70/30	++	++	++	+	+	++	++	+
HA/TCP- β 30/70	+	+++	++	+	++	++	++	++
Controle	0	++++	++	0	+++	+	++	+

Fonte: produção próprio autor.

A avaliação aos 12 meses revelou que os biomateriais remanescentes não foram mais visibilizados na região cortical para o TCP- β e os bifásicos 30/70 e 20/80 e que os bifásicos 70/30 e 80/20 apresentaram quantidade moderada. A HA foi a que mais apresentou biomaterial remanescente sendo classificada como acentuada. A neoformação de tecido ósseo se mostrou de forma muito acentuada para o grupo controle e acentuada para os outros biomateriais avaliados. A deposição de fibras colágenas se apresentou de forma acentuada para o grupo controle, moderada para os bifásicos 70/30 e 30/70, de forma leve para o TCP- β e o bifásico 20/80 e ausente para o bifásico 80/20. A quantidade de osso secundário foi leve para o grupo controle, moderada para os bifásicos 70/30 e 30/70, e acentuada para os demais biomateriais. A quantidade de osso primário se manteve o mesmo (leve) para todos os materiais avaliados. A presença de osteoclastos foi classificada moderada para o TCP- β e o controle, enquanto que para os demais foi classificado como leve. A formação de tecido

mielóide ficou em leve para a HA, 30/70 e 70/30 e ausente para os demais. Macrófagos foram encontrados de forma leve apenas nos bifásicos 70/30 e 30/70.

Tabela 4 - Resultados obtidos quanto ao biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), osso secundário (OS), presença de osteoclastos (PO), formação de tecido mielóide (FTM) e macrófagos (MA), dos biomateriais implantados e o grupo controle aos 12 meses, obtidos dos fragmentos ósseos de tíbias de ovinos.

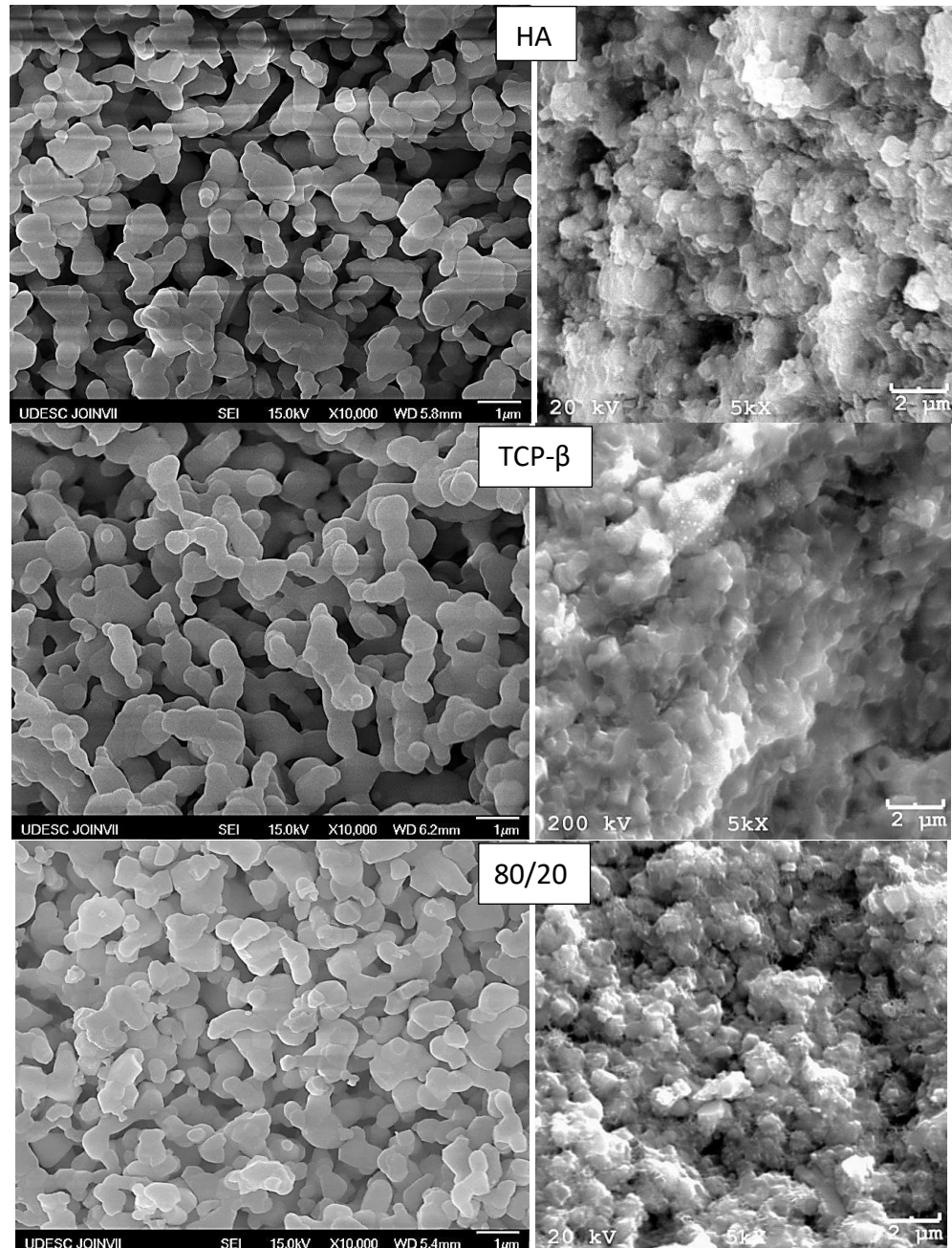
	BR	NTO	DFC	OP	OS	PO	FTM	MA
HÁ	+++	+++	+	+	+++	+	+	0
TCP- β	0	+++	+	+	+++	++	+	0
HA/TCP- β 80/20	++	+++	0	+	+++	+	0	0
HA/TCP- β 20/80	0	+++	+	+	+++	+	0	0
HA/TCP- β 70/30	++	+++	++	+	++	+	+	+
HA/TCP- β 30/70	0	+++	++	+	++	+	+	+
Controle	0	++++	+++	+	+	++	0	0

Fonte: produção próprio autor.

5.2.1 Avaliação dos Grânulos de Biomaterial Antes e Após a Implantação

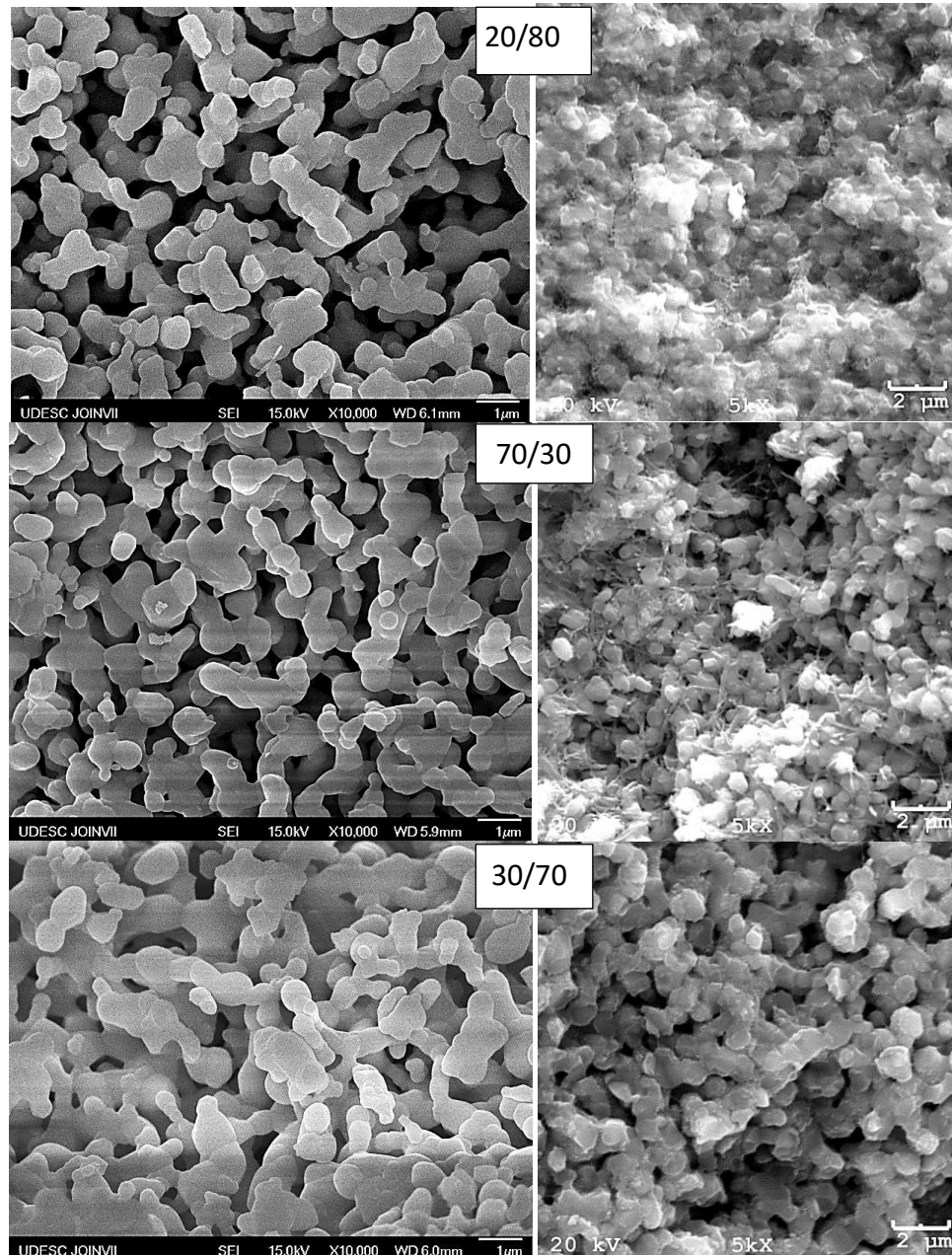
A avaliação dos biomateriais granulados antes (caracterização em laboratório) e após a implantação (03 meses) revelou que em todos eles foi possível observar alteração em suas morfologias, apresentando infiltrado celular, deposição de proteínas e biomineralização de suas superfícies, com o consequente preenchimento das microporosidades (Figura 13 e 14).

Figura 13 - Micrografias de MEV dos biomateriais HA, TCP- β e o bifásico 80/20, antes (esquerda) e após 03 meses da implantação (direita) em ovelhas. Notar que todas as amostras apresentam grande microporosidade antes da implantação nos animais e que elas são preenchidas por tecido ósseo neoformado.



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville.

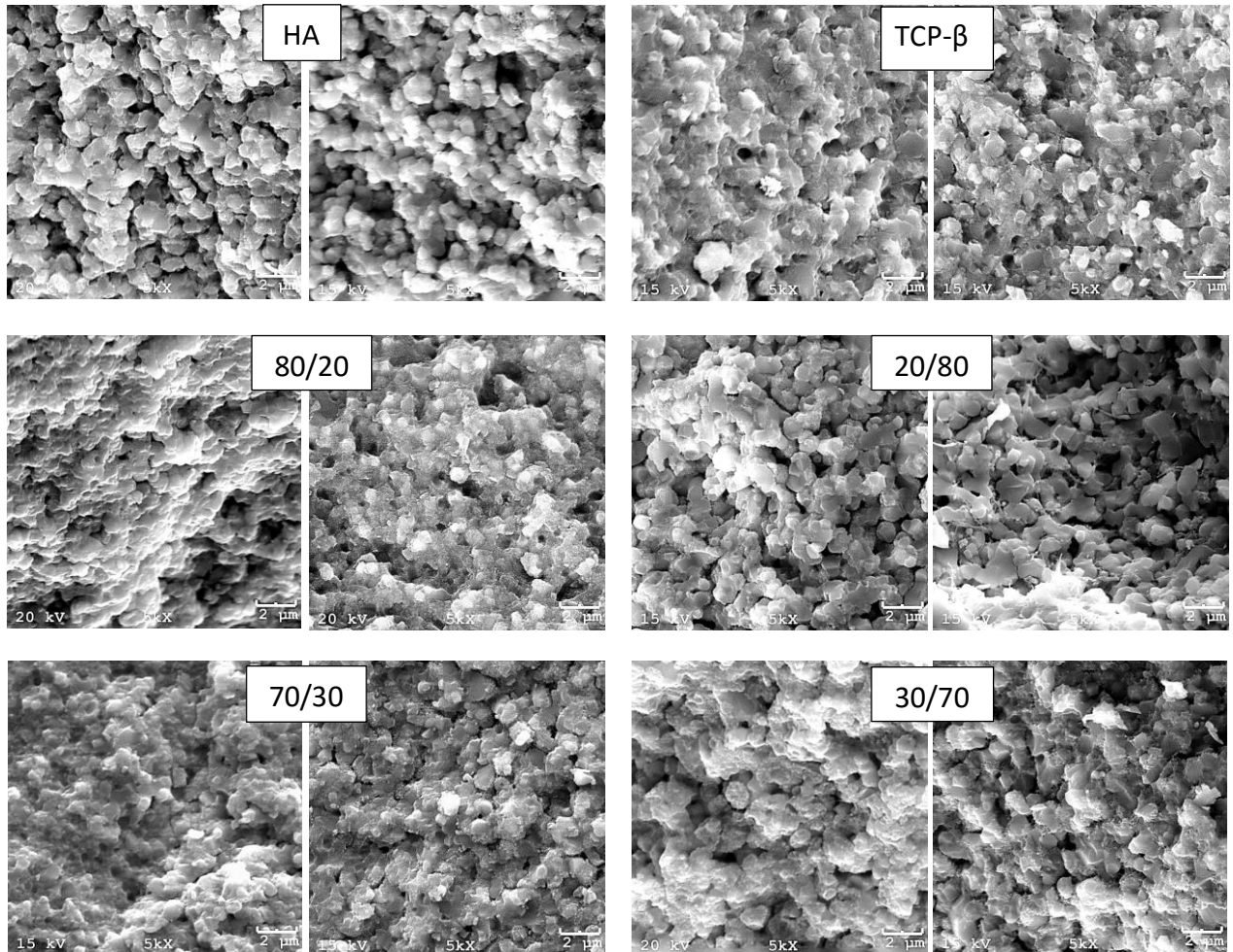
Figura 14 - Micrografias de MEV dos bifásicos 20/80, 70/30 e 30/70 antes (esquerda) e após 03 meses da implantação (direita) nas ovelhas. Notar que todas as amostras apresentam grande microporosidade antes da implantação nos animais e que elas são preenchidas por tecido ósseo neoformado.



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville.

Aos 06 e 12 meses o preenchimento dos microporos se deu da mesma forma que aos 03 meses (Figura 15).

Figura 15 - Fotomicrografias de MEVs demonstrando o preenchimento das microporosidades aos 06 meses (esquerda) e aos 12 meses (direita), para cada biomaterial, utilizados em ovelhas. Notar que existe muita semelhança no preenchimento das microporosidades para todos os biomateriais.



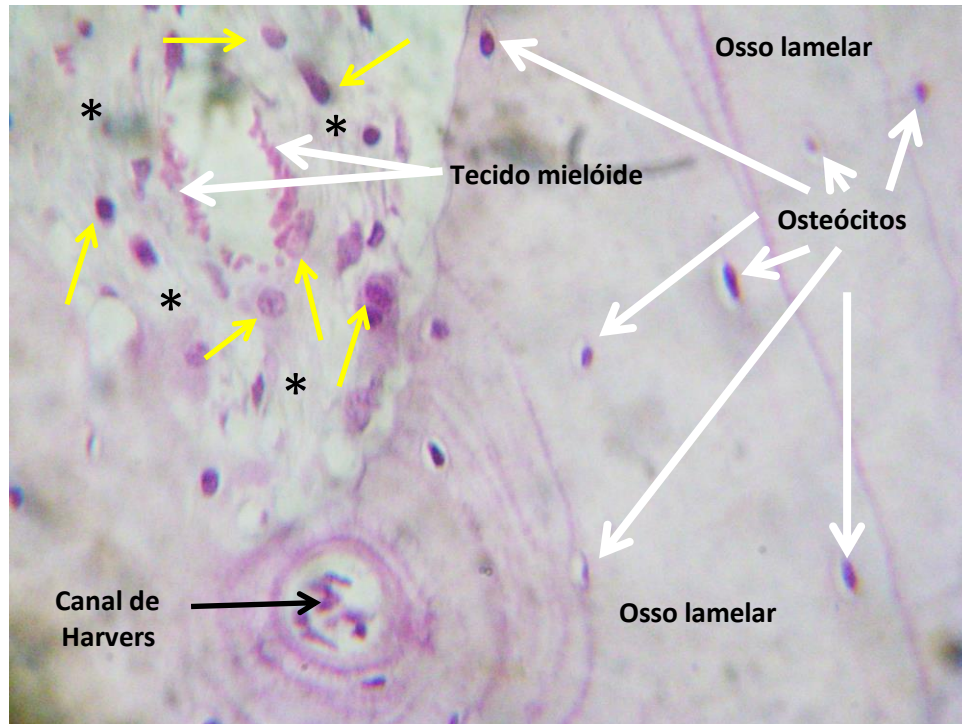
Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville.

5.2.2 Controle - Tratamento com Autoenxerto

5.2.2.1 Avaliação Histológica

Na avaliação do tratamento controle aos 03 meses pode se observar que não há reação inflamatória, existindo apenas a presença de macrófagos distribuídos pelo osso neoformado com presença de tecido mielóide. Observaram-se canais de Havers abertos com presença de osso lamelar ao seu redor, com osteócitos distribuídos no seu interior (Figura 16).

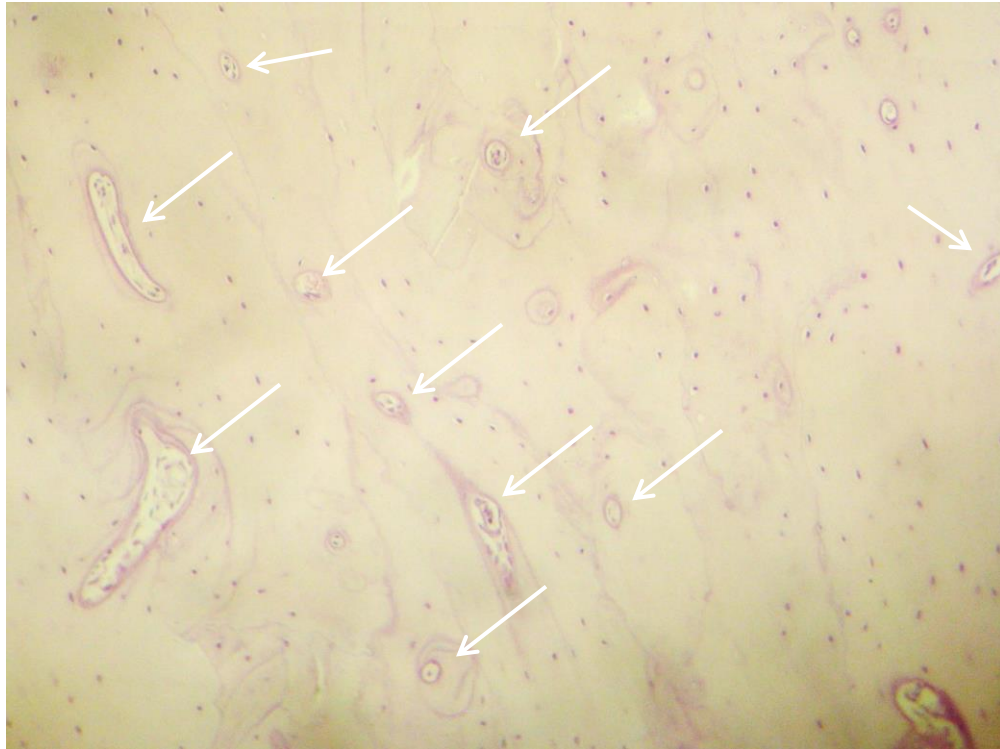
Figura 16 - Fotomicrografia de microscopia óptica de ovelha do tratamento controle aos 03 meses. Notar a presença de osso lamelar com osteócitos distribuídos em seu interior, canal de Havers, tecido mielóide e células de limpeza (setas amarelas) envoltas por pequena quantidade de tecido fibroso (*) (H&E. Objetiva 40x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

A avaliação do tratamento controle aos 06 meses revelou osso maduro transformando em sistemas osteonais com grande quantidade de osteócitos distribuídos no seu interior (Figura 17).

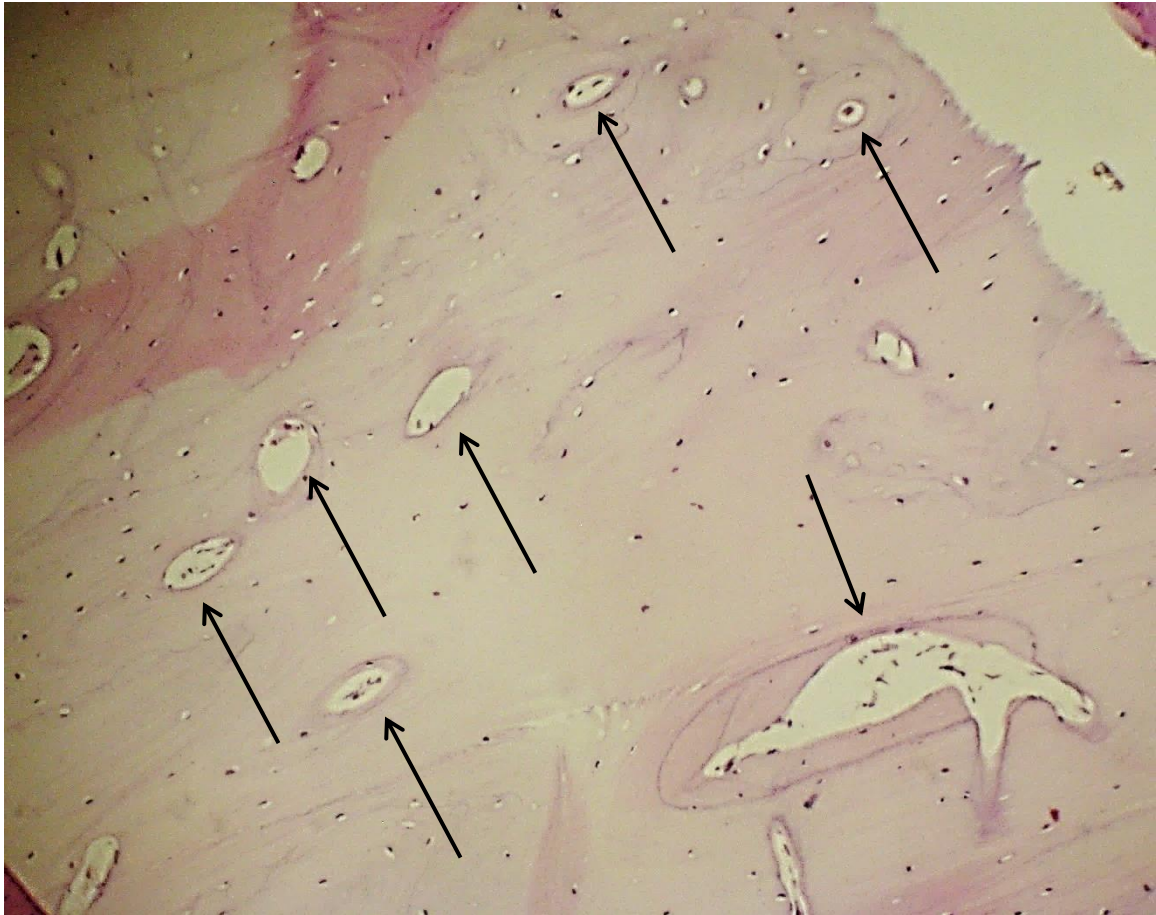
Figura 17 - Fotomicrografia de microscopia óptica de ovelha do tratamento controle aos 03 meses. Notar osso maduro com presença de osteócitos distribuídos em seu interior (pontos pretos) e sistemas osteonais (setas) (H&E. Objetiva 10x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

A avaliação do tratamento controle aos 12 meses caracterizou-se por apresentar osso totalmente compacto com sistemas osteonais entre perióstio e endóstio, alguns locais apresentam retenção de osso primário, observou-se túneis de formação e remodelação óssea (Figura 18).

Figura 18 - Fotomicrografia de microscopia óptica de ovelha do tratamento controle aos 12 meses. Notar osso lamelar compacto retenção de pequena quantidade de osso primário. Presença de tûneis de formação e remodelação óssea (sistemas osteonais - setas). (H&E. Objetiva 10x). Os osteócitos (pontos pretos) apresentam-se mais afastados uns dos outros o que caracteriza osso maduro.



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

5.2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

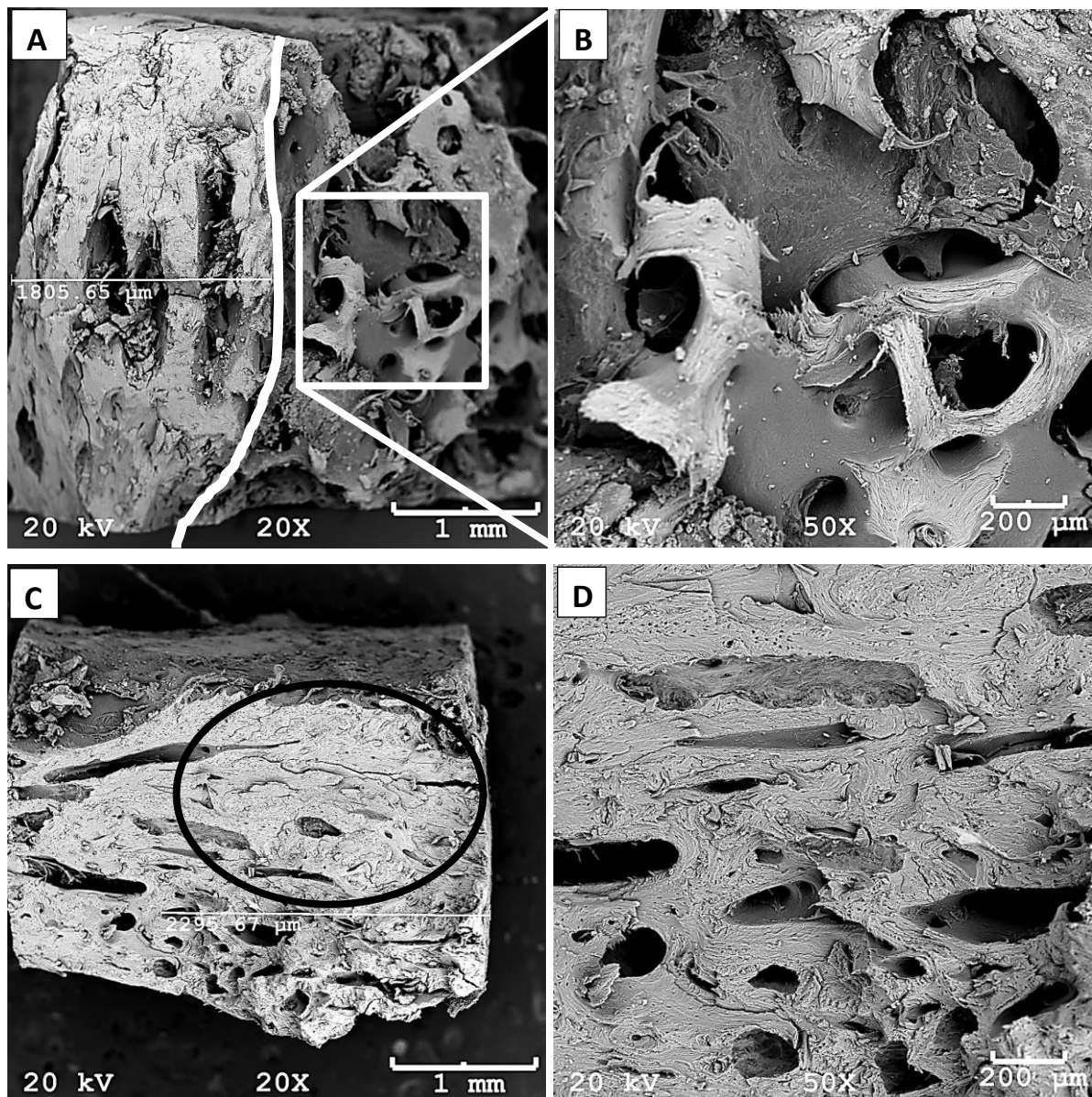
Os resultados da MEV do grupo controle serão apresentados somente aos 03 e 06 meses, pois ao final deste período de avaliação a cicatrização se mostrou completada, não sendo possível por esta técnica distinguir o osso neoformado do osso nativo, impossibilitando a avaliação aos 12 meses.

Como era de se esperar os orifícios que receberam o autoenxerto apresentaram rápida cicatrização e incorporação dele ao osso cortical adjacente, sendo difícil identificar a região de interface entre o fragmento transplantado e o osso remanescente, diferente do que aconteceu nos grupos onde foi utilizado o biomaterial, pois este foi facilmente visibilizado causando efeito de contraste com o osso neoformado.

A figura 19 (A) mostra a MEV do controle direito de uma ovelha aos 03 meses e pode se observar a extensão (1,8 mm) da região cortical que apresenta osso compacto com algumas áreas a serem preenchidas por tecido ósseo. A região mais próxima do canal medular (à direita da linha branca) apresenta osso em formação com grandes espaços a serem preenchidos. Na figura 19 (B) observa-se que o tecido ósseo não apresenta a estrutura lamelar organizada característica de osso jovem em formação.

Para o controle esquerdo o mesmo padrão de cicatrização foi encontrado, sendo que se observa osso compacto figura 19 C (círculo), característica de osso maduro. Nas porções mais próximas ao canal medular e mais próximas a região central do defeito, observa-se osso com grandes cavidades, demonstrando que essas áreas ainda não foram totalmente preenchidas por osso (figura 19 D).

Figura 19 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses do controle (autoenxerto) direito (A e B) e esquerdo (C e D). (A) À esquerda da linha branca observa-se osso compacto com algumas áreas a serem preenchidas por tecido ósseo. À direita da linha branca observa-se osso jovem em formação apresentando grandes espaços a serem preenchidos por osso novo. (B) Notar que as fibras ósseas apresentam estrutura não organizada característica de tecido ósseo jovem. (C) Grande área de osso cortical apresentando aspecto de osso denso (círculo). (D) Osso de região mais próxima da região central do orifício onde foi colocado o autoenxerto. Notar que esta área apresenta-se com grandes espaços a serem preenchidos durante a cicatrização óssea.

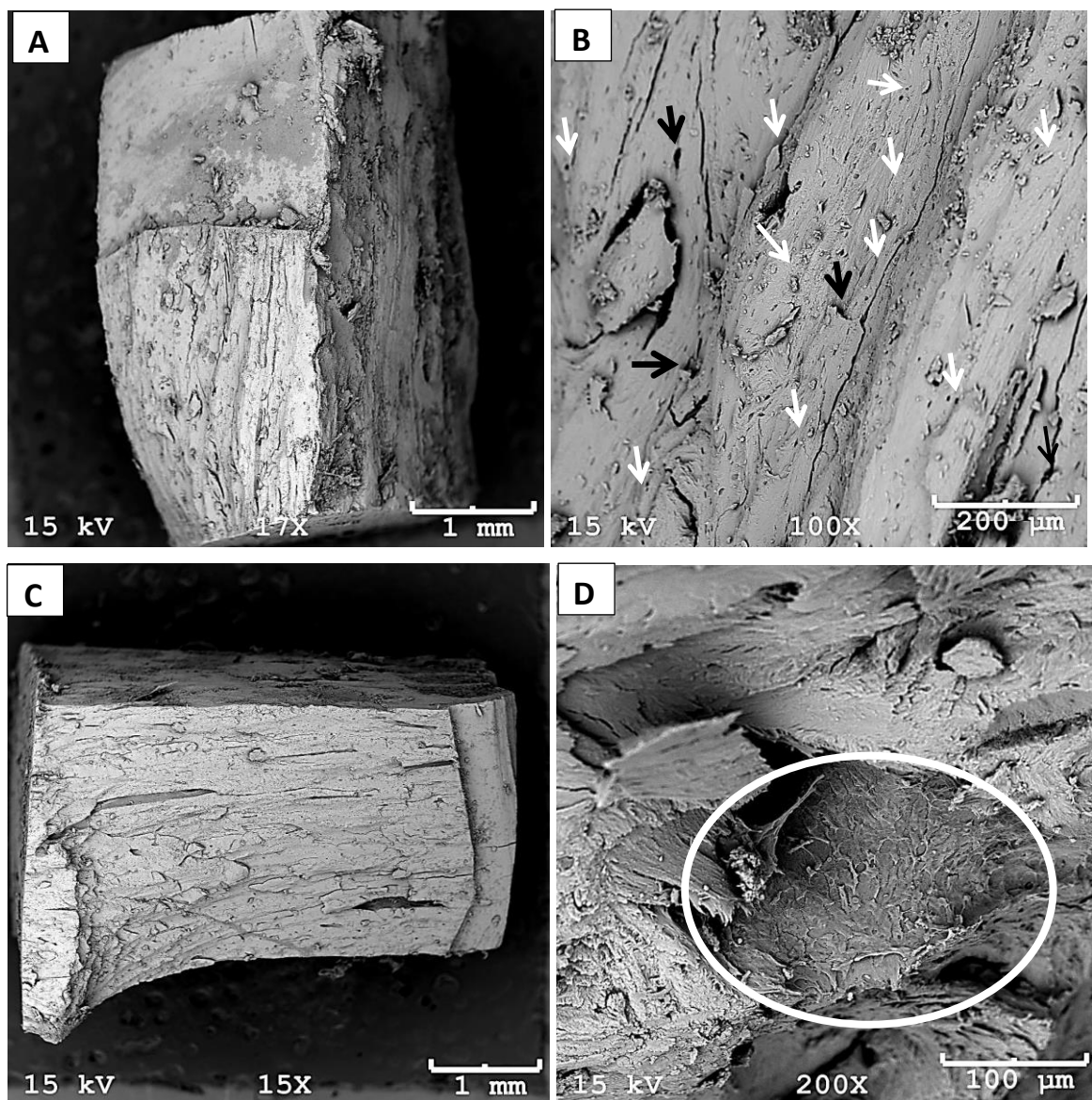


Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville.

Na avaliação das MEVs aos 06 meses pode-se observar que ocorreu cicatrização em toda a extensão do osso cortical. Foi possível verificar a presença de osso compacto com grande quantidade de osteócitos, vasos sanguíneos e osteoblastos presentes nas superfícies

ósseas. Como esse grupo do autoenxerto foi considerado como controle, tem-se como base de que estes resultados sejam considerados como os parâmetros para comparação com os resultados encontrados com os biomateriais (Figura 20).

Figura 20 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 06 meses do controle (autoenxerto) direito (A e B) e esquerdo (C e D). Imagens das regiões corticais do autoenxerto direito (A) e esquerdo (C) demonstrando a completa cicatrização de ambas com estrutura óssea compacta e homogênea em toda a sua extensão. (B) Imagem ilustrando a ótima qualidade do osso. Notar a grande quantidade de osteócitos (setas brancas) e alguns vasos sanguíneos (setas pretas) distribuídos por toda a superfície óssea. (D) Imagem demonstrando grande quantidade de osteoblastos sobre a superfície óssea (círculo).



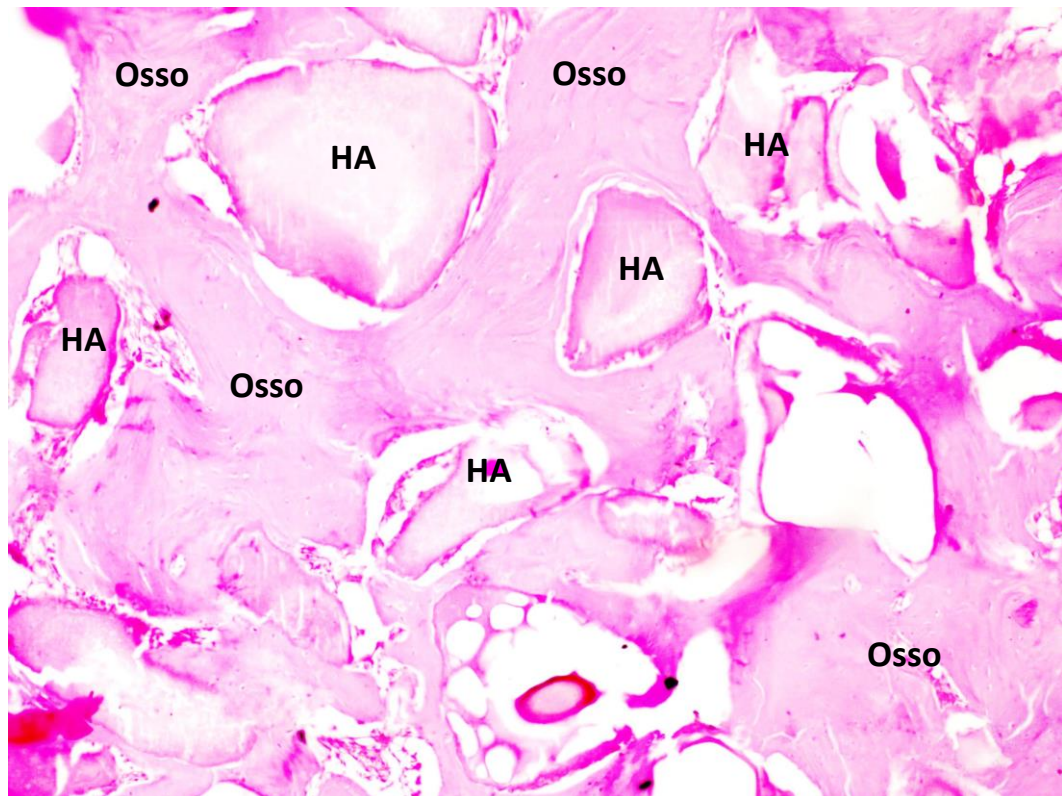
Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville.

5.2.3 Hidroxiapatita (HA)

5.2.3.1 Avaliação Histológica

Na avaliação histológica do tratamento HA aos 03 meses pode se observar formação de tecido ósseo envolvendo o biomaterial remanescente em região cortical (Figura 21). Presença de pequena quantidade de macrófagos, de tecido fibroso e de células inflamatórias em região do osso cortical neoformado.

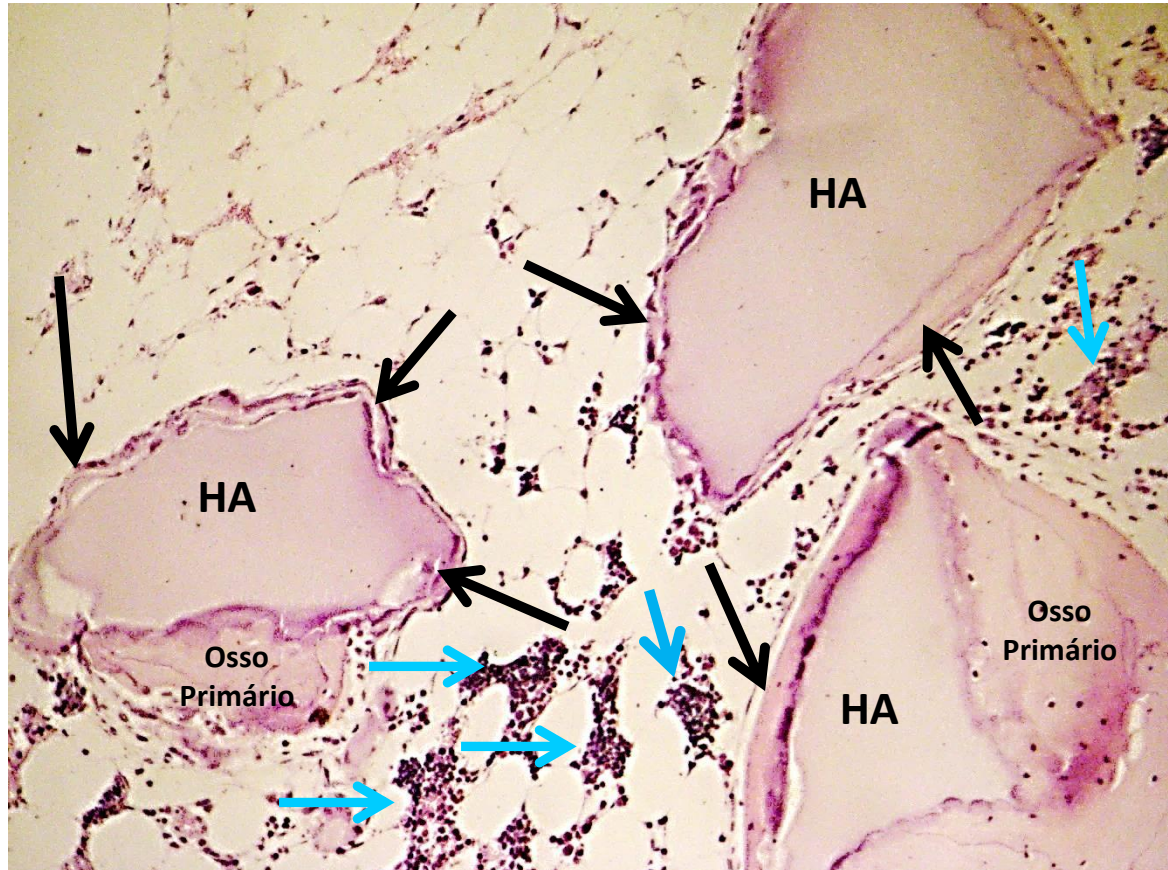
Figura 21 - Fotomicrografia de microscopia óptica de ovelha do tratamento HA aos 03 meses. Notar a formação óssea entre o os grânulos de HA (H&E objetiva 10x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

Para a HA aos 06 meses foi observado a formação de uma película óssea em torno dos biomateriais (figura 22), como se o biomaterial estivessem sendo encapsulados. Além disso, esses biomateriais não apresentaram atividade celular em sua volta sugerindo que eles realmente permaneçam no organismo sem serem absorvidos ou tenham a sua absorção de forma muito mais lenta do que os outros biomateriais.

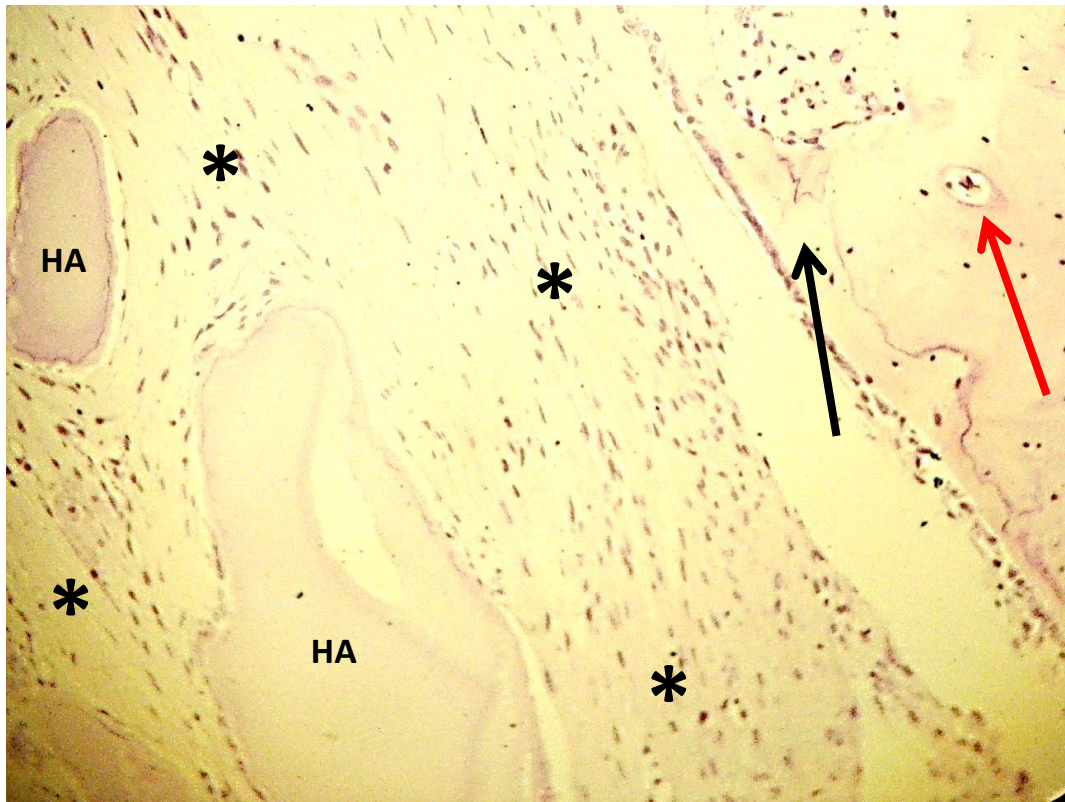
Figura 22 - Fotomicrografia da HA aos 06 meses demonstrando o biomaterial foi totalmente envolvido por osso neoformado, fazendo com ele se apresente de forma a estar sendo encapsulado (setas pretas). Presença de pequena quantidade de tecido mielóide (setas azuis) (H&E. Objetiva 10x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

Ainda na avaliação da HA aos 06 meses foi observado grande quantidade de biomaterial circundado por osso neoformado, onde há o predomínio de osso lamelar e fibrose moderada junto ao periósteo, sendo possível encontrar biomaterial abaixo do periósteo e em osso cortical compacto. Foram encontradas pequena quantidade de macrófagos distribuídos de forma aleatória. A deposição óssea sobre os biomateriais não foi precedida pela absorção deles pelos osteoclastos, ou seja, o osso está sendo formado sobre os grânulos, sem antes terem sido absorvidos pelos osteoclastos (Figura 23).

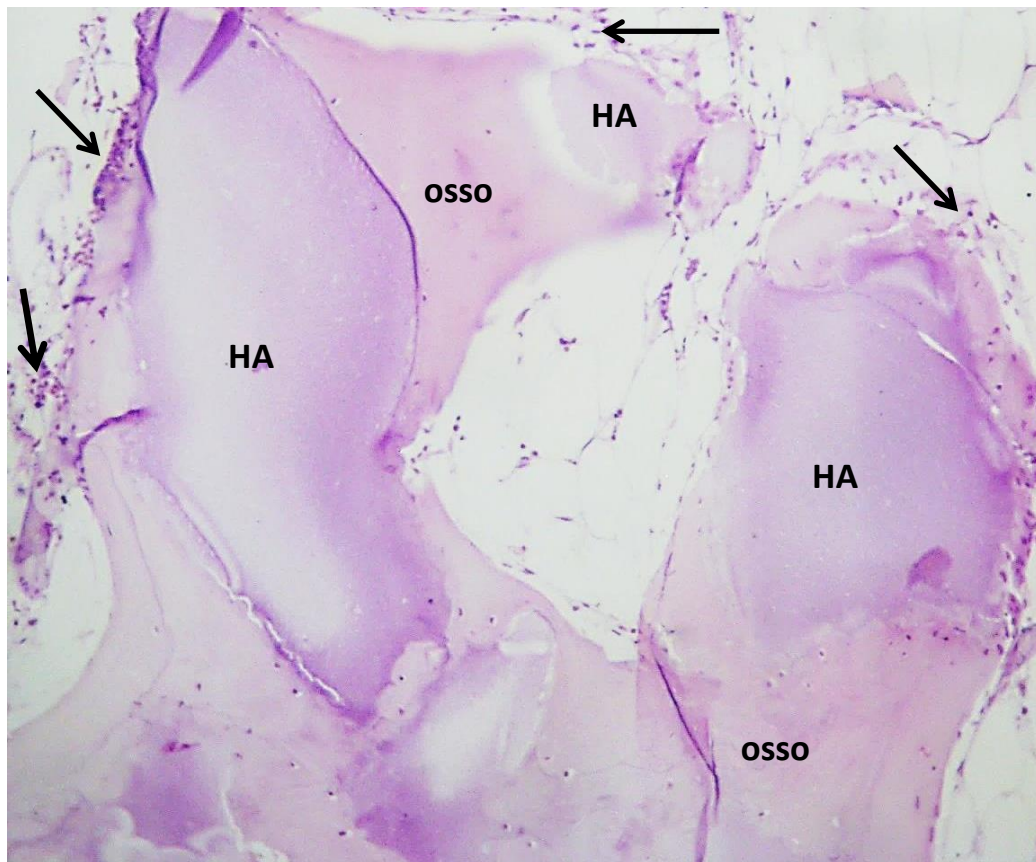
Figura 23 - Fotomicrografia da HA aos 06 meses. Notar neoformação de osso com sistema osteonal (seta vermelha) junto ao periósteo (seta preta) e presença de cristais de hidroxiapatita circundado por tecido fibroso (*) (H&E, Objetiva 10x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

Na avaliação da HA aos 12 meses foi observado pouca atividade celular, com a presença de macrófagos e também leve quantidade de tecido fibroso. A maior parte dos biomateriais de HA apresenta-se com formação óssea ao seu redor sem haver indícios de eles estarem sendo absorvidos, ou seja, o osso está sendo formado e depositado em cima do biomaterial e o mesmo ficando isolado dentro do osso formado (Figura 24).

Figura 24 - Fotomicrografia da HA aos 12 meses. Notar neoformação de osso lamelar sobre cristais de hidroxiapatita sem apresentar sinais de absorção previa. Pequena quantidade de macrófagos (setas) (H&E. Objetiva 10X).

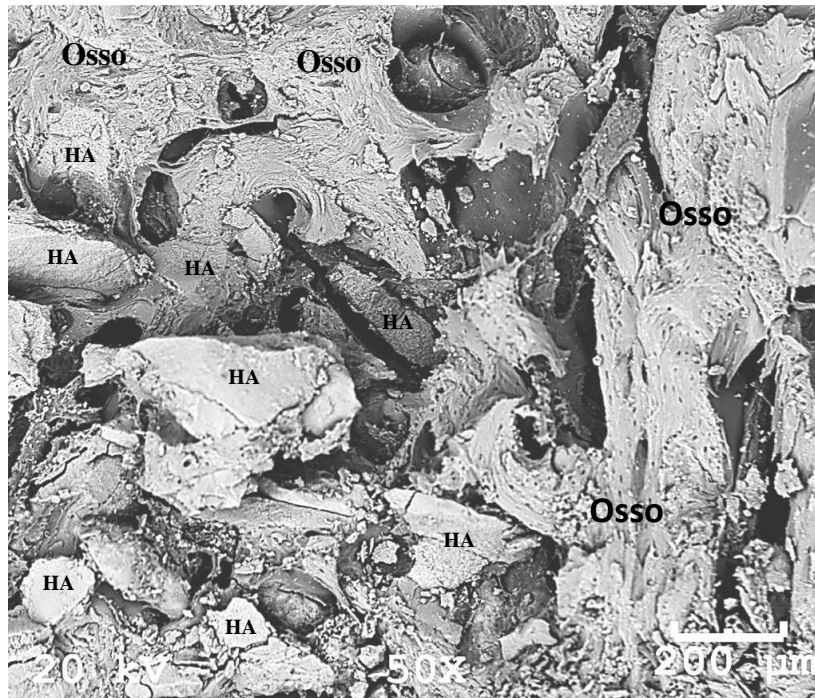


Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

5.2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A avaliação das MEVs da HA aos 03 meses, demonstrou neoformação de tecido ósseo caracterizado por osso denso, com grande quantidade de osteócitos e que a HA remanescente apresentou-se completa envolvida pelo osso neoformado (Figura 25).

Figura 25 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o biomaterial HA. Notar o biomaterial neoformado osteointegrado pelo osso novo. A maior parte do biomaterial já foi absorvido e substituído por osso neoformado.

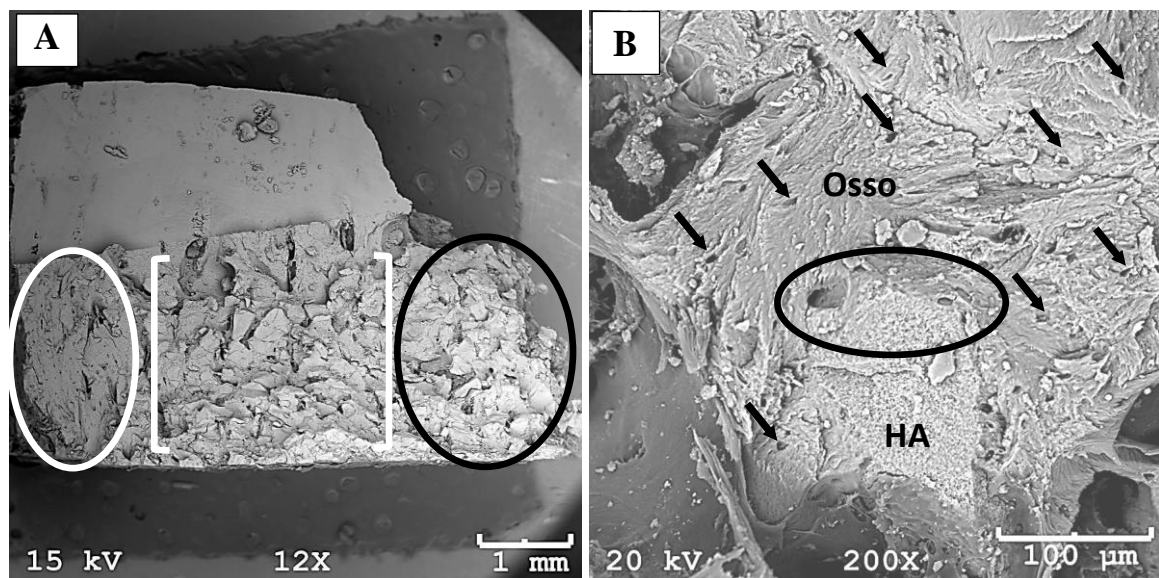


Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC - Joinville.

Neste período de avaliação de 03 meses, pode se observar que a porção do osso cortical onde ocorreu a completa absorção do biomaterial com consequente substituição por osso novo, foi de aproximadamente 1 mm, sendo que o restante do osso cortical apresentou-se repleto de HA remanescente.

A porção mais interna compreendida pelo canal medular também apresentou grande quantidade de biomaterial (Figura 26 A). Foi possível observar também a grande quantidade de osteócitos no osso neoformado, o que demonstra osso jovem que foi recém-formado. A HA demonstrou perfeita interface com o osso novo o que é caracterizado como osteointegração (Figura 26 B).

Figura 26 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o biomaterial HA. (A) Notar a área cortical de osso neoformado (círculo branco) onde os biomateriais foram totalmente absorvidos. O restante da área correspondente à porção do osso cortical ainda apresenta biomaterial (colchetes). A porção mais interna corresponde a HA dentro do canal medular (círculo preto). (B) Biomaterial totalmente envolvido por osso neoformado apresentando a adesão entre osso e biomaterial (círculo) e osteócitos (setas pretas).

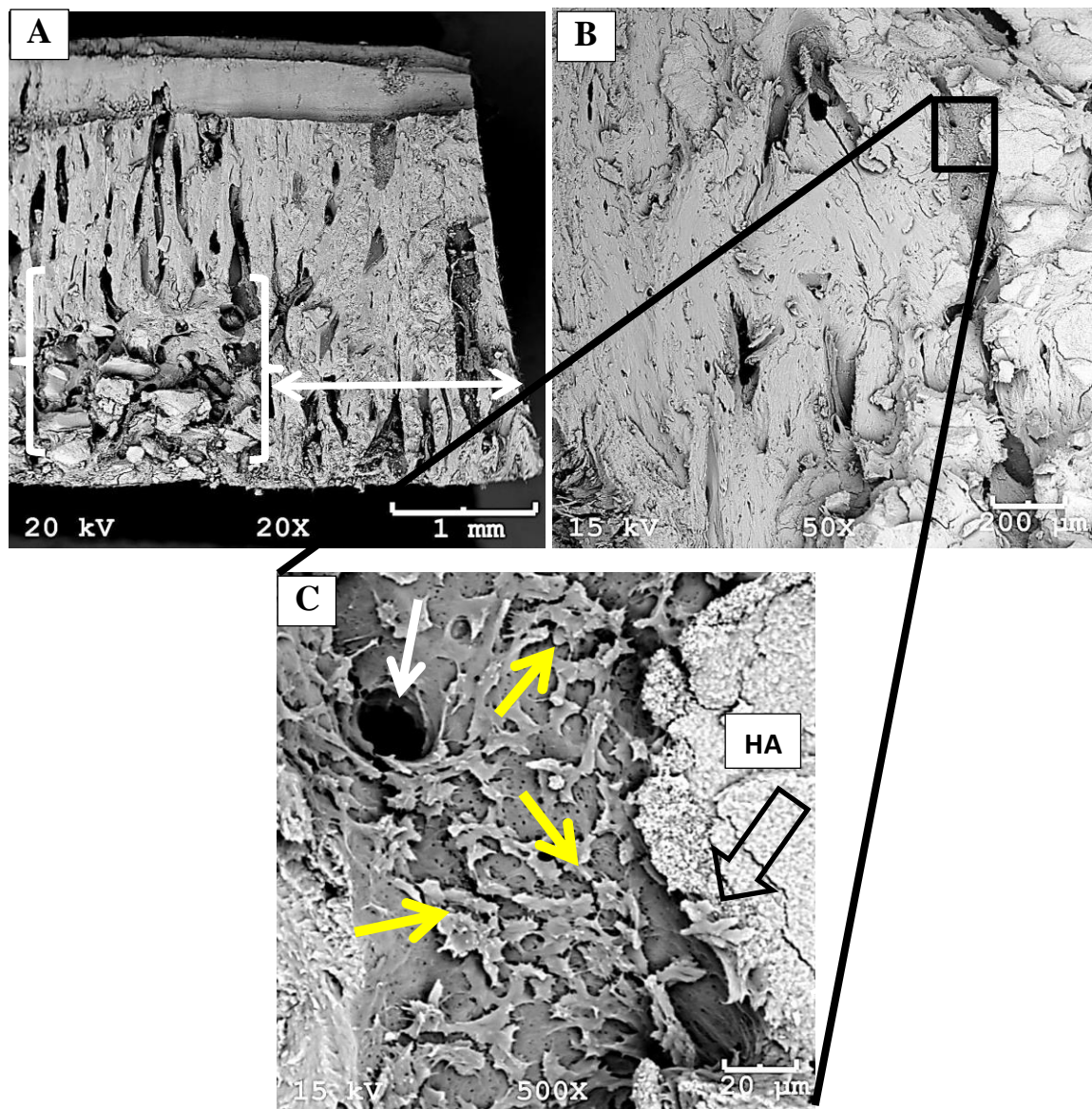


Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC - Joinville

Aos 06 meses a HA apresentou desempenho muito semelhante àqueles encontrados aos 03 meses. A extensão de osso cortical neoformado e a HA absorvida foi de aproximadamente 2 mm. A porção neoformada apresentou características de osso compacto com a presença de osteócitos e orifícios compatíveis com a presença de vasos sanguíneos, o que indica que este material apresenta característica de induzir a angiogênese local e consequentemente a osteoindução.

A cicatrização ocorreu da porção mais externa, próxima ao periósteo, em direção ao canal medular e conforme ela foi evoluindo o osso se tornou mais denso. A interface do osso com o material remanescente apresenta-se da mesma forma que aquela encontrada aos 03 meses. Outro detalhe importante encontrado foi a presença de osteoblastos na superfície óssea e dos biomateriais caracterizando boa osteoindução e osteocondução (Figura 27).

Figura 27 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 06 meses com o biomaterial A. (A) Extensão de osso cortical neoformado (seta branca). A porção de osso cortical que ainda apresenta HA remanescente esta indicada pelos colchetes. (B) Osso neoformado denso, com a presença de osteócitos e biomaterial remanescente em porção mais próxima ao canal medular. (C) Osteoblastos sobre a superfície óssea (setas amarelas) e sobre a HA (seta preta vazada). A seta branca mostra um orifício no osso neoformado que corresponde a um vaso sanguíneo.

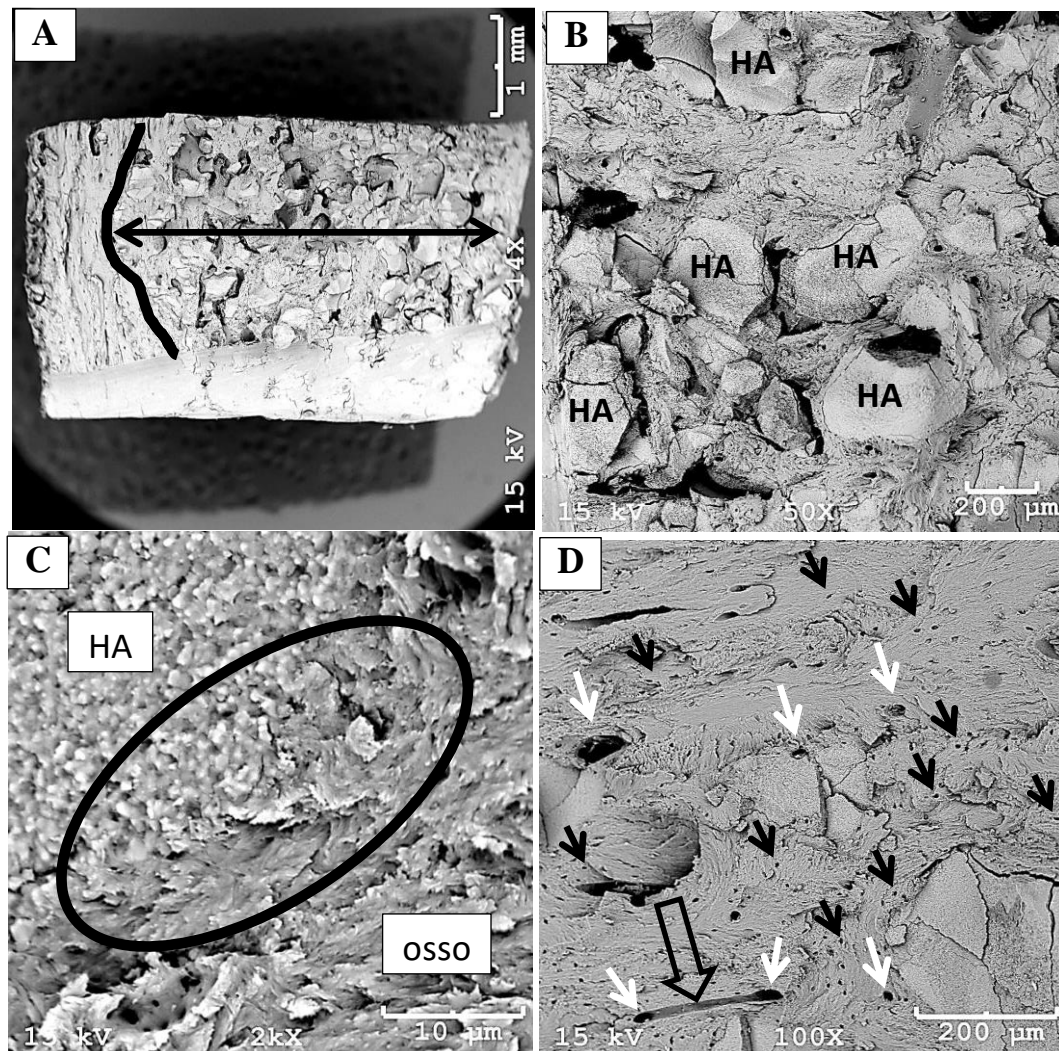


Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville.

Aos 12 meses a HA manteve as mesmas características de cicatrização no que diz respeito à taxa de absorção e formação do novo tecido ósseo. Em função desta característica de absorção mais lenta que o TCP- β , foi possível ainda encontrar este biomaterial na região do osso cortical. Embora ainda existisse a presença de HA, o osso neoformado apresentou características de osso denso com osteócitos distribuídos de forma aleatória por todo oss

neoformado e apresentando perfeita osteointegração entre o osso recém-formado e o biomaterial HA (Figura 28).

Figura 28 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 12 meses com o biomaterial HA. (A) Notar a pequena região cortical (esquerda da linha preta) onde o biomaterial foi totalmente reabsorvido e substituído por osso novo. A maior porção da região cortical (direita da linha preta) apresenta grande quantidade de HA embebida em osso neoformado. (B) HA remanescente osteointegrada ao osso neoformado apresentando características de osso compacto, com a presença de osteócitos e adesão entre os biomateriais e o osso neoformado. (C) HA e osso neoformado com adesão entre eles tornando difícil a distinção dos seus limites (círculo). (D) Osso compacto com estrutura não lamelada e presença de osteócitos (setas pretas), vasos sanguíneos (setas brancas) e canais de Wolkman (seta vazada).



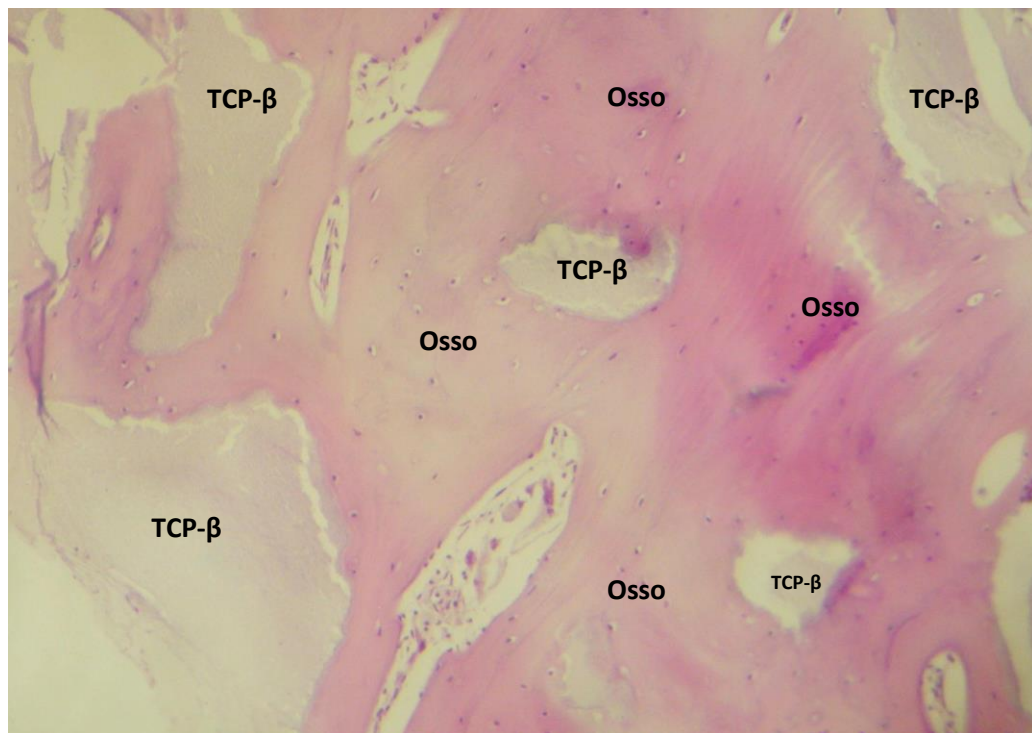
Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville.

5.2.4 Tricálcio Fosfato - β (TCP- β)

5.2.4.1 Avaliação Histológica

Na avaliação histológica aos 03 meses, o osso onde foi implantado TCP- β apresentou proliferação de osteócitos por toda extensão do osso neoformado e que indica extensa formação de tecido ósseo e com isso rápido preenchimento das microporosidades existentes entre os grânulos e também dentro deles (Figura 29).

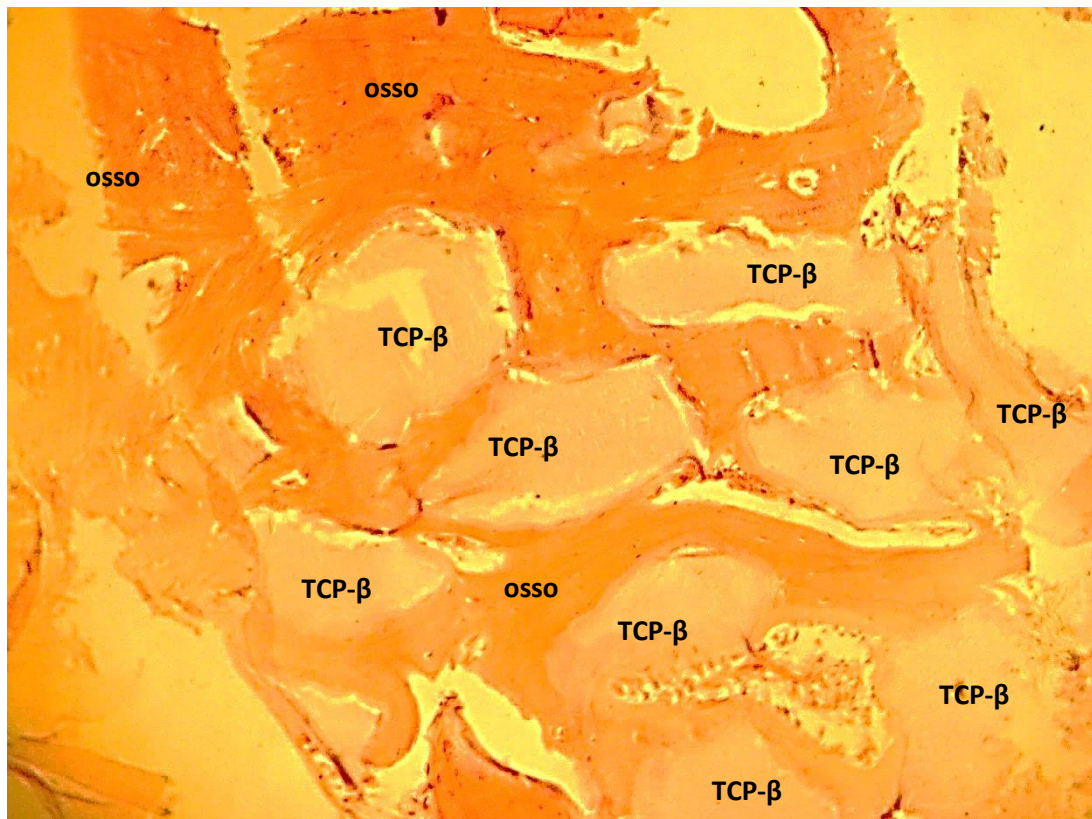
Figura 29 - Fotomicrografia de avaliação histológica de osso de ovelha aos 03 meses com enxerto de TCP- β . Notar a formação de tecido ósseo denso com grande quantidade de osteócitos (pontos pretos) e a presença de biomaterial remanescente sendo absorvido osso novo.



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

A avaliação aos 06 meses revelou que a neoformação de tecido ósseo e a formação de osso secundário ocorreu de forma acentuada, o biomaterial remanescente, a deposição de fibras colágenas e a presença de osteoclastos de forma moderada e que a presença de osso primário, formação de tecido mielóide e macrófagos ocorreram de forma leve (Tabela 3). A figura 30 mostra o TCP- β remanescente totalmente envolvido por osso neoformado com prevalência de osso secundário.

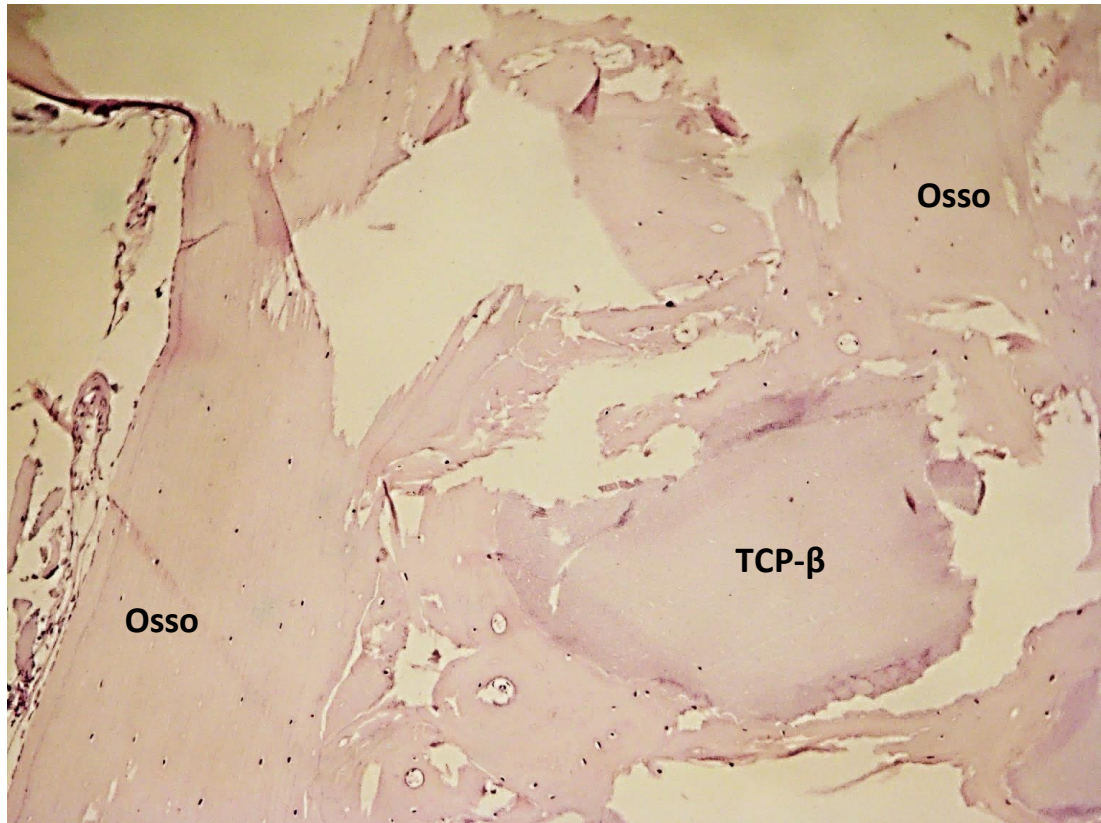
Figura 30 - Fotomicrografia de avaliação histológica de osso de ovelha aos 06 meses com enxerto de TCP- β . Notar a presença de biomaterial remanescente envolto por osso predominantemente secundário (H&E. Objetiva 10x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

A avaliação aos 12 meses revelou pequena quantidade de biomaterial próximo do canal medular (endósteo). O biomaterial remanescente apresentou-se totalmente envolvido pelo osso neoformado, com o predomínio de osso secundário (Figura 31).

Figura 31- Fotomicrografia de microscopia óptica de ovelha aos 12 meses de osso com enxerto de TCP- β . Notar grânulo de biomaterial remanescente circundado por osso neoformado com predomínio de osso secundário. Presença de osteócitos (pontos pretos) com distância maior entre eles, indicativo de osso maduro, quando comparado com osso primário (jovem) onde os osteócitos se apresentam próximos entre si (H&E. Objetiva 10x).

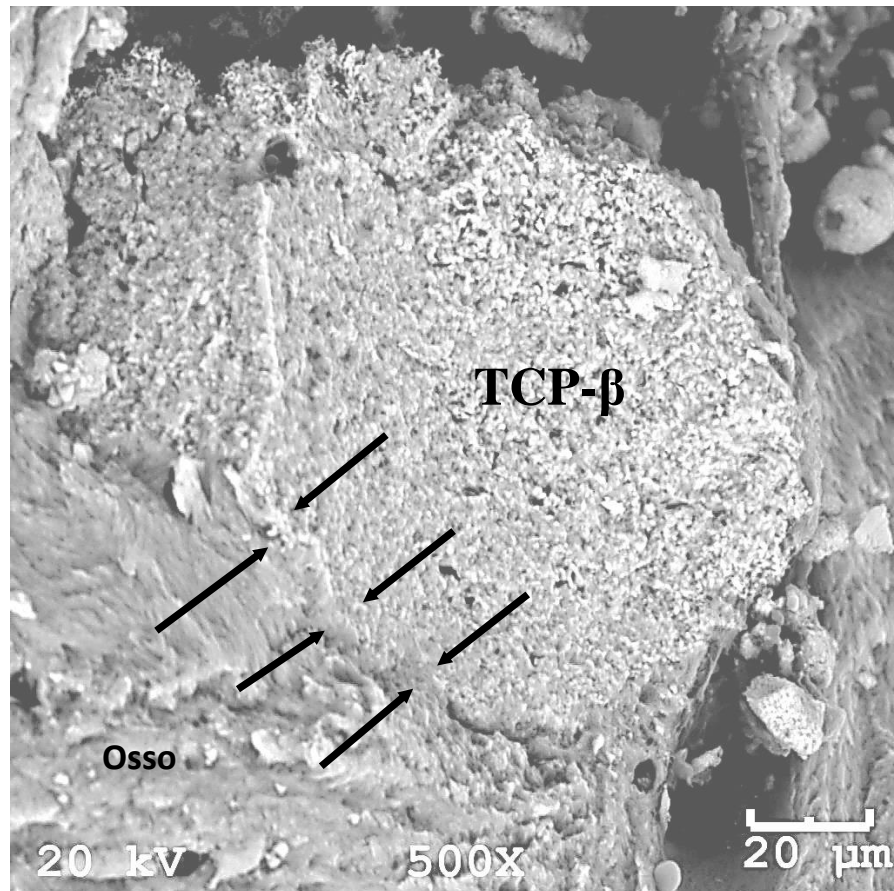


Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

5.2.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As avaliações realizadas com o tricálcio fosfato- β demonstraram a osteointegração e formação óssea, inclusive no interior do grânulo. Demonstrou ser rapidamente absorvido e capaz de induzir à formação de novo tecido ósseo. Apresenta regiões de interface fortemente aderidas, indicando a osteointegração (Figura 32).

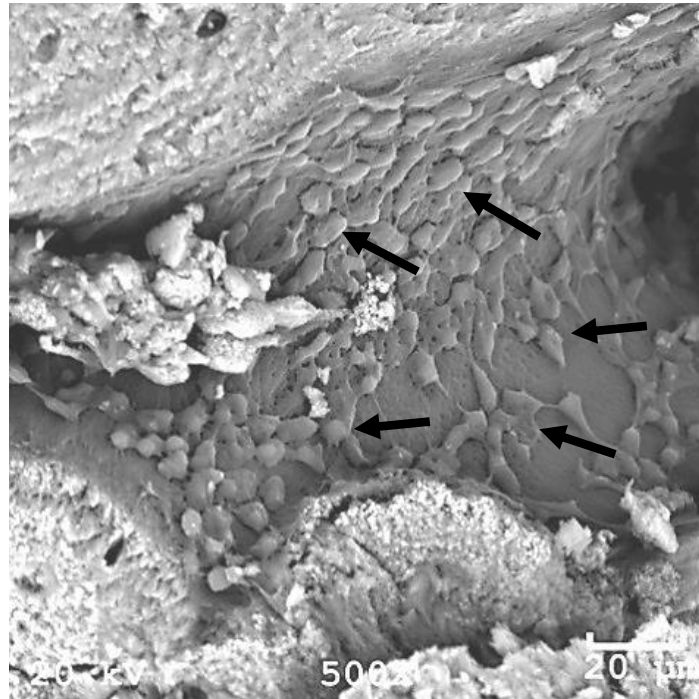
Figura 32 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o biomaterial TCP- β . Notar interface entre biomaterial e osso neoformado (setas) o que caracteriza a osteointegração deste biomaterial.



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville.

Na avaliação das MEVs aos 03 meses observou-se também a presença de osteoblastos na superfície óssea e do biomaterial. Essas células foram encontradas nessas superfícies caracterizando osteoindutibilidade e osteocondutibilidade (Figura 33).

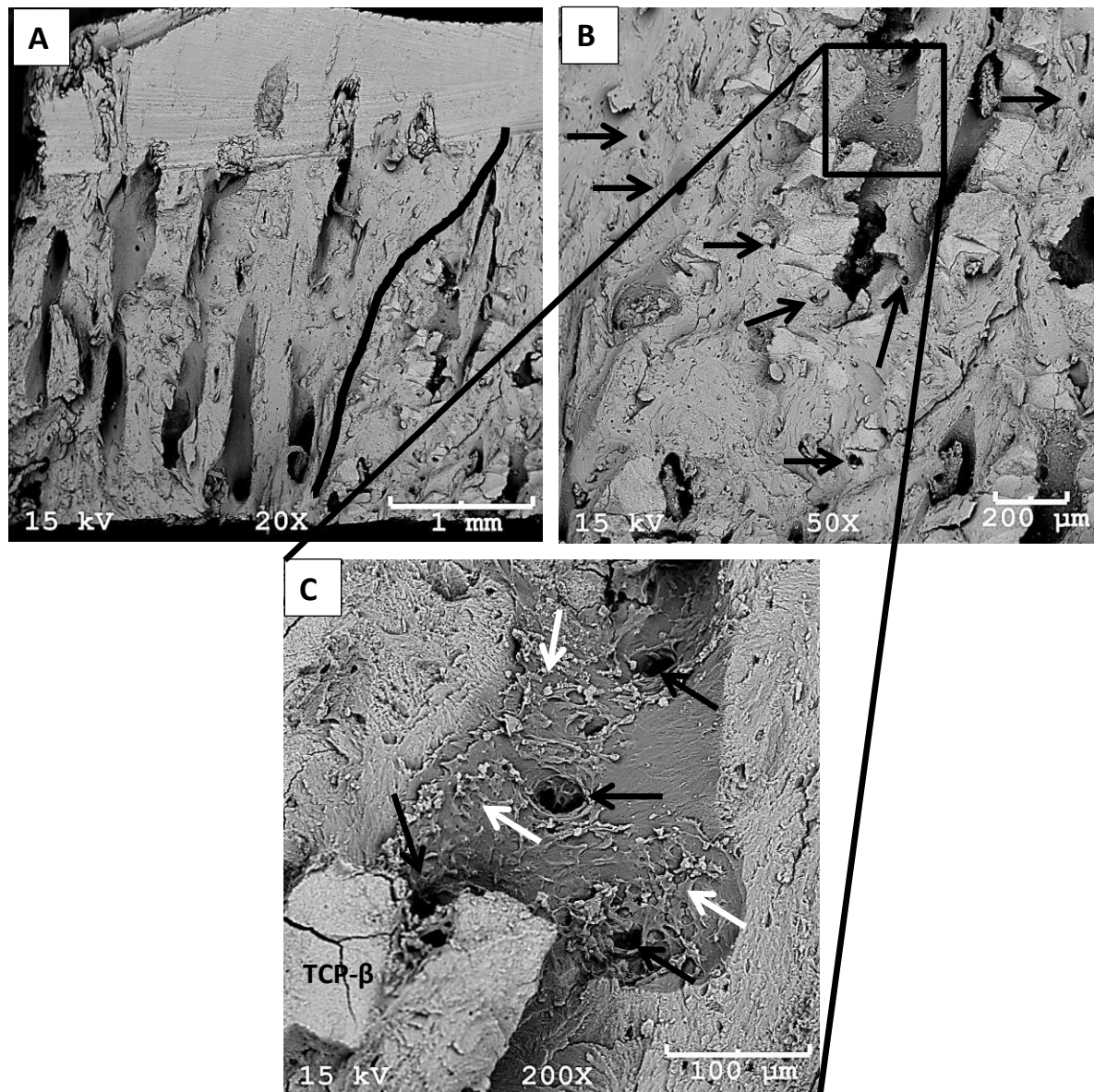
Figura 33 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o biomaterial TCP- β . Notar a presença abundante de osteoblastos na superfície óssea (setas) caracterizando boa osteoindução, osteocondução e demonstrando intensa proliferação óssea.



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC - Joinville

Na avaliação aos 06 meses pode se observar que a extensão da região cortical onde o TCP- β foi absorvido e substituído por osso novo compreende pouco mais de 2 mm. A porção que ainda apresenta o TCP- β remanescente, mais próxima do canal medular, contém osso envolvendo esses biomateriais. O osso neoformado apresenta-se de forma compacta, com osteócitos e orifícios que sugerem a presença de vasos sanguíneos (Figura 34). Em todas as amostras analisadas a interface entre o TCP- β e o osso neoformado se apresentou com perfeita justaposição entre eles.

Figura 34 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 06 meses com o biomaterial TCP- β . (A) Linha preta que divide região onde o TCP- β foi totalmente absorvido (esquerda) e região onde ainda apresenta biomaterial remanescente (direita). (B) Região de transição entre área que não apresenta mais biomaterial (esquerda) e a que ainda tem biomaterial remanescente (direita). Notar que existe osteócitos distribuídos por toda extensão do osso neoformado, presença de muitos vasos sanguíneos (setas pretas). (C) Cavidade óssea com presença de osteoblastos em sua superfície (setas brancas) e orifícios correspondentes a vasos sanguíneos (setas pretas).



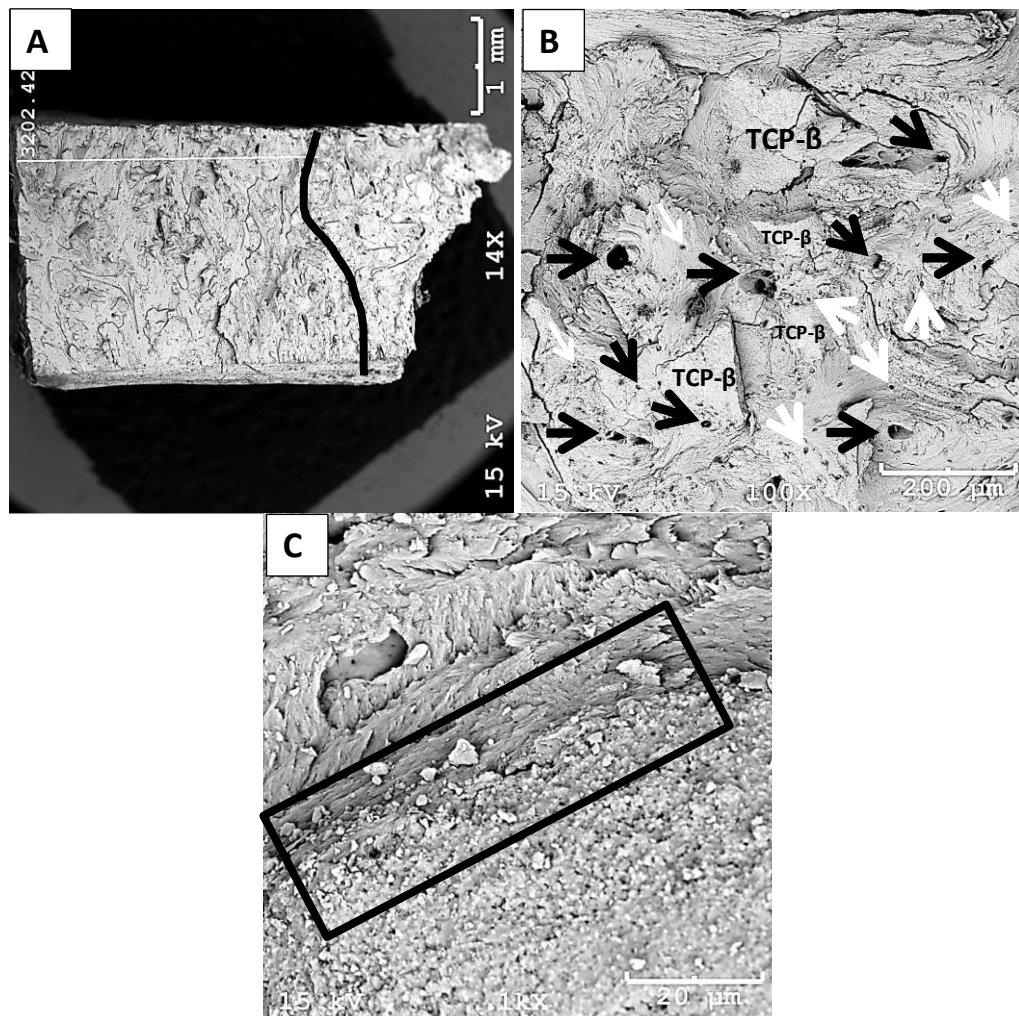
Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville.

Aos 12 meses na região compreendida pelo osso cortical (3 mm) o TCP- β foi totalmente absorvido (Figura 35 A), demonstrando mais uma vez a sua capacidade de rápida dissolução quando comparado com a hidroxiapatita. Ao final do período de avaliação, analisando aos 03, 06 e 12 meses, pode se observar que a absorção do biomaterial e a

consequente formação óssea se deram da parte mais externa do osso cortical em direção ao canal medular.

Na região onde foram encontrados os biomateriais remanescentes eles se apresentaram totalmente envoltos por osso neoformado, com a presença de osteócitos e orifícios que sugerem vasos sanguíneos (Figura 35 B). Da mesma forma que aos 03, 06 e 12 meses também demonstrou que o TCP- β tem capacidade de osteointegração caracterizado pela perfeita interface entre osso e biomaterial (Figura 35 C).

Figura 35 - Fotomicrografias de MEVs de ovelhas aos 12 meses do biomaterial TCP- β . (A) Notar que toda a extensão do osso cortical que é de aproximadamente de 3 mm, apresenta-se com reabsorção total dos biomateriais e substituição por osso neoformado. À direita da linha preta ainda é possível visibilizar o biomaterial. (B) TCP- β remanescente envolto por osso neoformado jovem com a presença de osteócitos (setas brancas) e vasos sanguíneos (setas pretas). (C) Região de interface entre osso e TCP- β demonstrando a adesão entre eles (retângulo).



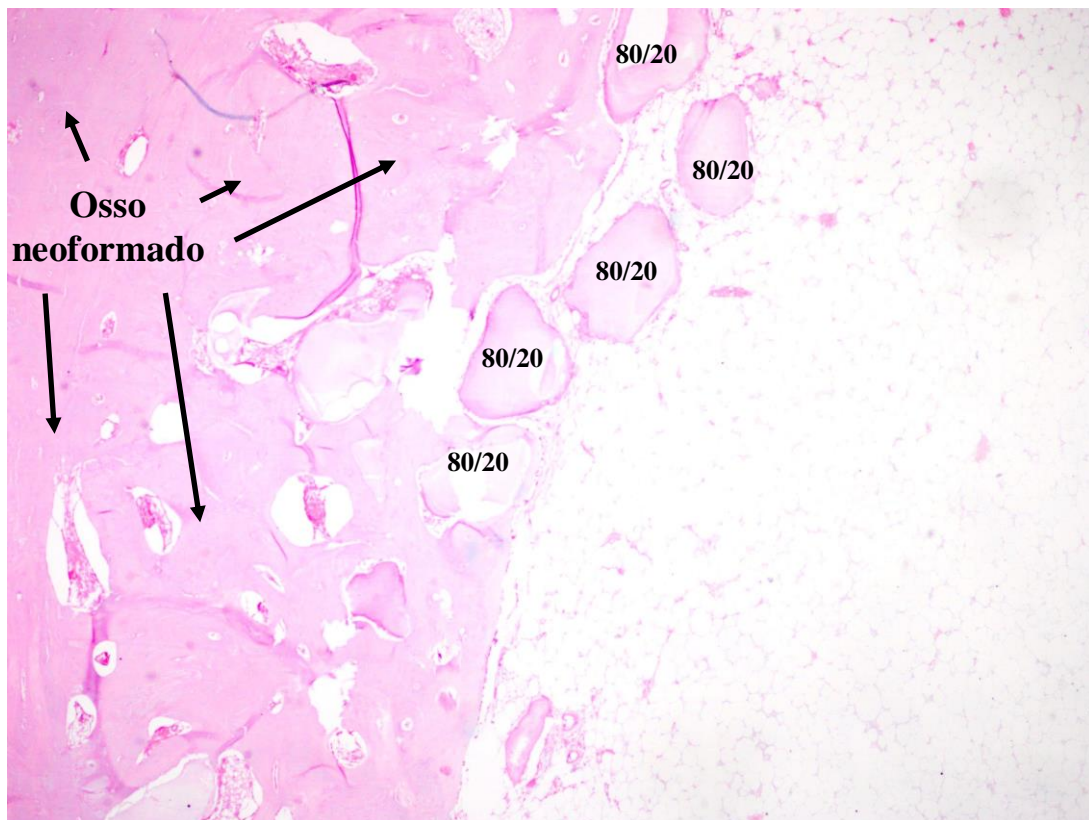
Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC - Joinville

5.2.5 Bifásico HA/TCP- β (80/20)

5.2.5.1 Avaliação Histológica

Na avaliação histológica desse bifásico, foi encontrado biomaterial em região cortical ao mesmo tempo em que se observou produção de osso neoformado. Observou-se ainda a organização óssea através da disposição das lamelas concêntricas e a presença de osteócitos próximo entre si, o que caracteriza tecido ósseo jovem. A figura 36 demonstra grânulos de biomaterial em região de transição entre osso cortical e cavidade medular.

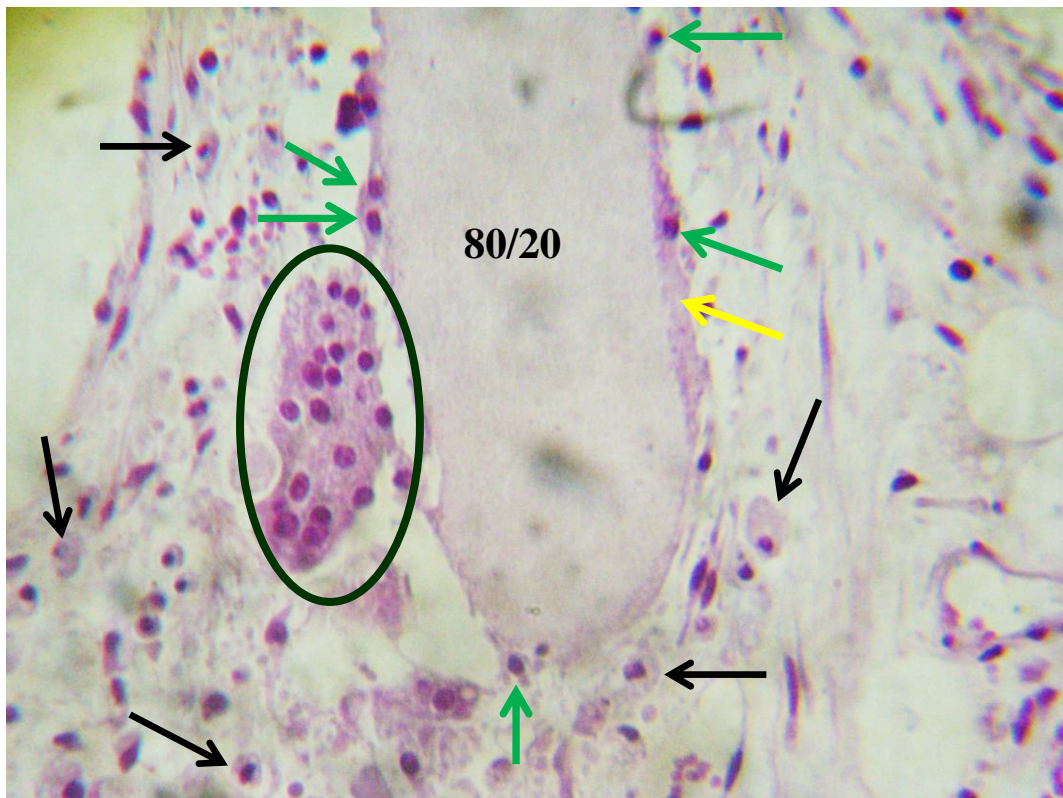
Figura 36 - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 03 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 80/20. Corte histológico demonstrando região de transição entre osso cortical e canal medular. Notar a presença grânulos de biomaterial remanescente nesta região (H&E objetiva 4x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

Na avaliação aos seis meses este bifásico apresentou moderada quantidade de biomaterial circundado por pequena quantidade de macrófagos com citoplasma amplo e vacuolizado (Figura 37). Observa-se ainda múltiplos focos com tecido fibroso distribuídos de forma aleatória. Quantidade moderada de osteoclastos multinucleados, sendo que a maioria deles encontra-se acoplados na superfície do biomaterial. Observa-se no osso neoformado a predominância de osso lamelar (osso secundário). Em alguns focos se observa a formação óssea sobre o biomaterial. Próximo da região do periósteo observam-se ilhas de biomaterial circundada por osso primário e secundário.

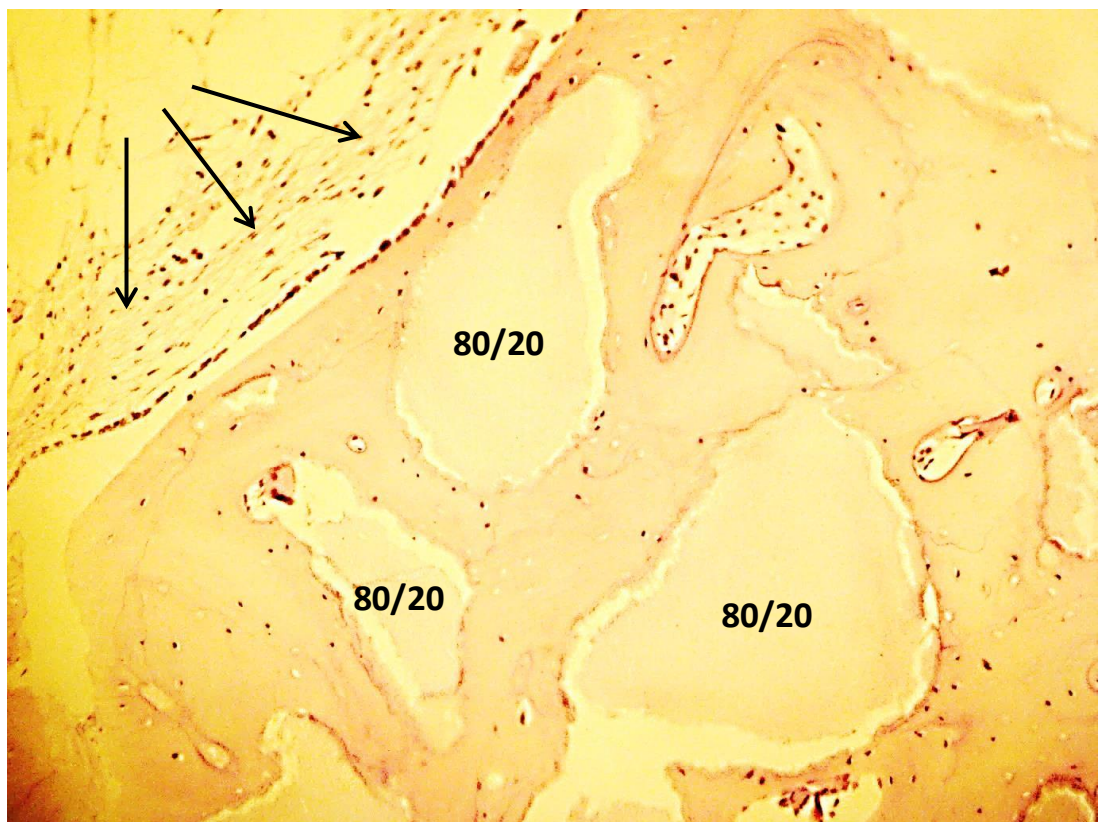
Figura 37 - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 06 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 80/20. Notar a grande quantidade de macrófagos mononucleares – setas pretas), osteoclastos mononucleares (setas verdes) e osteoclastos multinucleares (círculo verde). Notar também a pequena quantidade de osso neoformado na superfície do biomaterial (seta amarela) (H&E. Objetiva 40x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

Na avaliação aos 12 meses para o bifásico 80/20 foi observado moderada quantidade de biomaterial próximo ao canal medular. Neste tempo de avaliação foi encontrada pouca atividade celular, com poucos macrófagos e não foi visibilizado tecido fibroso ao redor dos biomateriais na região do endósteo, o que pode ser caracterizado por reação a cicatrização normal (Figura 38).

Figura 38 - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 12 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 80/20. Notar quantidade moderada de biomaterial circundado predominantemente por osso secundário com presença de pequena quantidade de osteócitos (pontos pretos). Pouca atividade celular e presença de pequena quantidade de tecido fibroso na região do endósteo (setas) (H&E. Objetiva 10x).

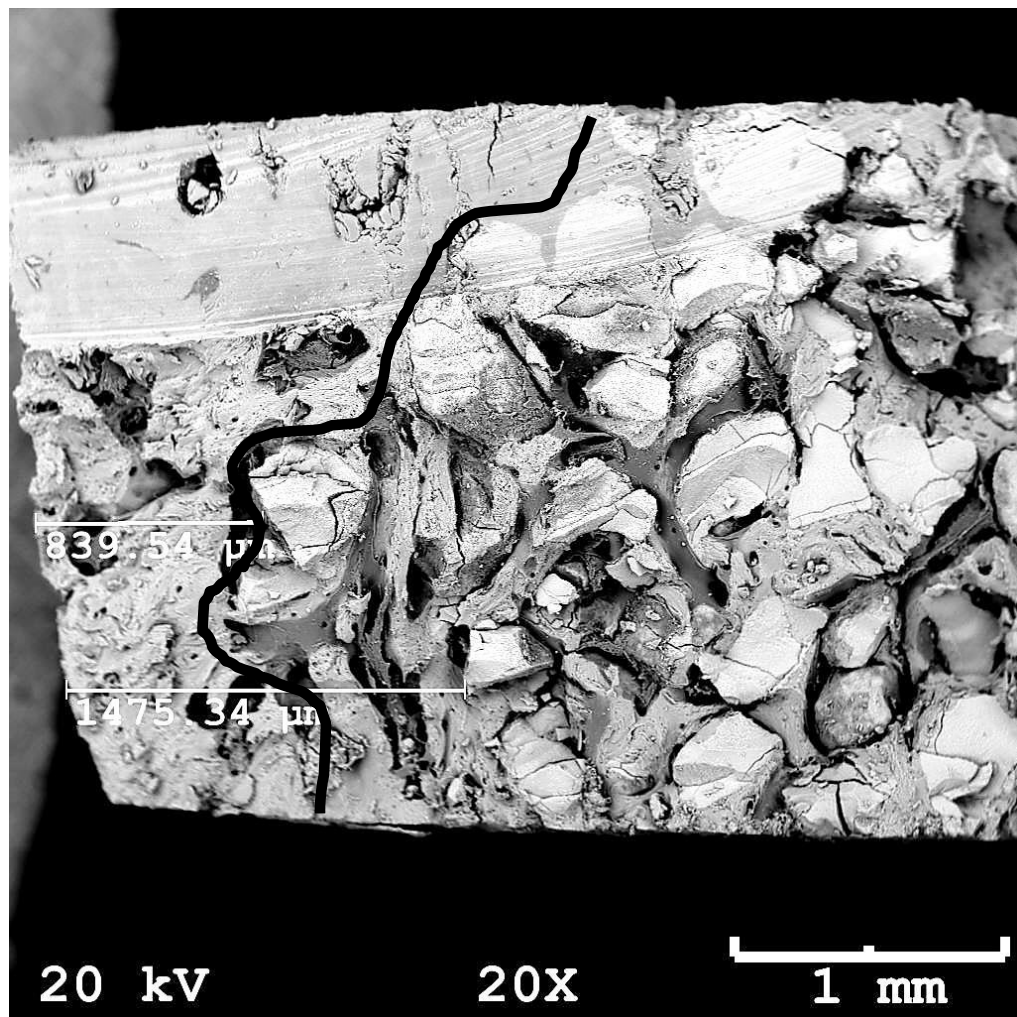


Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

5.2.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Nas avaliações das MEVs, aos 03 meses, o composto bifásico HA/TCP- β 80/20 apresentou biomineralização e de formação óssea, embora ainda apresentasse biomaterial na região cortical (Figura 39).

Figura 39 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o bifásico HA/TCP- β 80/20 demonstrando a relação de osso neoformado à esquerda da linha preta e o biomaterial remanescente à direita da linha preta.

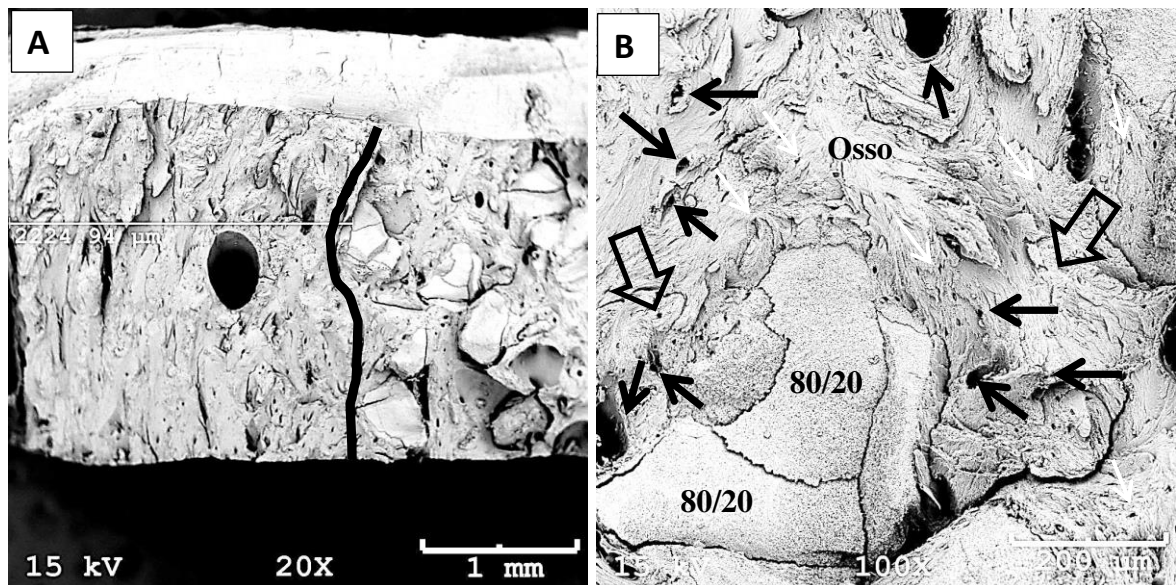


Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC - Joinville

Aos 06 meses observa-se formação de tecido ósseo, bem como osteointegração entre osso e biomaterial (Figura 40 A e B).

A porção de osso cortical que foi totalmente substituído por osso neoformado caracteriza-se por osso secundário com a presença de osteócitos e orifícios sugerindo vasos sanguíneos. Os biomateriais remanescentes encontram-se totalmente envoltos por osso compacto, com a presença de osteócitos e vasos sanguíneos. Da mesma forma que para a HA e o TCP- β puros, a interface entre o osso e o HA/TCP- β 80/20 demonstrou perfeita justaposição entre eles (Figura 40).

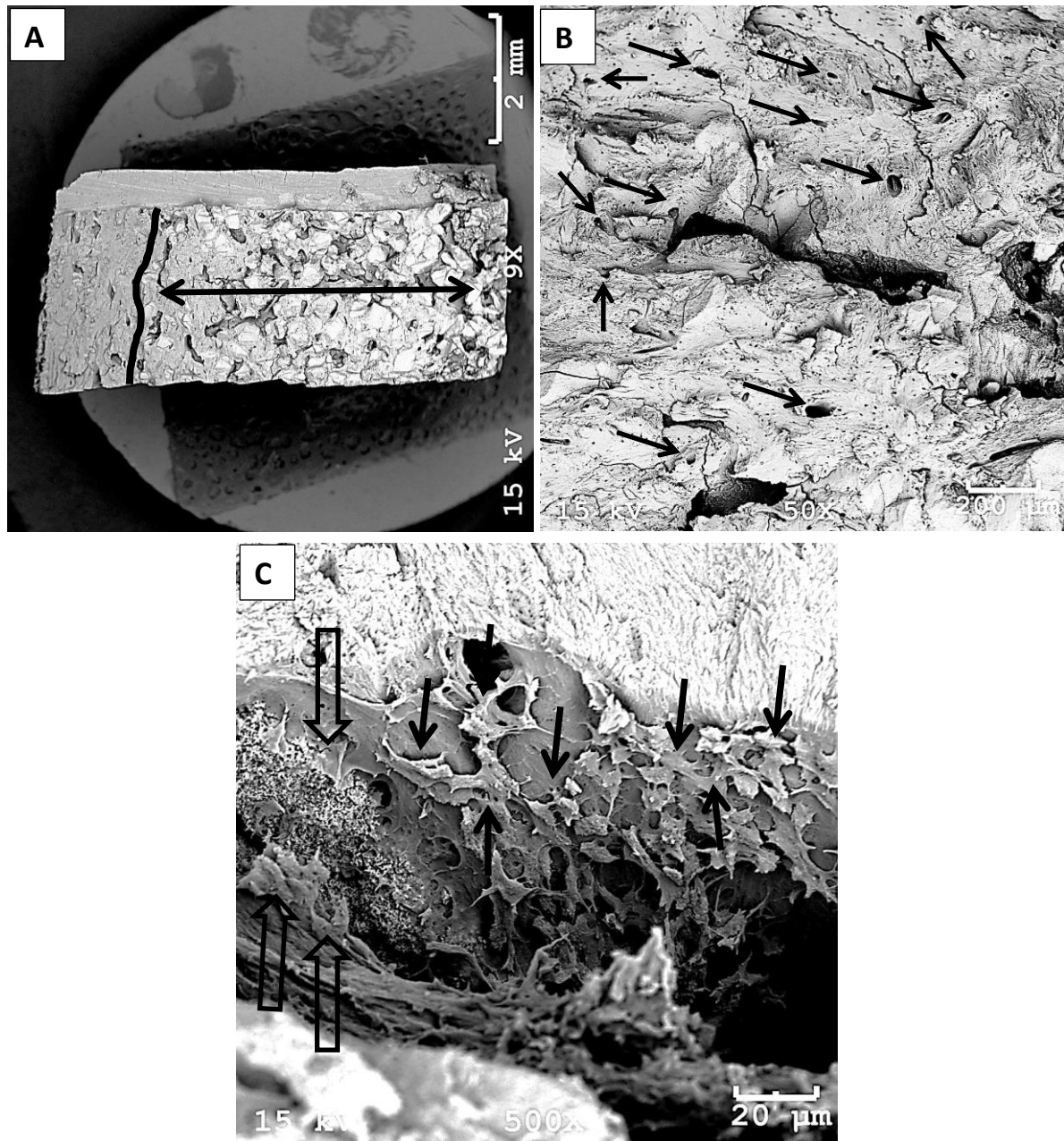
Figura 40 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 06 meses com o bifásico HA/TCP- β 80/20. (A) Linha preta dividindo região cortical à esquerda com osso neoformado. Notar que os biomateriais foram totalmente absorvidos. À direita presença de biomaterial osteointegrado pelo novo osso formado. (B) Biomaterial remanescente osteointegrado em osso neoformado compacto. Notar as fibras ósseas com características de osso não lamelar, com osteócitos (setas vazadas) e vasos sanguíneos, características de osso jovem (setas pretas).



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC - Joinville.

Aos 12 meses o HA/TCP- β 80/20 apresentou resultado de absorção do biomaterial e produção óssea menor que aos 06 meses e muito próximo ao de 03 meses. Entretanto, mesmo apresentando grande quantidade de biomaterial remanescente (Figura 41 A) houve grande produção óssea entre o biomaterial granulado. Sendo ela considerada de boa qualidade, com osso denso, com osteócitos e vasos sanguíneos (figura 41 B). Em todos os espaços que ainda não foram totalmente preenchidos por osso novo, observaram-se grandes quantidades de osteoblastos em suas superfícies (Figura 41 C), demonstrando grande capacidade osteocondutora deste bifásico.

Figura 41 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 12 meses com o bifásico HA/TCP- β 80/20. (A) Linha preta dividindo área cortical totalmente substituído por osso neoformado (esquerda) e área com biomaterial remanescente (seta) (B) Biomaterial remanescente osteointegrado em osso neoformado com osteócitos e vasos sanguíneos (setas). (C) Cavidade óssea mostrando osteoblastos sobre a superfície óssea (setas pretas) e sobre os biomateriais granulados (setas vazadas).



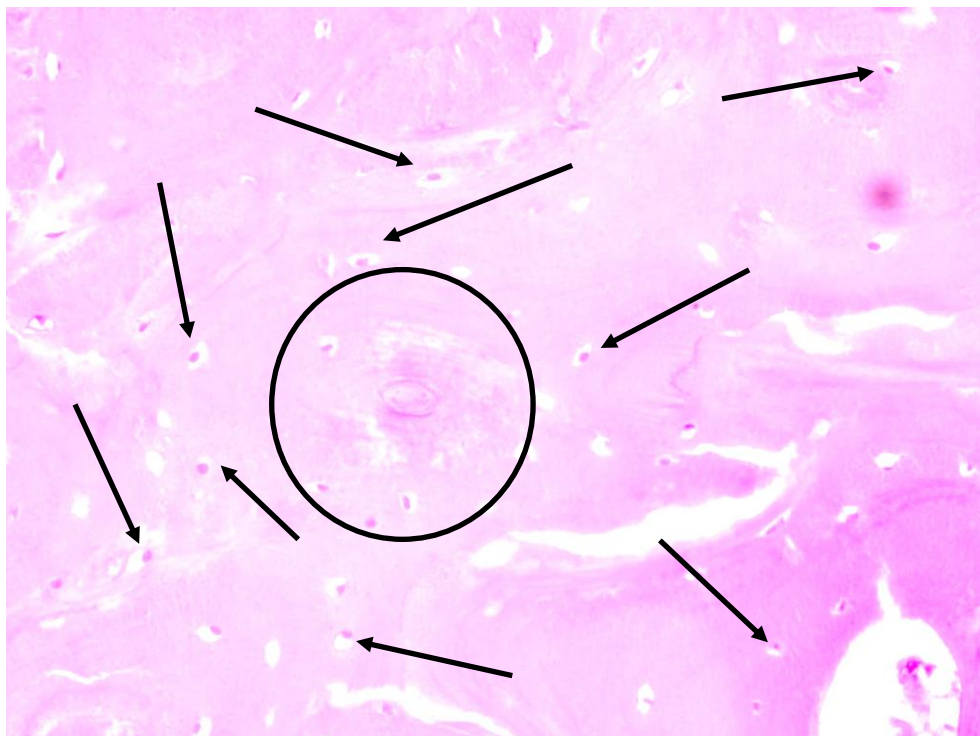
Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville

5.2.6 Bifásico HA/TCP- β (20/80)

5.2.6.1 Avaliação Histológica

No estudo histológico desse bifásico, aos 03 meses pode-se observar produção óssea com presença de osteoclastos e osteócitos e lamelas ósseas concêntricas bem organizadas, o que demonstra a formação de tecido ósseo. Os grânulos de biomaterial não são mais observados em região cortical o que demonstra rápida reabsorção e consequente neoformação óssea (Figura 42).

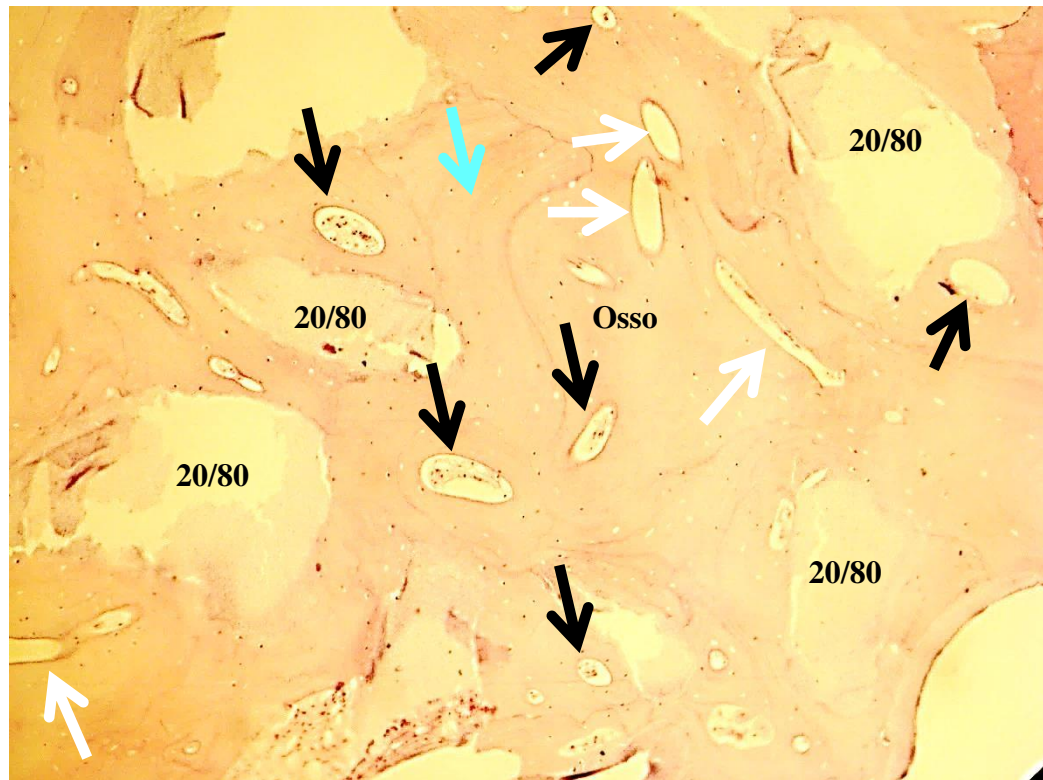
Figura 42 - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 03 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 20/80. Observar a formação óssea com presença de osteócitos (setas) e ausência de biomaterial em região cortical. Formação de tecido jovem com lamela concêntrica ainda em formação (círculo) (H&E. Objetiva 40x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

Aos 06 meses a avaliação histológica demonstrou presença de biomaterial e este estando mais próximo do canal medular. Presença leve de macrófagos e de osteoclastos multinucleados. Observou-se osso primário e secundário (lamelar) com a presença de sistemas osteonais e canais de Volkmann. (Figura 43).

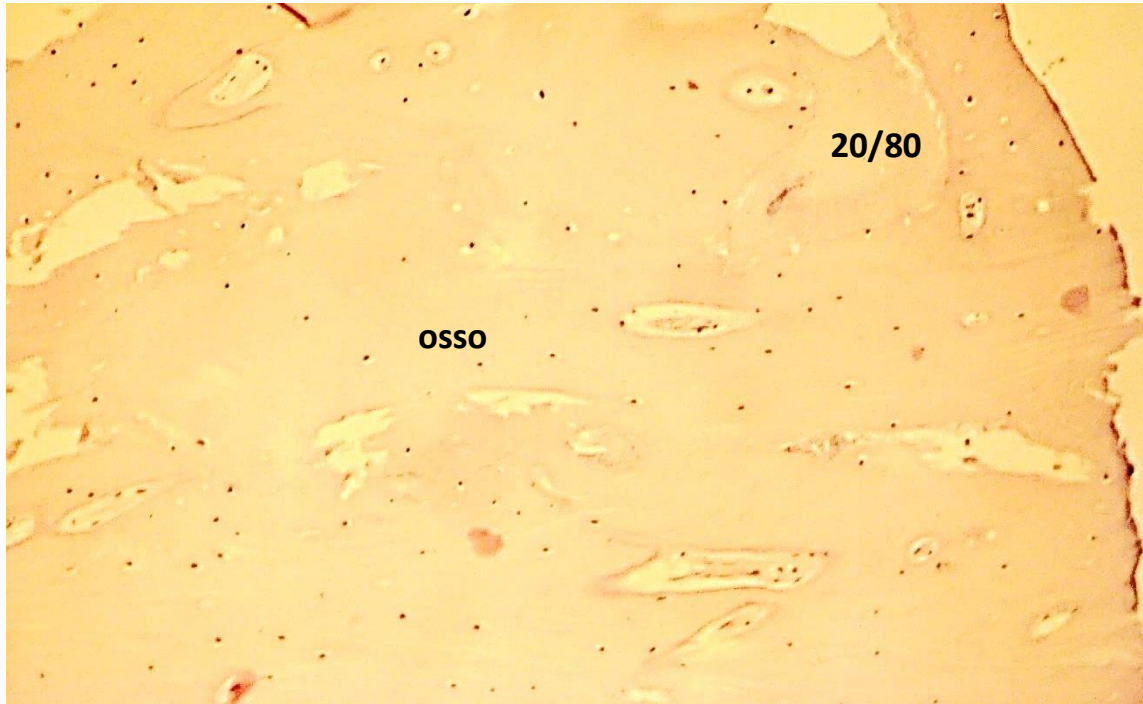
Figura 43 - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 06 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 20/80. Notar presença de biomaterial completamente envolto por tecido ósseo compacto com presença de osteócitos (pontos pretos). Presença de osso primário e secundário (lamelar – seta azul) com sistemas osteonais (setas pretas) e canis de Volkmann (setas brancas) (H&E. Objetiva10x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

Aos 12 meses observou-se pequena quantidade de biomaterial remanescente, que foi encontrada apenas em região mais próxima do canal medular, abaixo do endóstio. Neste tempo de avaliação também foi verificada pouca atividade celular. Foram verificadas quantidades acentuadas de osso secundário (lamelar) e leve de osso primário (Figura 44).

Figura 44 - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 12 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 20/80. Notar o biomaterial circundado por tecido ósseo predominantemente secundário. Neste grupo a atividade celular se encontra bastante reduzida. Presença de osteócitos (pontos pretos) distantes entre si característica de osso maduro (H&E. Objetiva 10x).

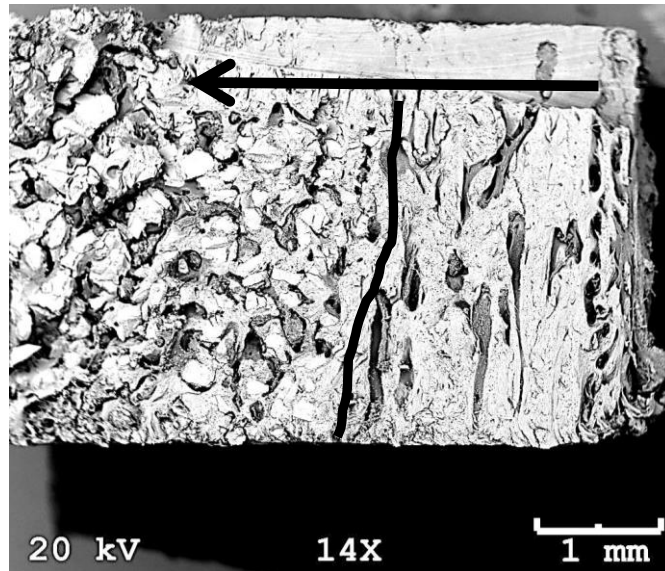


Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

5.2.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Aos 03 meses a análise das MEVs do bifásico HA/TCP- β 20/80 revelou absorção do biomaterial granulado e substituição por osso neoformado, apresentando aproximadamente 2mm de extensão de osso cortical, com osso novo (Figura 45).

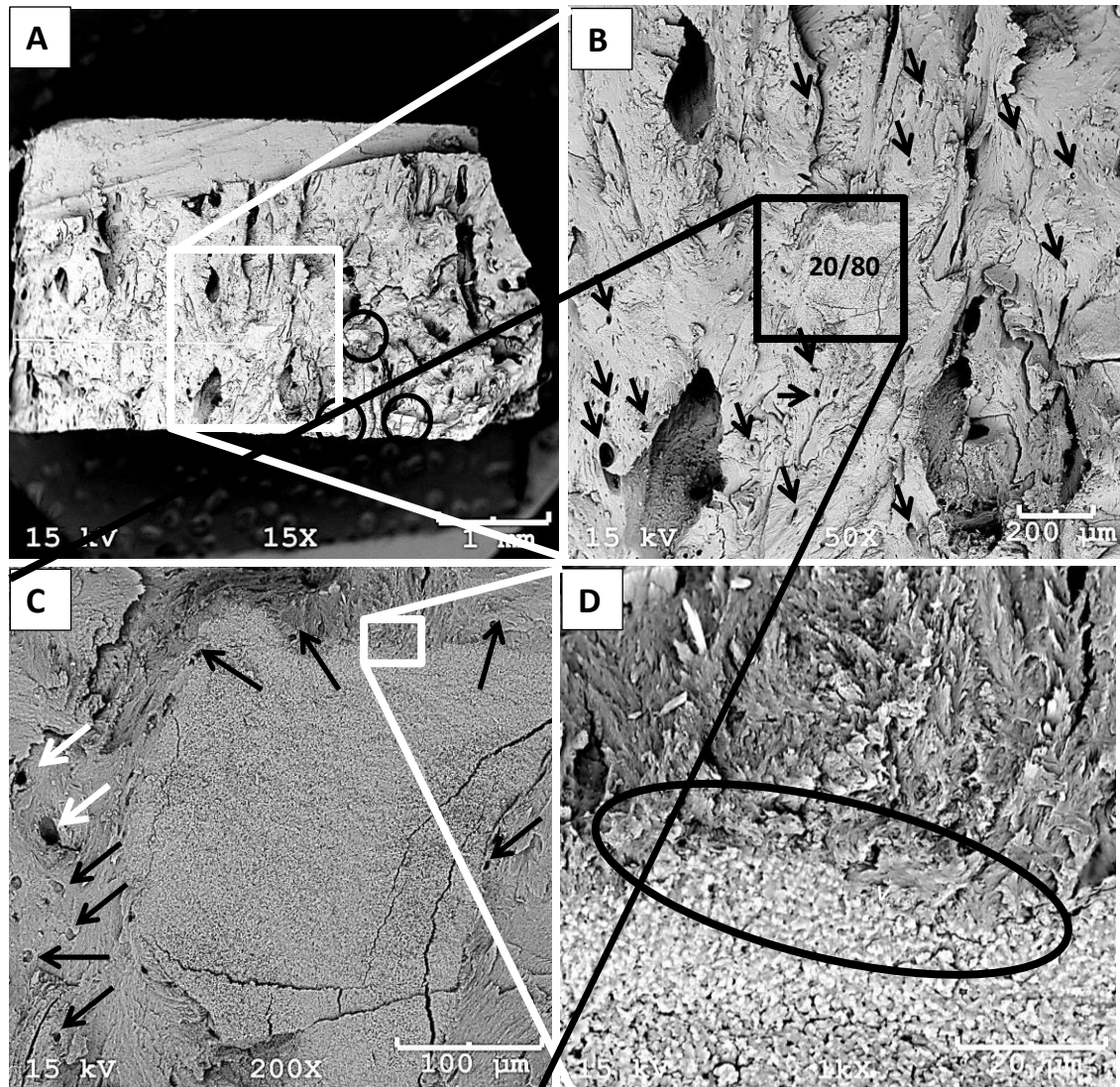
Figura 45 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o bifásico HA/TCP- β 20/80. Notar a extensão de osso cortical de aproximadamente 2 mm (à direita da linha preta) onde o biomaterial foi totalmente absorvido e substituído por osso neoformado. À esquerda biomaterial remanescente sendo envolvido por osso neoformado. Pode se observar ainda que a formação óssea esta ocorrendo da porção mais externa do osso cortical em direção ao canal medular (seta).



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville.

Aos 06 meses toda extensão do osso cortical foi substituída por osso neoformado, ficando apenas pequena quantidade de biomaterial em região de canal medular. Além de a produção óssea ter ocorrido, o osso formado se mostrou de forma densa, com a presença de osteócitos e orifícios sugerindo vasos sanguíneos. Os espaços encontrados em meio ao osso neoformado demonstraram presença de osteoblastos em suas superfícies, evidenciando formação óssea em curso. Os biomateriais remanescentes apresentaram-se circundados pelo osso novo, indicando osteointegração caracterizada pela justaposição entre osso e grânulos de biomaterial (Figura 46).

Figura 46 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 06 meses com o bifásico HA/TCP- β 20/80. (A) Região de osso cortical demonstrando a extensão de osso neoformado e a quantidade de biomaterial remanescente (círculos pretos). (B) Biomaterial remanescente totalmente envolvido por osso neoformado com aspecto de osso compacto, revelando a presença de osteócitos e vasos sanguíneos (setas). (C) Biomaterial totalmente osteointegrado pelo osso neoformado. Notar a presença de osteócitos (setas pretas) e vasos sanguíneos (setas brancas) em sua volta. (D) Círculo demonstrando a interface entre osso e biomaterial revelando adesão entre eles caracterizando a osteointegração.

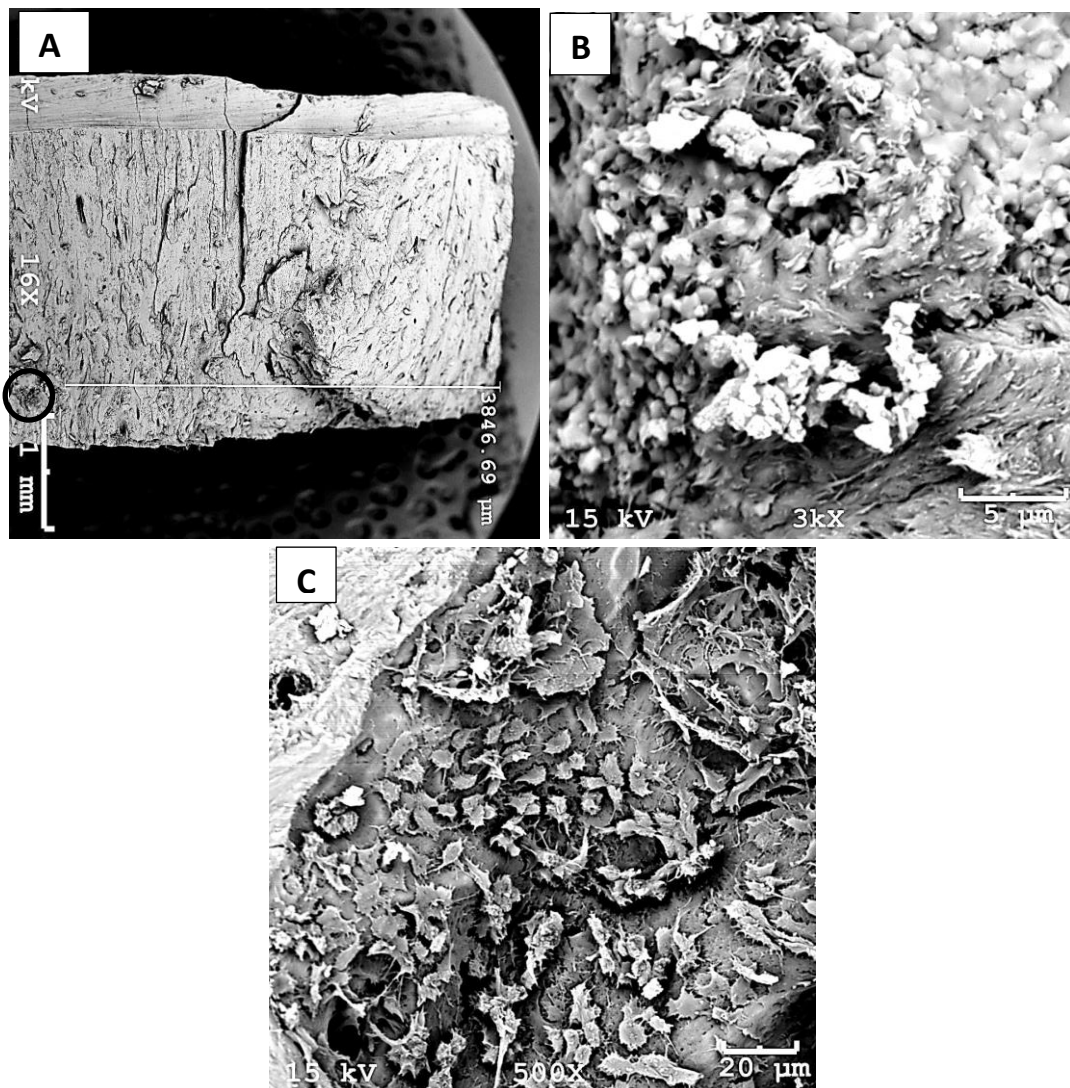


Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville.

Aos 12 meses toda a extensão do osso cortical foi substituída por osso novo. Foi possível visibilizar o biomaterial a partir de 3,8 mm da superfície cortical (Figura 47 A - círculo preto), sendo que esta região compreende o interior do canal medular, haja vista o osso cortical apresentar espessura de aproximadamente 3 mm. O osso neoformado indica estrutura organizada, características de osso maduro.

Pode se observar que a produção óssea ocorreu através do preenchimento das microporosidades, fazendo com que o biomaterial fosse osteointegrado pelo osso neoformado (Figura 47 B). A proliferação de osteoblastos nas superfícies ósseas que ainda não tinham sido completamente preenchidas por osso neoformado, demonstra o potencial osteocondutivo deste bifásico (Figura 47 C).

Figura 47 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 12 meses com o bifásico HA/TCP- β 20/80. (A) Osso cortical neoformado com absorção completa do biomaterial neoformado. Notar que o biomaterial remanescente se encontra a partir de 3,8 mm da superfície cortical (círculo). (B) Macroporos entre o biomaterial granulado sendo preenchido por osso. Notar que o biomaterial esta sendo recoberto pelo osso neoformado. (C) Osteoblastos em superfície óssea demonstrando intensa produção óssea.



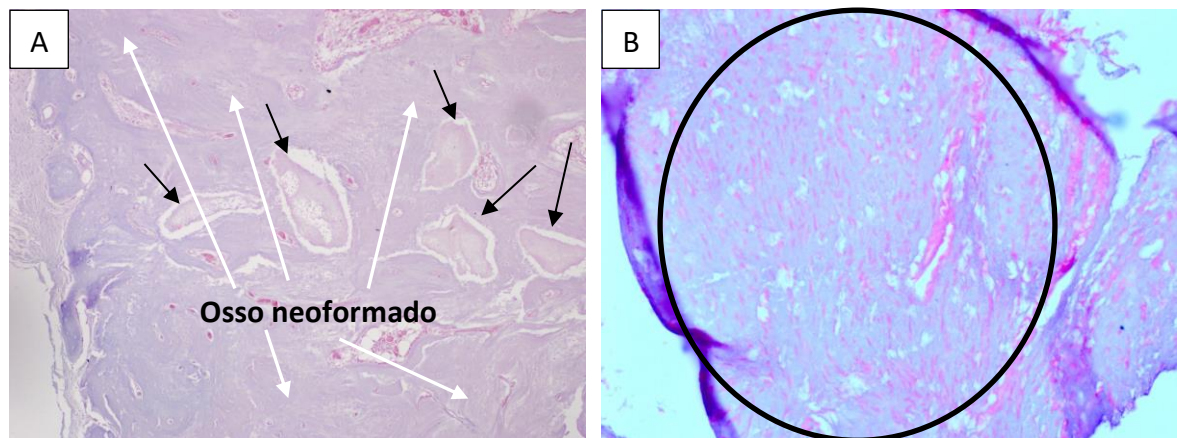
Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville

5.2.7 Bifásico HA/TCP- β (70/30)

5.2.7.1 Avaliação Histológica

O exame histológico aos 03 meses demonstrou a presença de pequena quantidade de biomaterial em região cortical mais próximo da região de transição com o canal medular (Figura 48 A). Três animais desse grupo apresentaram tecido fibroso com intensidade acentuada em cortical (Figura 48 B).

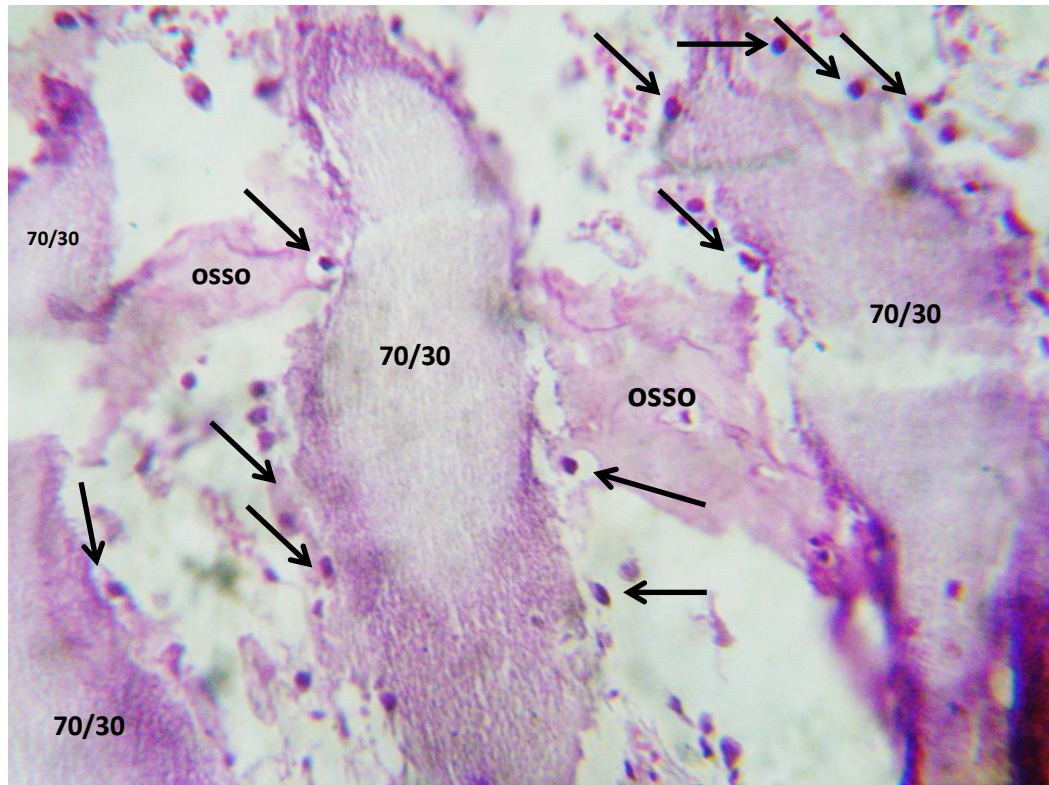
Figura 48 - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 03 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 70/30. (A) Notar a presença de biomaterial (setas pretas) envolvido por osso cortical neoformado (setas brancas), H&E objetiva 10x. (B) Tecido fibroso (círculo) presente em osso cortical de um animal do grupo 70/30 (H&E. Objetiva 40x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

Na avaliação histológica aos 06 meses para este bifásico foram observadas quantidades moderadas de células de limpeza (macrófagos mononucleares) com sinais de reabsorção osteoclástica (Figura 49). Na região cortical ainda foram observados grânulos de biomaterial envolvidos por osso neoformado. A formação do osso lamelar se deu de forma moderada, enquanto que o osso primário se deu de forma leve. O biomaterial apresenta granulado característica porosa em sua periferia

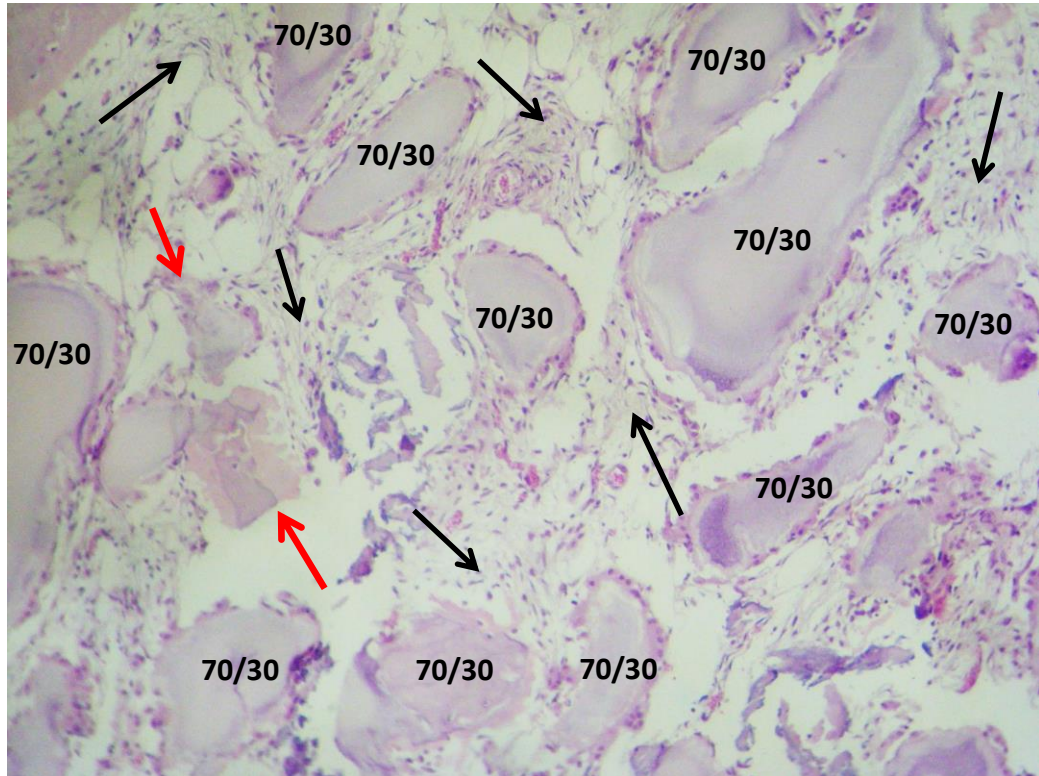
Figura 49 - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 06 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 70/30. Notar que o biomaterial apresentau osteoclastos em sua periferia (setas) com pequena neoformação óssea entre eles (H&E. Objetiva 40x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

Na avaliação aos 12 meses ainda foi possível observar quantidade acentuada de biomaterial remanescente em região cortical com macrófagos mononucleares. Tecido fibroso distribuído de forma aleatória em toda região cortical. Neste grupo foi possível observar ainda a presença de biomateriais livres (sem formação óssea em sua volta), ou com início de formação óssea sobre eles (Figura 50).

Figura 50 - Fotomicrografia de microscopia óptica de osso de ovelha aos 12 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 70/30. Notar a formação de tecido fibroso (setas pretas) distribuído de forma aleatória entre o biomaterial granulado e que entre eles existe pouca formação óssea (setas vermelhas) (H&E. Objetiva 10x).

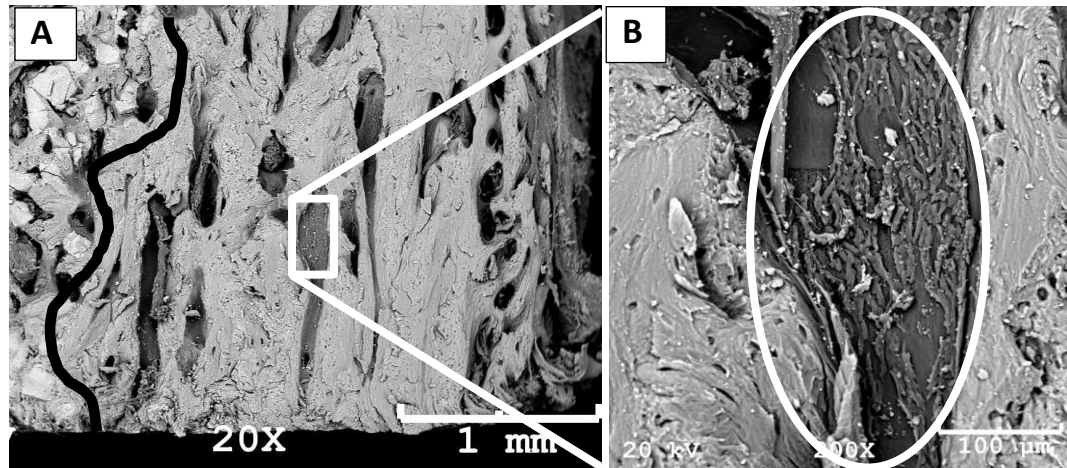


Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC – Lages.

5.2.7.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Aos 03 meses o bifásico HA/TCP- β 70/30 apresentou absorção dos biomaterias e substituição por tecido ósseo. Conforme mostra a figura 51 (A), a extensão de tecido ósseo formado é de aproximadamente 2 mm (à direita da linha preta). A região mais próxima do canal medular (à esquerda da linha preta) apresenta biomaterial residual envolto por osso neoformado. O osso formado apresenta-se compacto, com grande quantidade de osteócitos e algumas lacunas com osteoblastos em sua superfície (Figura 51 B).

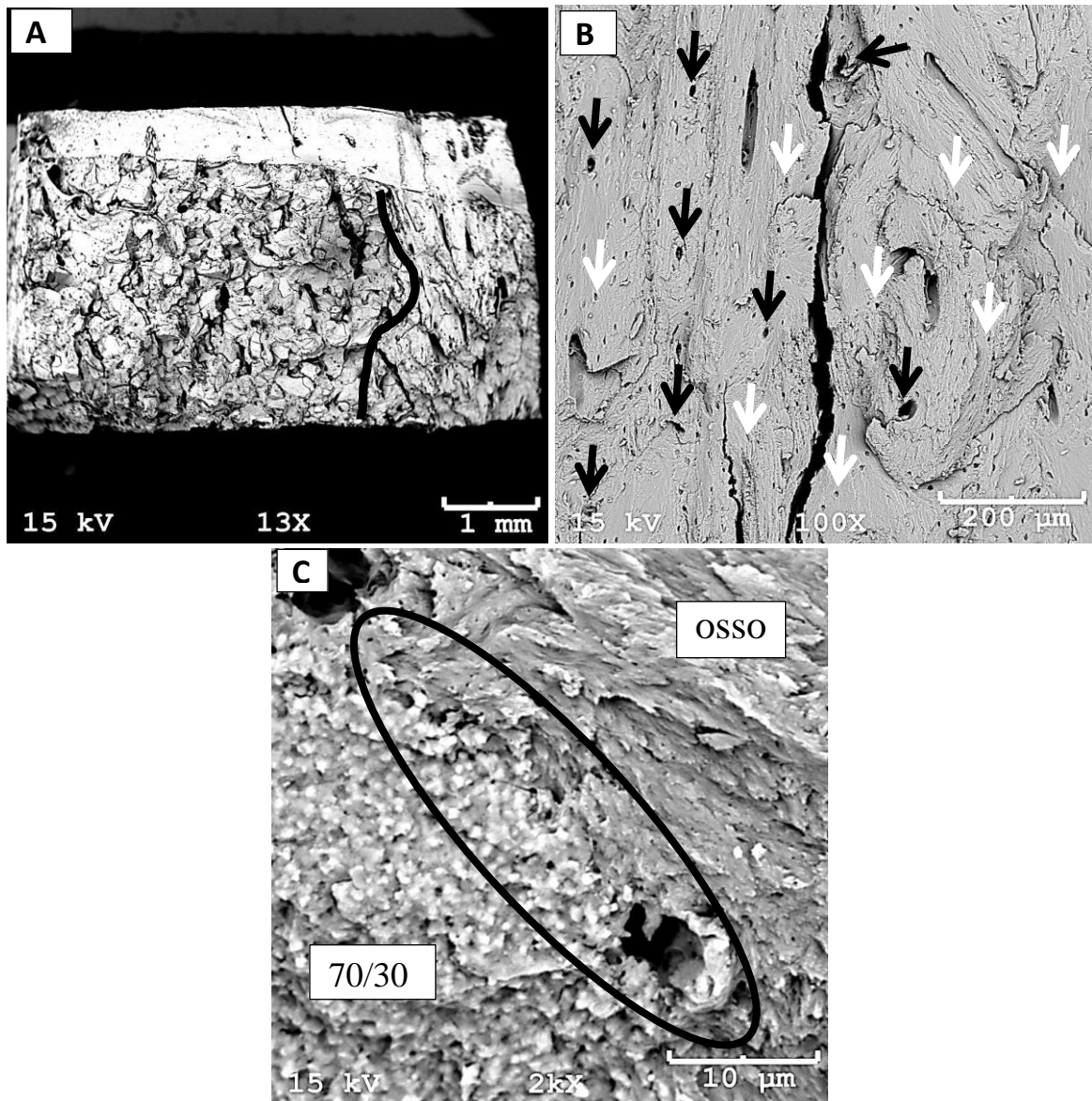
Figura 51 - Fotomicrografia de MEVs de osso de ovelha aos 03 meses com o bifásico HA/TCP- β 70/30. (A) À direita da linha preta região onde o biomaterial foi absorvido. À esquerda da linha preta o biomaterial remanescente envolto por osso neoformado. (B) Osteoblastos na superfície óssea (círculo).



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville

Ao contrário do que apresentou aos 03 meses, aos 06 meses não apresentou o menor desempenho em relação à absorção dos biomateriais e formação de tecido ósseo, sendo que a porção de biomaterial totalmente substituído por osso novo foi de pouco mais 1 mm de extensão (Figura 52 A). O restante do osso cortical apresentou grande quantidade de biomaterial remanescente. Embora a quantidade de osso formado indique ter sido menor, as suas características podem ser consideradas como de osso de boa qualidade, ou seja, osso denso, com a presença de osteócitos distribuídos em toda sua extensão, vasos sanguíneos e muitos osteoblastos localizados nas superfícies ósseas que ainda não tinham sido completamente preenchidas pelo osso novo. Da mesma forma que os outros biomateriais, também foi observada adesão perfeita entre osso e biomaterial, caracterizando a osteointegração deste bifásico (Figura 52).

Figura 52 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o bifásico HA/TCP- β 70/30. (A) À direita da linha preta pode se observar a área com mais de um milímetro de extensão onde o biomaterial foi totalmente absorvido e substituído por osso neoformado. À esquerda da linha preta observa-se biomaterial remanescente. (B) Osso compacto com osteócitos (setas brancas) e vasos sanguíneos (setas pretas). (C) Região de interface entre biomaterial e osso (círculo). Notar a perfeita adesão entre eles.

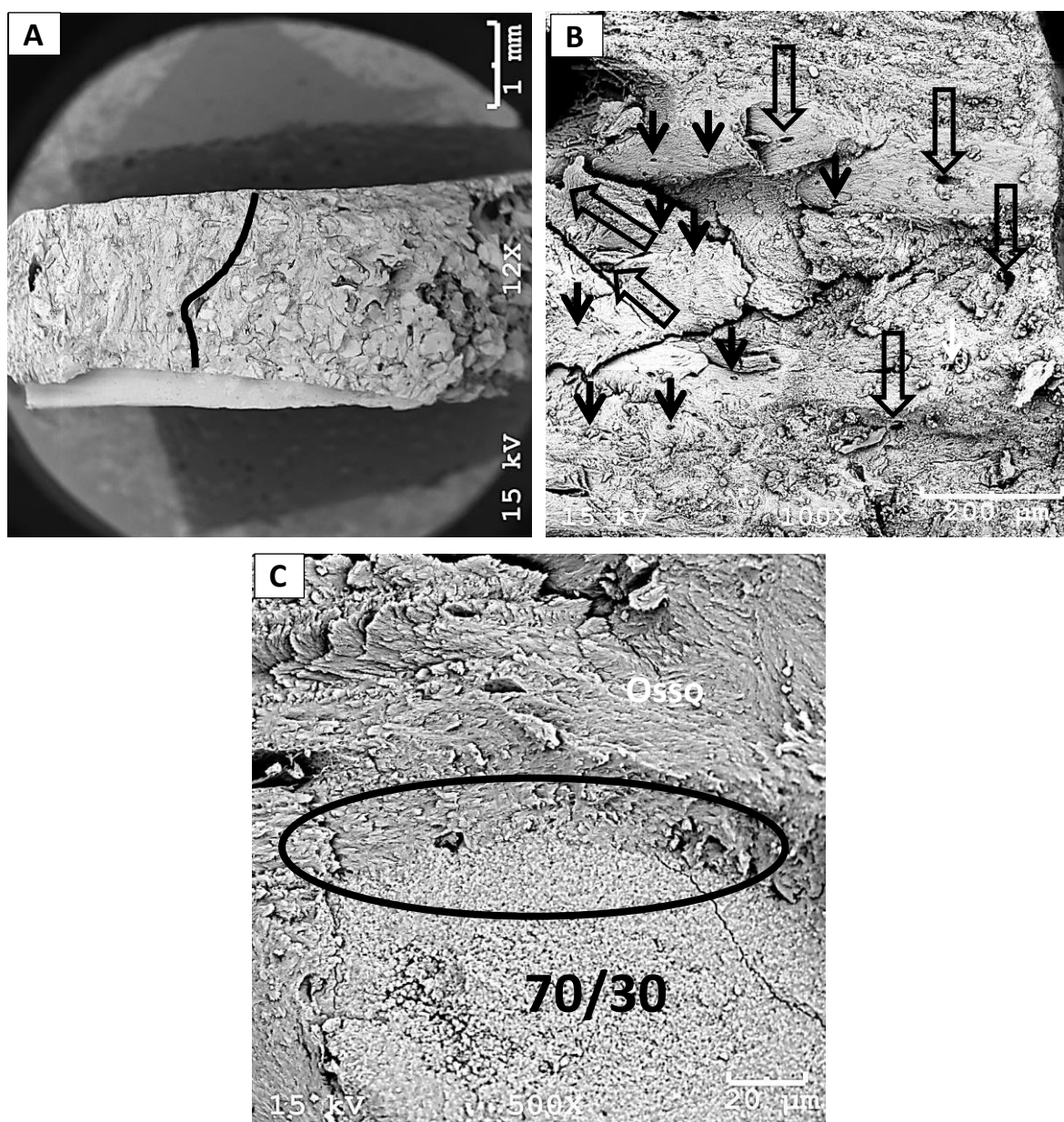


Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville

Na avaliação das MEVs aos 12 meses, pode se observar que a região cortical onde ocorreu a total absorção do biomaterial e a formação de osso novo, apresentou aproximadamente dois mm de extensão. Os biomateriais foram osteointegrados pelo osso novo (Figura 53 A).

O osso neoformado também apresentou morfologia de osso denso, com a presença de osteócitos e muitos vasos sanguíneos, demonstrando possuir características osteoindutoras, osteocondutoras e de estimular a angiogênese (Figura 53 B). Osteoblastos foram visibilizados em sua superfície o que revela grande capacidade para induzir a formação óssea. Ocorreu a perfeita adesão entre osso e o biomaterial demonstrando a qualidade da interface entre eles (Figura 53 C).

Figura 53 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 12 meses com o bifásico HA/TCP- β 70/30. (A) À esquerda da linha preta se observa área de osso cortical onde o biomaterial foi totalmente absorvido e substituído por osso novo. À direita da linha preta pode se observar o biomaterial remanescente osteointegrado pelo osso neoformado. (B) Osso de região cortical onde houve a substituição completa do biomaterial por osso. Notar a presença de osteócitos o que indica osso denso e maduro, (setas pretas) e orifícios correspondentes a vasos sanguíneos (setas vazadas). (C) MEV evidenciando a região de interface entre osso e biomaterial. Notar a perfeita adesão entre eles (círculo).



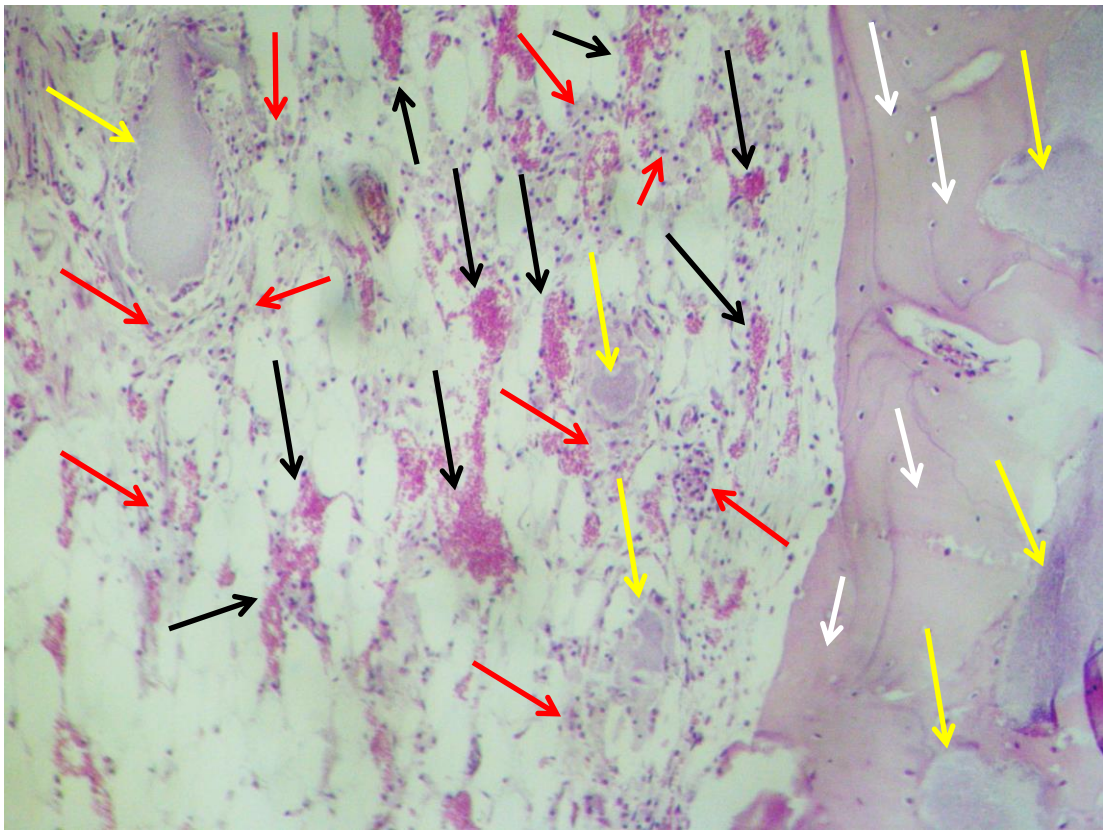
Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville.

5.2.8 Bifásico HA/TCP- β (30/70)

5.2.8.1 Avaliação Histológica

A avaliação do bifásico HA/TCP- β 30/70 aos 03 meses demonstrou boa cicatrização óssea com rápida substituição do biomaterial em região cortical, presença de tecido mielóide e células inflamatórias e de limpeza (Figura 54).

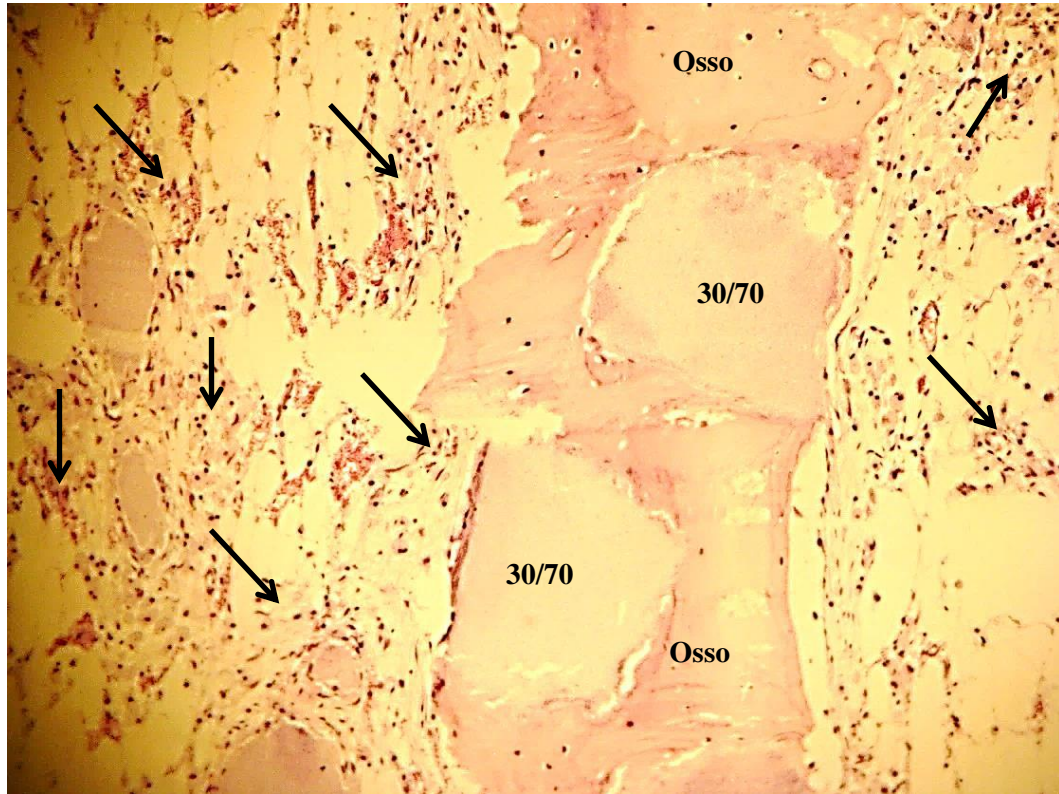
Figura 54 - Fotomicrografia de exame histológico de osso de ovelha aos 03 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 30/70. Observar osso cortical lamelar (setas brancas) com pequena presença de biomaterial (setas amarelas), tecido mielóide (setas pretas) e células inflamatórias e de limpeza distribuídas aleatoriamente (setas vermelhas) (H&E objetiva 4x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC - Lages.

Na avaliação aos 06 meses observou-se quantidade moderada de biomaterial mais próximo do canal medular, circundados por osteoclastos com o predomínio de macrófagos mononucleares com citoplasma amplo e vacuolizado e pequena quantidade de multinucleares. Também se observa a presença de osso primário (Figura 55).

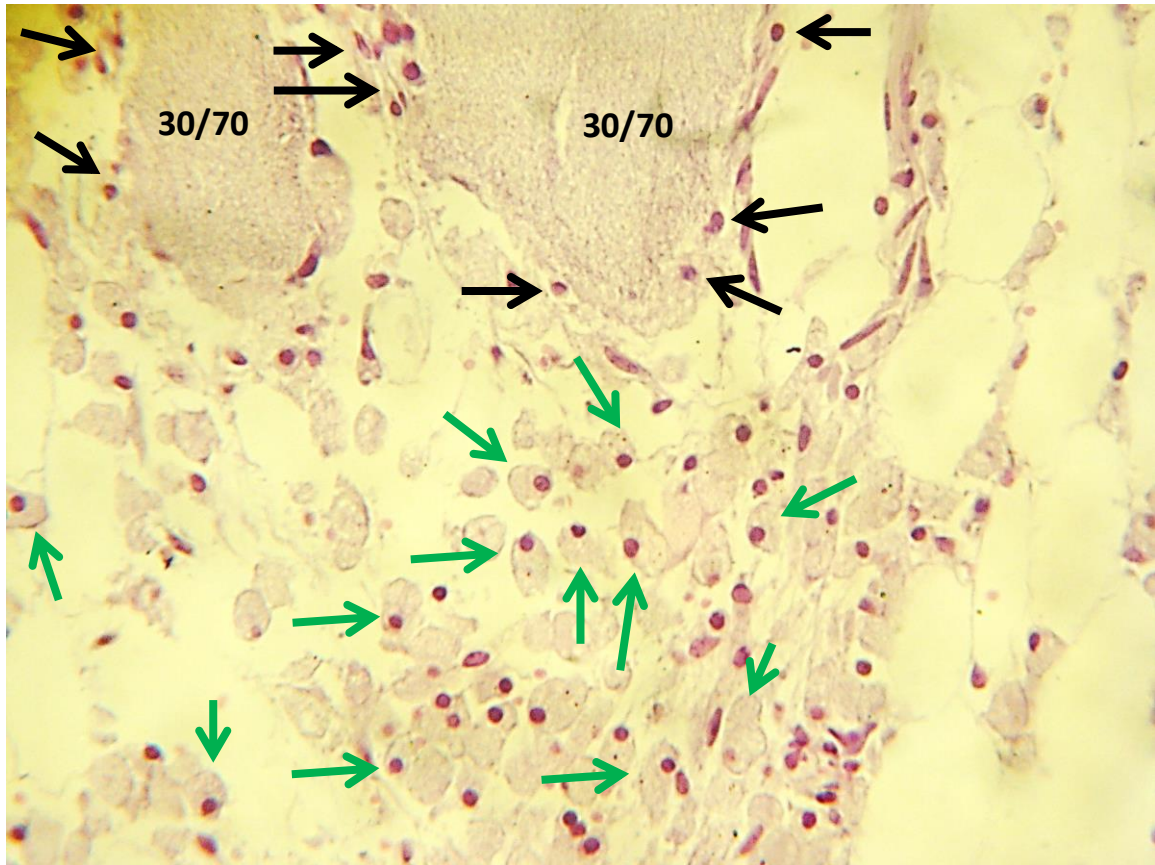
Figura 55 - Fotomicrografia de exame histológico de osso de ovelha aos 06 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 30/70. Biomaterial circundado por células de limpeza composta por macrófagos (setas). Predomínio de osso secundário (H&E. Objetiva 10x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC - Lages.

A figura 56 demonstra biomaterial remanescente com presença de macrófagos mononucleares com citoplasma vacuolizado como sinal de fagocitose dos biomateriais que estão sendo degradados e liberados no espaço extracelular. Também pode se observar a presença de osteoclastos na superfície dos biomateriais caracterizando a absorção deles.

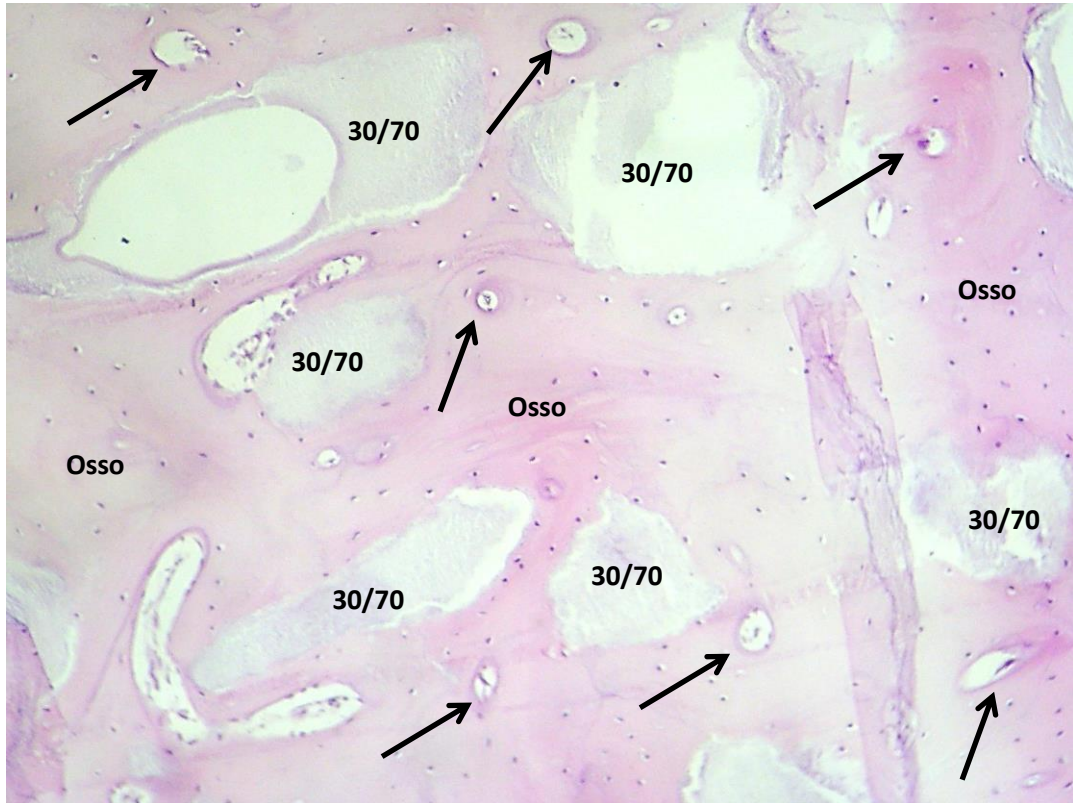
Figura 56 - Fotomicrografia de exame histológico de osso de ovelha aos 06 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 30/70. Notar a presença de macrófagos mononucleares com citoplasma vacuolizado e com a presença de grânulos de biomaterial no seu interior (setas verdes). Também pode se observar osteoclastos na superfície dos biomateriais (setas pretas) (H&E. Objetiva 40x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC - Lages.

Na avaliação aos 12 meses demonstrou presença de quantidade leve de biomaterial retido em osso compacto mais próximo do canal medular, com predomínio de osso lamelar (secundário), poucos osteoclastos e poucas células de limpeza (macrófagos) (Figura 57).

Figura 57 - Fotomicrografia de óptica de osso de ovelha aos 12 meses com o enxerto bifásico de HA/TCP- β 30/70. Notar a formação óssea com a presença de osteócitos distribuídos no seu interior (pontos pretos) e o biomaterial remanescente sendo absorvido. Presença de sistemas osteonais (setas) o que demonstra a formação óssea em curso (H&E. Objetiva 10x).



Fonte: Laboratório de Patologia Animal – UDESC - Lages.

5.2.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Na avaliação das MEVs o bifásico HA/TCP- β 30/70 apresentou cicatrização óssea com rápida substituição do biomaterial já aos 03 meses, a interface entre osso e biomaterial demonstra a adequada justaposição entre eles caracterizando a osteointegração.

A extensão de osso cortical que foi totalmente substituída por osso novo ficou em aproximadamente 2,85 mm correspondendo quase à extensão total do osso cortical (± 3 mm). O biomaterial remanescente encontrou-se totalmente envolvido por osso neoformado (Figura 58).

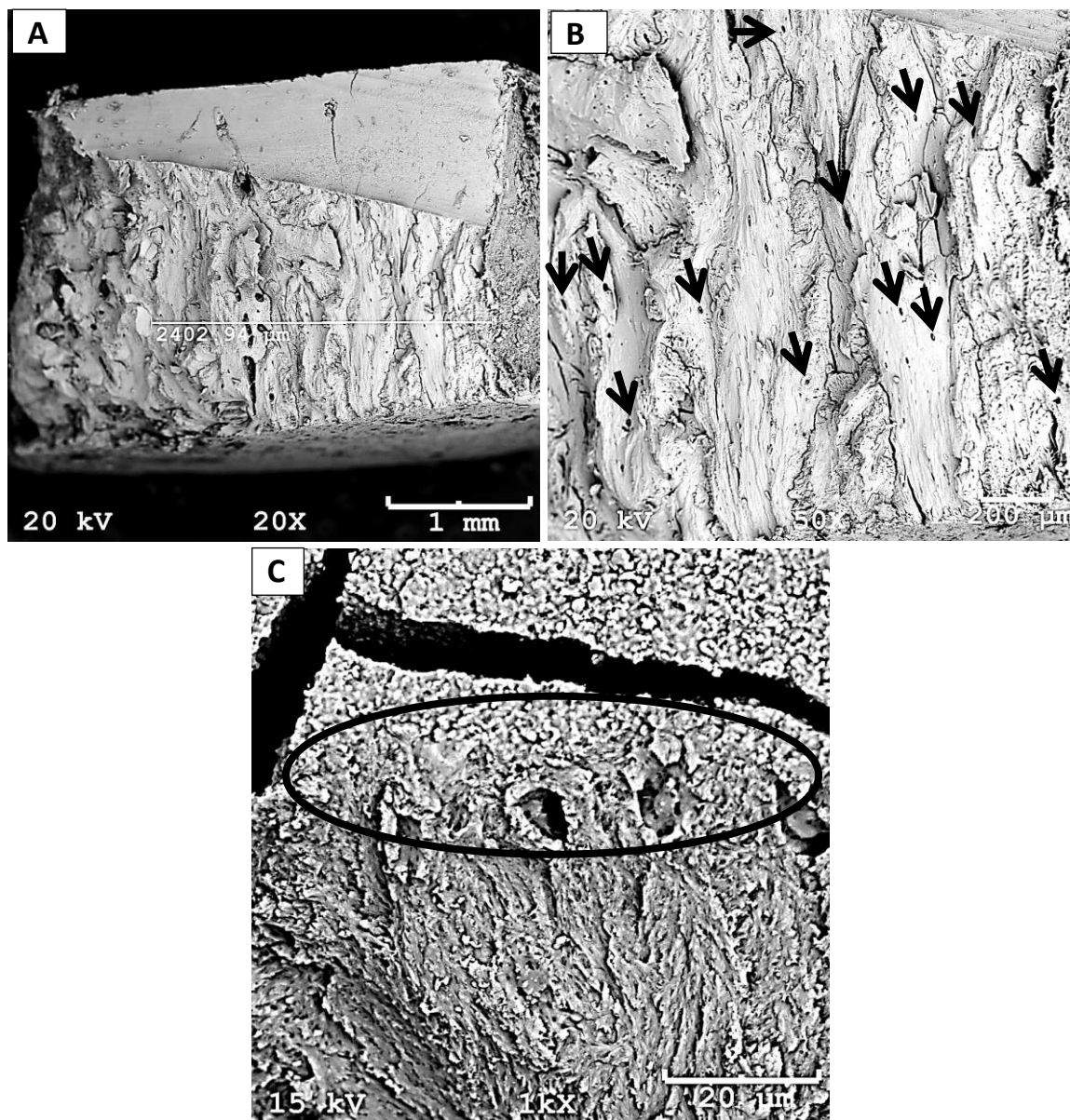
Figura 58 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 03 meses com o bifásico HA/TCP- β 30/70. Observar a porção do osso cortical onde o biomaterial foi absorvido e substituído por osso novo (linhas brancas). O restante da região cortical que ainda apresentou biomaterial remanescente esta representada pela linha preta. Notar que o biomaterial está envolto por osso neoformado.



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville

Aos 06 meses as análises das MEVs demonstraram produção de osso neoformado com a presença de pouco biomaterial remanescente (Figura 59 A), o que pode estar relacionado à fração de HA que está presente neste bifásico. A região onde o biomaterial foi todo absorvido apresenta osso denso, com osteócitos e vasos sanguíneos distribuídos por toda extensão do osso novo (Figura 59 B). Como aconteceu para os biomateriais analisados neste estudo a osteointegração foi considerada ótima, pois ocorreu perfeita justaposição entre osso e os grânulos de biomaterial (Figura 59 C).

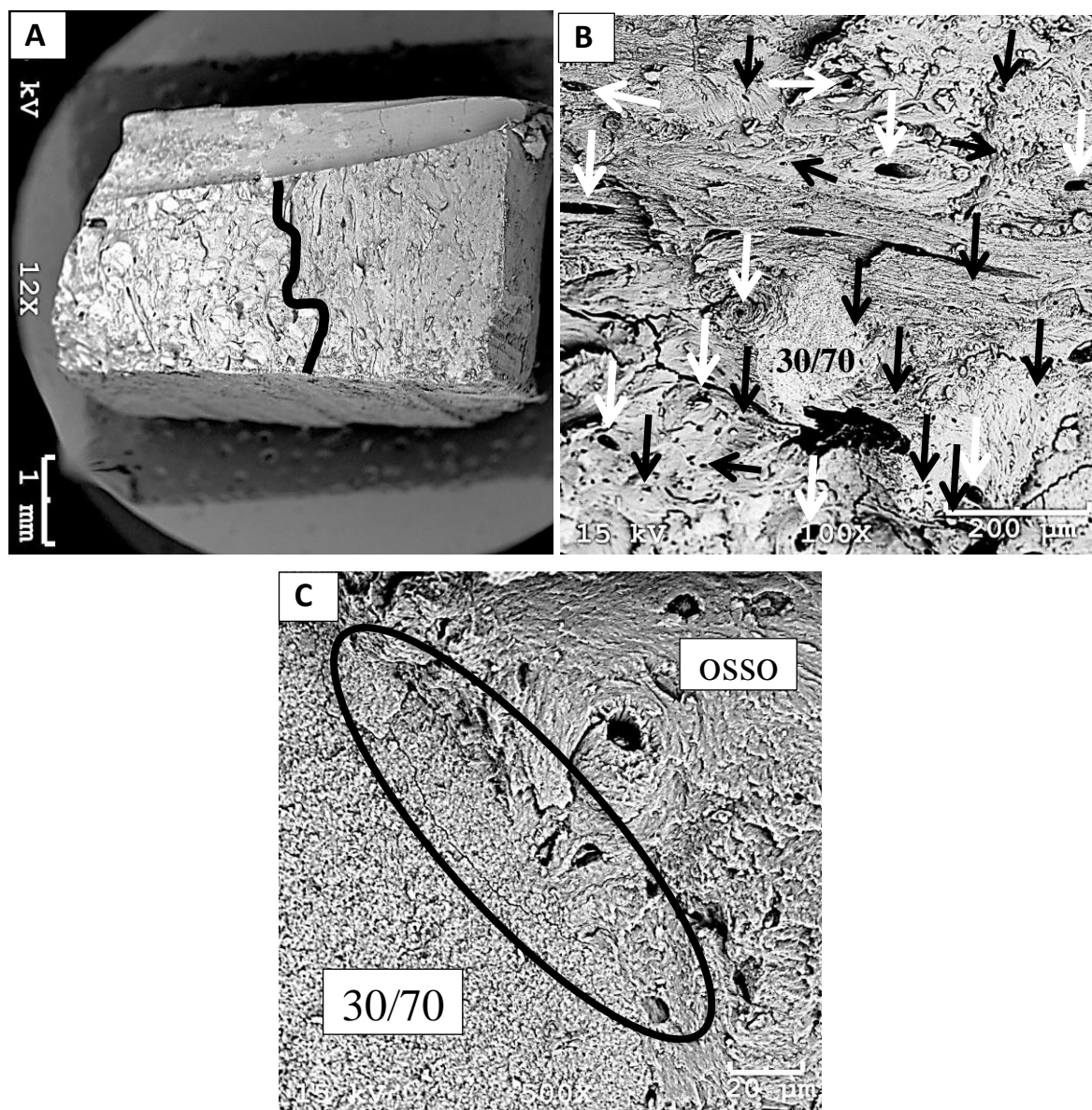
Figura 59 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 06 meses com o bifásico HA/TCP- β 30/70. (A) Região de osso cortical demonstrando extensão com osso neoformado (linha branca) e pouco biomaterial remanescente. (B) Osso compacto demonstrando orifícios correspondentes a vasos sanguíneos (setas). (C) Região de interface entre osso e biomaterial caracterizando a adesão entre eles (círculo).



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville.

Aos 12 meses a absorção do biomaterial e consequente formação de tecido ósseo novo foi de aproximadamente 2 mm (Figura 60 A), com a formação óssea forma densa, com grande quantidade de osteócitos e vasos sanguíneos, assim como foi observado para todos os biomateriais utilizados neste estudo (Figura 60 B). A justaposição entre o biomaterial e o osso novo permite caracterizar a osteointegração entre eles (Figura 60 C).

Figura 60 - Fotomicrografia de MEV de osso de ovelha aos 12 meses com o bifásico HA/TCP- β 30/70. (A) Região à direita da linha preta demonstra a porção de osso cortical em que o biomaterial foi absorvido e substituído por osso novo. À esquerda da linha preta biomaterial que não foi absorvido. (B) Osso cortical com o biomaterial remanescente. Notar a grande quantidade de vasos sanguíneos (setas brancas) e osteócitos (setas pretas) distribuídos por todo osso neoformado. (C) Região de interface entre osso novo e o biomaterial demonstrando a adesão entre eles (círculo).



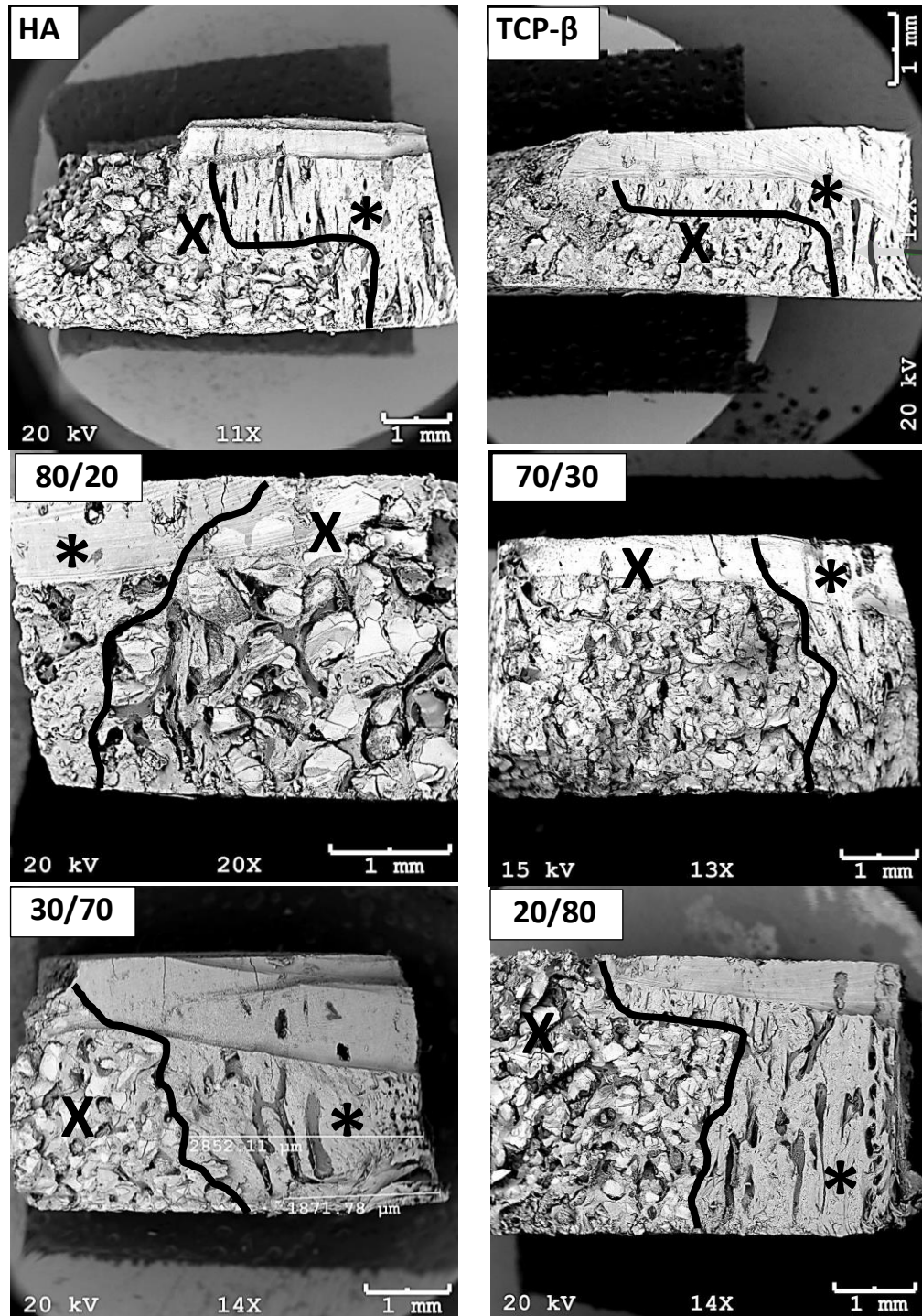
Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC - Joinville

De um modo geral, em todos os materiais, os grânulos dos enxertos foram bem integrados com vários graus de remodelação ativa ocorrendo nos períodos de 03, 06 e 12 meses. Todos os biomateriais foram absorvidos continuamente ao longo de todo o período do estudo, sendo que os que apresentaram melhor neoformação óssea foram HA/TCP- β 20/80 e o

HA/TCP- β 30/70, seguidos pelo TCP- β , HA/TCP- β 80/20, HA/TCP- β 70/30 e a HA, respectivamente. A análise das MEVs comparando-se os biomateriais entre si, dentro de cada grupo, permite relacionar a extensão de região cortical onde o biomaterial foi absorvido bem como a extensão de osso neoformado. As figuras 60, 61 e 62 demonstram essa relação entre absorção do biomaterial e neoformação óssea. Todas as amostras demonstraram completa cicatrização óssea, apresentando osso lamelar. Os bifásicos 20/80, 30/70 e o TCP- β puderam ser visibilizados somente aos 03 e 06 meses. Os bifásicos 70/30 e 80/20 e a HA ainda foram encontrados mesmo aos 12 meses, entretanto, esses biomateriais se apresentaram completamente integrados ao osso neoformado (Figura 63).

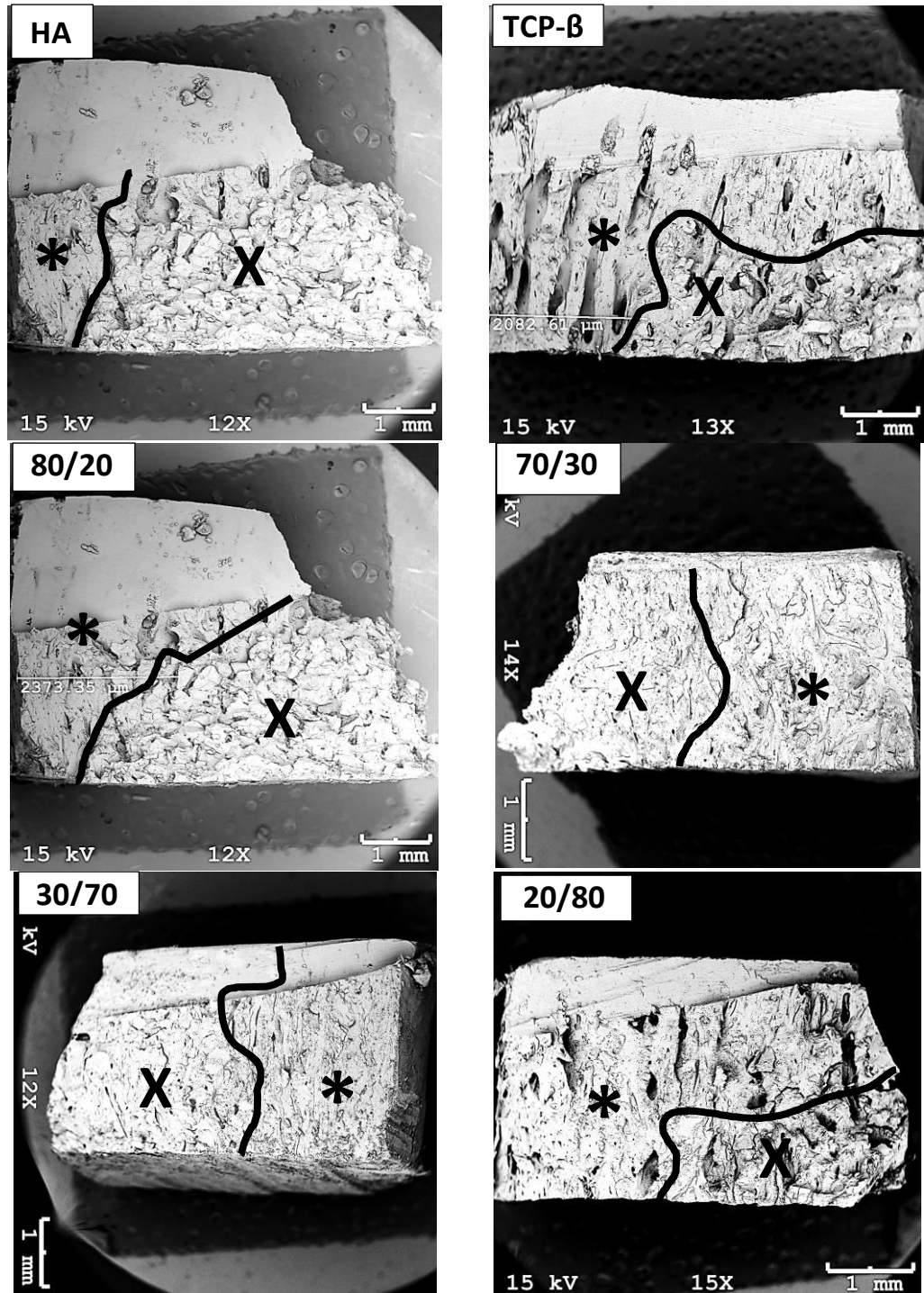
A avaliação dos biomateriais através da MEV possibilitou verificar a justaposição deles junto ao osso neoformado. Em todas as amostras e em todos os tempos avaliados foi possível verificar a justaposição na interface entre os biomateriais e o osso novo (Figura 64).

Figura 61 - Fotomicrografia de MEV dos biomateriais aos 03 meses de pós-operatório, demonstrando a relação entre a neoformação óssea e os biomateriais remanescentes. Nesse período de avaliação os bifásicos 30/70 e 20/80 foram os que demonstraram melhor neoformação óssea e osteointegração do biomaterial pelo novo tecido ósseo formado e consequentemente maior formação de osso * = osso neoformado X = biomaterial remanescente.



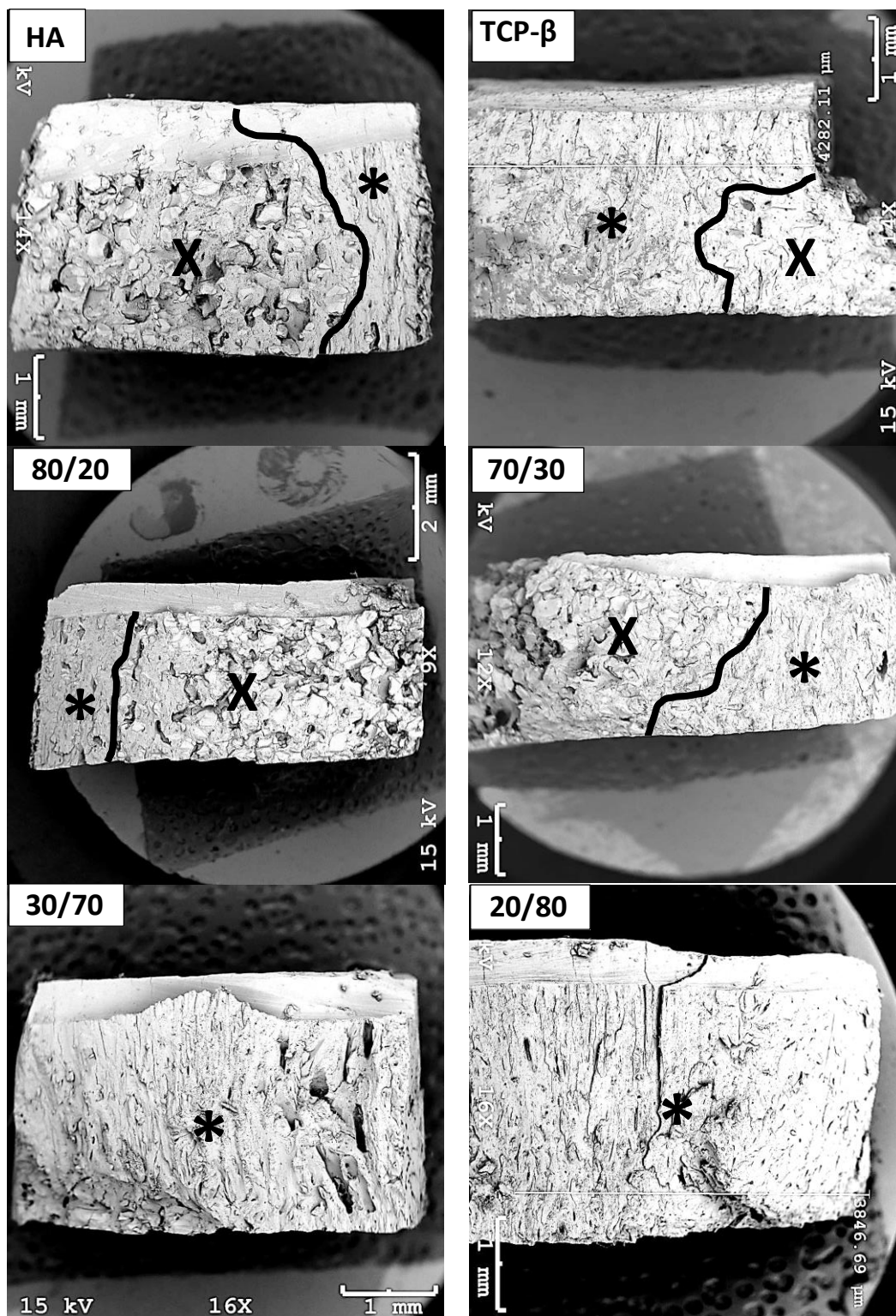
Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville

Figura 62 - Fotomicrografia de MEV dos biomateriais aos 06 meses de pós-operatório, demonstrando a relação entre a neoformação óssea e o biomaterial remanescente. Nesse período de avaliação os bifásicos 30/70 e 20/80 foram os que demonstraram melhor neoformação óssea e osteointegração do biomaterial pelo novo tecido ósseo formado e consequentemente maior formação de osso * = osso neoformado X = biomaterial remanescente.



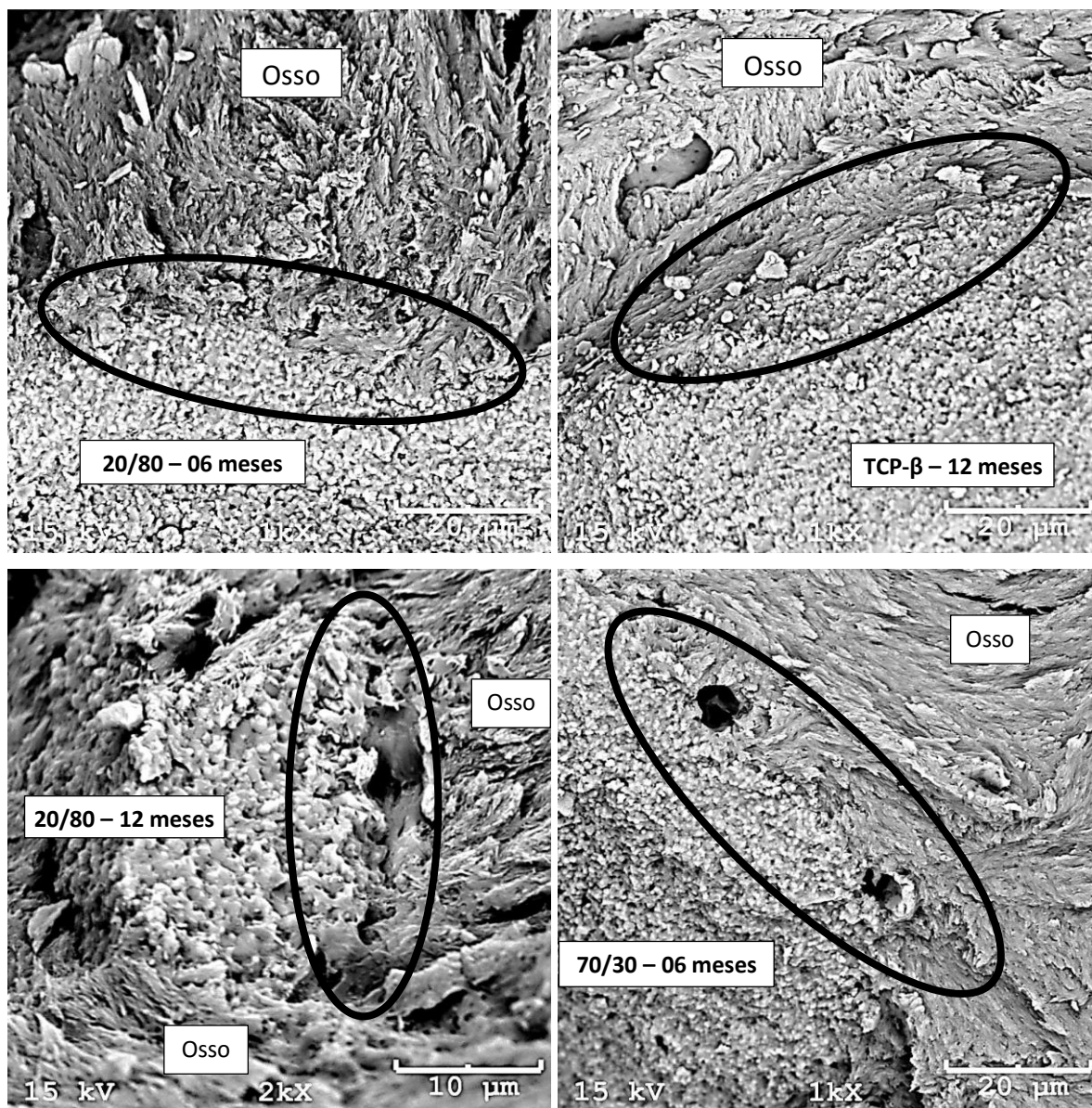
Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville

Figura 63 - Fotomicrografia de MEV dos biomateriais aos 12 meses de pós-operatório, demonstrando a relação entre a neoformação óssea e o biomaterial remanescente. Nesse período de avaliação os bifásicos 30/70 e 20/80 foram os que demonstraram melhor neoformação óssea e osteointegração do biomaterial pelo novo tecido ósseo formado e consequentemente maior formação de osso * = osso neoformado X = biomaterial remanescente.



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville.

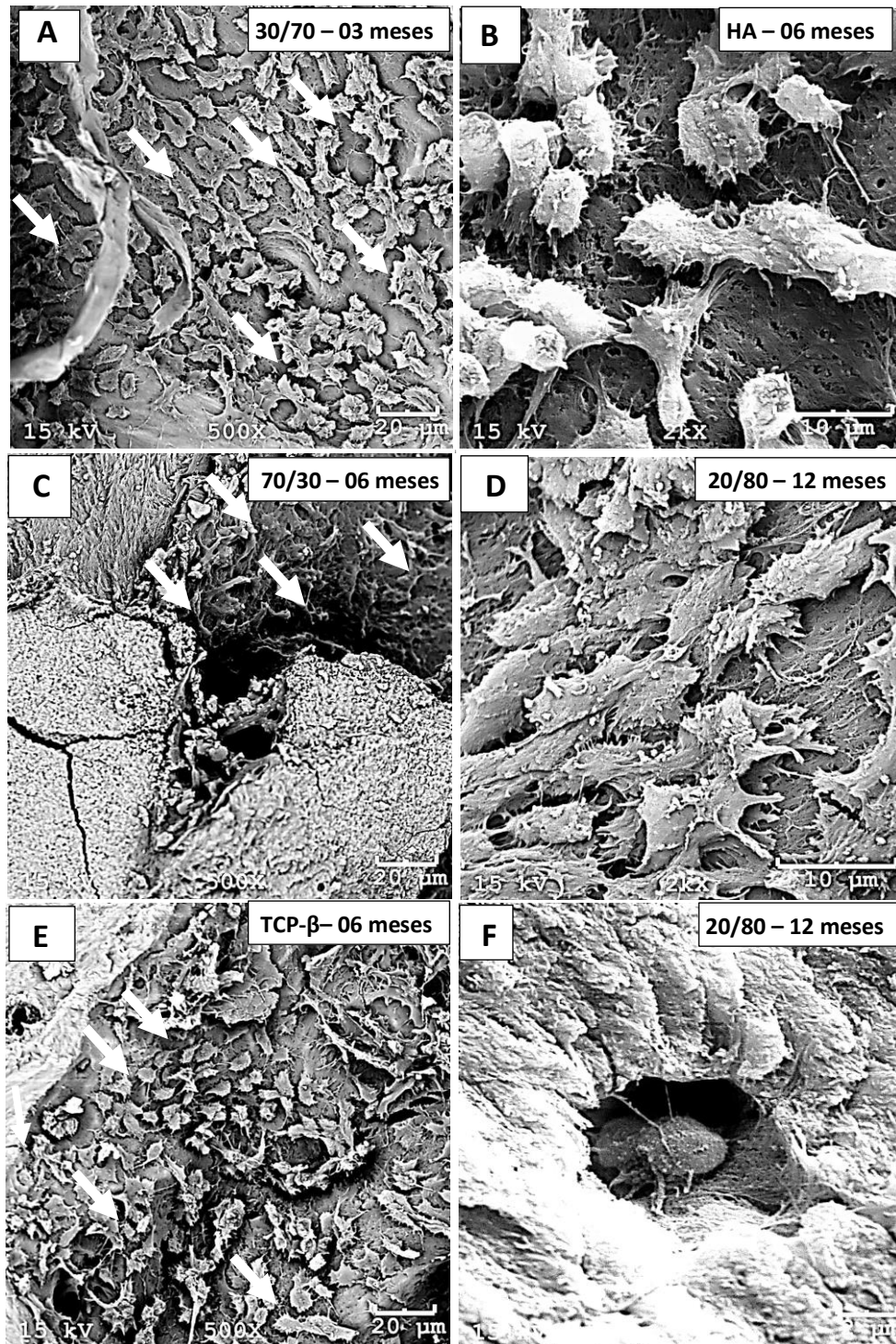
Figura 64 - Fotomicrografias de MEV de biomateriais enxertados em tíbias de ovelhas evidenciando a interface entre o biomaterial e o osso neoformado em quatro tipos de biomateriais (círculos). Notar que em todas elas existe uma estreita adesão entre osso e biomaterial.



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC – Joinville

Foi possível observar também, através das avaliações das MEVs, que todos os biomateriais aos 03, 06 e 12 meses revelaram grande quantidade de osteoblastos sobre as suas superfícies (Figura 64 A, C e E). Esses osteoblastos apresentaram grande quantidade de projeções citoplasmáticas denominadas de filapodia (Figura 64 B, D e F).

Figura 65 - Fotomicrografias de MEV demonstrando grande quantidade de osteoblastos na superfície óssea de tíbias de ovelhas de diferentes grupos. (A) Bifásico HA/TCP- β 30/70 03 meses (setas), (C) Bifásico HA/TCP- β 70/30 06 meses (setas) e (E) TCP- β 06 meses (setas). (B) HA 06 meses, (D) Bifásico HA/TCP- β 20/80 12 meses e (F) Bifásico HA/TCP- β 20/80 12 meses evidenciando osteoblastos com grande quantidade de projeções citoplasmáticas (filapodia). Em (F) detalhe do osteoblasto totalmente envolto por osso neoformado, momentos antes de se tornar um osteócito.



Fonte: Grupo de pesquisa em Biomateriais – UDESC - Joinville

DISCUSSÃO

O primeiro animal utilizado neste estudo apresentou déficits neurológicos condizentes com lesão de medula devido à punção no momento de se realizar a anestesia subaracnoidea. Este animal foi mantido até o período 03 meses e as avaliações radiográficas, histológicas e de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas normalmente, sendo que não apresentaram diferença quando comparadas com os outros animais do mesmo tempo de avaliação. Segundo Rocha et al. (2014) os hematomas epidurais da coluna vertebral (HECV) embora sejam uma complicação rara, podem provocar consequências neurológicas graves e permanentes e considera que a recuperação neurológica após HECV dependerá tanto da magnitude como da duração da compressão. Delamarter et al. (2012) em estudo com cães demonstraram que quando a compressão tem uma duração igual ou superior a 6 horas, a recuperação neurológica não se verifica com o agravante de necrose progressiva da medula. Vale (2012) ainda citou que podem ocorrer complicações neurológicas como cefaleia pós-punção da dura-máter, síndrome da cauda equina e paraplegia.

Nuss et al. (2006) relataram em seu estudo fraturas cominutivas no úmero ($n = 1$) e fêmur ($n = 3$) dentro dos três primeiros dias de pós-operatório. Theiss et al. (2005) em estudo com ovelhas, descreveram que os animais foram colocados em um dispositivo que as mantinham suspensas por 4 semanas após a cirurgia, também com o objetivo de se realizar a recuperação supervisionada e evitar fraturas espontâneas. No presente estudo, a adoção das calhas modificadas de Robert Jones se mostrou efetiva, pois nenhum animal apresentou fratura durante a recuperação em todos os tempos de avaliação de pós-operatório.

Mesmo os mecanismos de degradação celular locais podem ser diferentes em tecido mole e ósseo, uma vez que os osteoclastos frequentemente envolvidos em materiais sintéticos à base de hidroxiapatita estão presentes apenas no osso, mas não em região subcutânea ou tecidos musculares. No entanto, mais animais por estudo podem ser necessários devido ao tamanho dos animais e espaço anatômico reduzido. Os resultados positivos em roedores podem ter de ser repetidos e verificados nas espécies maiores antes de ensaios clínicos em humanos. Por causa das semelhanças com o metabolismo ósseo humano, os resultados em ovelhas podem ser transportados com mais autoridade, do que os obtidos com esses pequenos animais de laboratório (NUSS et al. 2006; WILLIE et al. 2004).

As ovelhas utilizadas como modelo experimental neste estudo foram consideradas apropriadas para a realização de orifícios assim como foi testado e aprovado em outros estudos (THEISS et al. 2005; WILLIE et al. 2004).

Os tempos de avaliação utilizados para este estudo foram de 03, 06 e 12 meses, contemplando tanto as fases iniciais quanto as fases mais tardias da cicatrização e remodelação óssea e teve grande importância para poder avaliar o comportamento dos biomateriais em longo prazo, conforme citaram Bernstein et al. (2013). O espaço de tempo até 12 meses mostrou-se adequado para este tamanho de defeito (06 mm), uma vez que todos os biomateriais testados foram absorvidos e substituídos por osso novo em até pelo menos três milímetros de espessura, o que corresponde à espessura do osso cortical onde foram realizadas as osteotomias.

Da mesma forma como citados pelos autores acima, o presente estudo avaliou os resultados da neoformação óssea e absorção dos biomateriais HA e TCP- β puros e de quatro bifásicos de HA/TCP- β em diferentes proporções: 70/30, 30/70, 80/20 e 20/80.

Neste estudo todos os biomateriais utilizados apresentaram uma morfologia de poros entre 200 e 500 μm , o que segundo Bohner; Baumgart, (2004), são classificados como poros de tamanho ideal para o bom desempenho das características de fixação, diferenciação e crescimento de osteoblastos e vascularização. Esses autores desenvolveram um modelo teórico da relação entre a taxa de reabsorção e tamanho do poro de fosfato de cálcio utilizado para substituição óssea. Eles chegaram à conclusão que o fosfato de cálcio microporoso impediu a penetração de células de absorção e de vasos sanguíneos no interior do implante. Isso também foi confirmado por Mayr et al. (2015) que utilizaram TCP- β com microporos de aproximadamente 5,39 (\pm 1,33 μm) onde a reabsorção do biomaterial ocorreu exclusivamente em sua superfície.

O osso é um tecido mineralizado que depende muito da presença de um suprimento de sangue interno. Qualquer formação óssea nova ou reparação deve ser sempre precedida pela formação de uma rede vascular que é fortemente influenciada pelo grau de interconexão estrutural entre poros (HING et al. 2005). No presente estudo, nos exames histológicos e de MEV foram encontrados vasos sanguíneos de vários calibres tanto no osso neoformado como na interface entre ele e os grânulos de biomaterial, assim como citado por Levengood et al. (2013). Conforme esses autores, os vasos sanguíneos são essenciais para a viabilidade dos tecidos e consequente formação óssea e que a remodelação não é possível sem mecanismos estáveis de nutrição e retirada de resíduos.

No presente estudo os biomateriais utilizados não apresentaram citotoxicidade, demonstraram capacidade de osteoindução, osteocondução, osteointegração e biocompatibilidade, demonstrado pela grande proliferação celular (osteoblastos) na superfície

óssea e dos implantes. Estes achados confirmam a biocompatibilidade dos biomateriais utilizados e estão em acordo com outros estudos realizados por outros autores com a utilização intramuscular e intraóssea de biocerâmicas bifásicas e TCP- β (GHANAATI et al. 2012; HONG et al. 2010; JENSEN et al. 2007; KUNERT-KEIL et al. 2014; SAGER et al. 2012).

O sucesso da utilização de biomateriais não depende somente da composição química do biomaterial, mas também da sua superfície e as características de degradação, pureza e tamanho de grão ou da partícula (GHANAATI et al. 2012; HEMERT et al. 2004; LIM et al. 2015; LOBO; ARINZEH, 2010). Tendo em mente que diferentes materiais possuem diferentes características de superfície, a influência delas na reação tecidual para o acúmulo inicial de camadas de proteína pode ser alegada. As diferentes características de superfície da HA e o TCP que são causadas por disparidades nas composições químicas das superfícies e na formação dos fosfatos de cálcio, podem explicar os diferentes padrões de reações teciduais e respostas inflamatórias deles (GHANAATI et al. 2012). Assim, as reações teciduais observadas em todos os grupos do presente estudo e a variação entre eles podem ser devido às diferenças nas composições químicas e na relação HA/TCP, principalmente porque estes foram os únicos parâmetros que variaram entre os diferentes biomateriais utilizados.

A remodelação óssea é um processo fisiológico firmemente ligado à absorção osteoclástica inicial, seguido de formação óssea pelos osteoblastos. A absorção osteoclástica de substituto ósseo é processo importante, uma vez que vai levar ao recrutamento de osteoblastos e substituição de enxerto ósseo por osso novo (HEMERT et al. 2004). No presente estudo, as imagens obtidas através da MEV demonstraram a presença de osteoblastos nas superfícies ósseas de todos os biomateriais, indicando intensa atividade dessas células para todos eles. Segundo Albrektsson; Johansson, (2001), Kunert-Keil et al. (2014) e Lim et al. (2015), a presença dessas células denota característica osteocondutiva, pois possibilita que as células se fixem na superfície óssea e dos biomateriais. Essa característica é altamente desejável em um biomaterial, pois está diretamente relacionada à produção óssea. Portanto, no presente estudo, devido a presença dessas células sobre a superfície dos biomateriais pode se afirmar que todos eles apresentam grande capacidade osteocondutiva.

Lim et al. (2015) relataram em seu estudo que o bifásico HA/TCP- β 30/70 apresentou osteoblastos com grande quantidade de filapodia dentro das partículas do biomaterial. Segundo Hong et al. (2010) a apresentação de osteoblastos com abundante projeções citoplasmáticas (filapodia) na superfície das biocerâmicas sugere que elas tem bioatividade mais elevada, porque apenas quando a superfície é favorável para o crescimento

celular, os osteoblastos podem demonstrar suas projeções. Neste estudo todos os biomateriais apresentaram grande quantidade de osteoblastos com muitas projeções citoplasmáticas (filapodia) caracterizando que eles apresentam propriedades bioativas elevadas.

Assim como observado por Kunert-Keil et al. (2014) em seu estudo avaliando TCP- β e HA/TCP- β 60/40 em calvária de coelhos, osteoclastos e osteoblastos foram observados na superfície de todos os biomateriais até o final do período de avaliação, como um sinal de remodelação em curso. No presente estudo ao fim de 12 meses alguns biomateriais ainda foram visíveis, mas a formação de osso novo prevaleceu na área do defeito assim como citado por Pol et al. (2010).

Dentre os biomateriais avaliados neste estudo o TCP- β é o biomaterial que apresenta característica de solubilidade superior, no entanto, não foi o que apresentou melhor desempenho em relação à absorção e neoformação óssea aos 03 meses, no entanto, aos 12 meses, toda a extensão da região cortical foi substituída por osso neoformado, sendo encontrado biomaterial remanescente apenas em região de canal medular.

Levengood et al. (2013) também encontraram resultados semelhantes em seu estudo com HA, TCP- β , HA/TCP- β 75/25 e HA/TCP- β 25/75. Segundo esses autores o bifásico 25/75 foi o que apresentou melhor resultados dentre todos. Eles sugerem que a superfície do bifásico permite aos osteoclastos agirem de forma mais natural do que a HA ou o TCP- β puros. Esses autores ainda sugerem que os bifásicos podem coexistir com o tecido ósseo vivo sofrendo ações naturais durante o processo de remodelação óssea.

Assim como descrito por outros autores (HEMERT et al. 2004; HONG et al. 2010; POL et al. 2010; SAHITHI et al. 2010; SAIZ et al. 2013; SANTOS et al. 2012; WANG et al. 2007) no presente estudo os biomateriais também serviram de suporte para a formação de novo tecido ósseo, ou seja, as células foram guiadas pelo biomaterial para gerar novo tecido ósseo.

Dórea Neto et al. (2007) descreveram que grânulos de hidroxiapatita podem migrar para fora do seu lugar de implantação e causar reação tecidual adversa nos tecidos moles adjacentes. Arx et al. (2001), Brogгинi et al. (2015), Dahlin et al. (2015), Jensen et al. (2007) e Jensen et al. (2008) em seus estudos com mandíbulas de porcos, utilizaram membranas de politetrafluoretileno (PTTE) e constataram que ela foi efetiva para evitar a saída dos grânulos de biomaterial dos orifícios elaborados e também evitar a reação tecidual nos tecidos moles adjacentes. No presente estudo não foram observadas reações periosteais e de tecidos moles adjacentes nos orifícios onde foram implantados os biomateriais. Todos os orifícios com os

implantes foram recobertos com o periósteo do próprio animal no momento de se realizar a síntese da incisão cirúrgica. Assim como citado pelos autores acima que utilizaram membrana sintética de PTTE, a utilização do periósteo foi efetivo em evitar a saída dos biomateriais e consequentemente reações periosteais indesejáveis.

Os materiais bioativos não devem só ter boa biocompatibilidade, mas também devem unir-se quimicamente com o osso de modo a formar uma interface osso-biomaterial forte. Ao mesmo tempo, os materiais bioativos devem estimular a formação de tecido ósseo (HONG et al. 2010). Para revelar a verdadeira integridade do contato entre osso-biomaterial, os cortes histológicos devem ser muito finos (da ordem de 10 a 20 μm) para realmente poder revelar a osteointegração. Secções mais grossas têm um efeito de sombra, que tornam impossível afirmar ou não se o contato ósseo direto foi alcançado (ALBREKTSSON; JOHANSSON 2001). No presente estudo os cortes histológicos foram realizados com espessura de 4 a 6 μm . Na busca de uma análise mais detalhada e avaliando também a topografia tanto da biocerâmica como do osso neoformado em aumentos que chegaram a 10.000 vezes, foi possível também confirmar através da MEV esse bom comportamento dos biomateriais, ou seja, perfeita justaposição entre osso neoformado e os biomateriais.

Todos os implantes estavam ligados diretamente ao osso apresentando formação de osso novo sobre as superfícies dos macroporos para todos os implantes, as células inflamatórias foram observadas muito raramente, e sua presença foi relacionado ao processo de cicatrização, assim como relatado por Doernberg et al. (2006) e Theiss et al. (2005).

Todos os biomateriais utilizados neste estudo apresentaram um vínculo forte e direto entre o osso e o material em todas as regiões onde foram colocados os enxertos, diferente do que encontraram Yang et al. (2014), onde essa perfeita coaptação foi encontrada especialmente na margem do defeito. Ainda segundo esses autores, a habilidade para formar osso entre os tecidos e o material, o que resulta numa interface única e forte, é uma característica especial de materiais bioativos. Dessa forma as análises histológicas e de MEV deste estudo possibilitaram verificar que todos os biomateriais remanescentes se encontraram totalmente osteointegrados pelo osso neoformado, demonstrando a osteointegração.

O autoenxerto resultou em rápida formação óssea e aumento da maturidade óssea aos três meses, como reportado por Jensen et al, (2007). Com o transplante de osso autólogo, ambas as células osteogênicas e moléculas osteoindutivas são trazidas até a área receptora, o que não acontece quando se utiliza enxertos como substitutivos ósseos (JENSEN et al. 2007; MAYR et al. 2015).

Stein et al. (2009) compararam a percentagem de neoformação óssea promovida pelo enxerto ósseo autógeno e de três diferentes biomateriais, entre eles a hidroxiapatita (HA) e hidroxiapatita associada ao fosfato de cálcio- β (HA + TCP- β) e verificaram que o osso autógeno apresentou percentagem de neoformação óssea muito superior à dos substitutos ósseos testados. Como era de se esperar, no presente estudo, o grupo controle também apresentou cicatrização e incorporação do segmento ósseo muito mais rapidamente que os biomateriais avaliados, sendo que já aos três meses todos os segmentos de osteotomia se apresentaram completamente cicatrizados e apresentando características de osso maduro. No entanto, como já comentado anteriormente, o autoenxerto possui algumas desvantagens, como volume e forma limitados das áreas doadoras, o defeito gerado na extração do enxerto e o pós-operatório desta área, que normalmente apresenta maiores complicações, como infecção, dor e hematomas, do que a área receptora (BOSTROM; SEIGERMAN, 2005; BURG et al. 2000; LIM et al. 2015).

O osso recém-formado pode ser distinguido por apresentar maior densidade, ou seja, mais células por unidade de área que o osso maduro. Outra característica, é que o osso imaturo não tem aparência lamelar organizada e com base na disposição das fibras colágenas, tal, osso é denominado osso não lamelar, podendo ser denominado também osso fasciculado entrelaçado, devido ao entrelaçamento das fibras colágenas (ROSS; ROWRELL, 1993). As análises histológicas para todas as amostras demonstraram que todos os biomateriais oferecerem condições para o desenvolvimento de osso novo e que eles foram integrados dentro do leito de implantação sem induzirem severa reação inflamatória e de corpo estranho. Três animais (de quatro) aos 03 meses para o bifásico 70/30 apresentaram formação de tecido fibroso de forma acentuada. Todos os outros animais do estudo apresentaram tecido fibroso de forma leve, sendo que isto pode ser caracterizado com reação inflamatória normal em resposta ao procedimento cirúrgico, conforme citado por Doernberg et al. (2006) e Theiss et al. (2005).

No estudo em questão a taxa de neoformação óssea correu em paralelo com a degradação dos biomateriais, os osteoclastos foram encontrados em todos os tempos de avaliação e estas células estavam envolvidas na degradação dos biomateriais, assim como relatado por Bernstein et al. (2013) em seu estudo com TCP em articulação de joelho de ovelhas, por um período de 52 semanas. Ao fim do período experimental (12 meses) poucos osteoclastos foram encontrados e de uma forma geral toda atividade celular se mostrou reduzida em função da fase final de cicatrização e absorção dos biomateriais. É razoável supor

que a estagnação da formação óssea pode diminuir a absorção de cerâmica porque ativação de osteoclastos é mediada por células da linhagem dos osteoblastos (SPALTHOFF et al. 2015). Os poucos biomateriais remanescentes que ainda foram visibilizados se encontravam fortemente integrados ao novo tecido ósseo formado. Contudo, essa osteointegração não interfere com a progressão da degradação dos biomateriais (CHENG et al. 2013).

Segundo Jensen et al. (2007) em seu estudo, embora nenhuma diferença possa ser demonstrada com relação à taxa de degradação entre HA e HA/TCP, a formação óssea foi mais rápida com HA/TCP, o que sugere que o TCP contido no bifásico HA/TCP teve algum efeito sobre os eventos da cicatrização. Isso também pode ser observado no presente estudo quando comparamos os bifásicos 30/70 e 20/80 com os bifásicos 70/30 e 80/20 e eles comparados com a HA pura.

Arinze et al. (2005) em seu estudo, avaliaram biomateriais em várias proporções, HA 100%, TCP 100%, HA/TCP (76/24, 63/37, 56/44 e 20/80), com porosidade de 60-70% e tamanho de poros entre 300-600 μm . Esses autores chegaram à conclusão que a HA e o TCP 100% tiveram menor taxa de formação óssea (com 12 semanas), enquanto que o bifásico 20/80 foi o que mostrou formação óssea mais rápida (06 semanas) e maior formação óssea no final do estudo (12 semanas), entre todos os biomateriais avaliados. Da mesma forma que encontrado pelos autores citados acima, no estudo em questão, os biomateriais que apresentaram melhor desempenho na formação óssea foram os bifásicos HA/TCP- β 20/80 seguido pelo HA/TCP- β 30/70.

Em conformidade com estudos anteriores, a alta concentração de TCP nos fosfatos de cálcio bifásicos parece ter um impacto direto sobre a quantidade de formação óssea quando as altas (20/80) e baixas (80/20 e 60/40) concentrações de TCP foram comparadas. Foi previamente mostrado que a dissolução superficial do TCP nos cristais de apatita do bifásico favorece a reprecipitação de uma camada biológica de apatita sobre a superfície do biomaterial, que por sua vez facilita a osteocondução e a formação de osso (JENSEN et al. 2008).

No presente estudo, a avaliação das MEVs mostrou que todos os biomateriais apresentaram absorção progressiva durante o período de avaliação, no entanto, foram encontradas diferenças na quantidade de biomaterial absorvido e de osso neoformado dentro de cada grupo durante os três períodos de avaliação.

Aos 03 meses, a neoformação óssea em geral aumentou em todas as amostras, com quantidade maior para os bifásicos 30/70 e 20/80 respectivamente. A HA e os bifásicos 80/20 e 70/30 apresentaram praticamente a mesma quantidade de osso neoformado. O biomaterial

que apresentou menor quantidade de osso neoformado foi o TCP- β e segundo Yang et al. (2014) isto pode ser atribuído à absorção rápida de partículas de TCP- β , o que é uma característica mais dominante, do que a formação de osso, especialmente no período precoce de cicatrização.

Ao contrário dos biomateriais citados anteriormente, os bifásicos 70/30 e 80/20 apresentam maior quantidade de hidroxiapatita em relação ao TCP- β , o que os tornam menos solúveis, apresentando absorção mais lenta do biomaterial e consequentemente menor formação óssea.

A quantidade total de biomaterial que foi reduzindo durante os períodos de observação, dentro dos grupos, esta de acordo com estudos realizados previamente por outros autores (LIM et al. 2015; POL et al. 2010; THEISS et al. 2005) essas diferenças de absorção indicam estar relacionadas aos graus de solubilidade de cada biomaterial (DAHLIN et al. 2015; LIM et al. 2015). Diferenças na absorção dos biomateriais e formação de novo tecido ósseo entre os animais estão dentro das variações biológicas normais (THEISS et al. 2005)

Na avaliação das MEVs aos 06 meses pode se observar que houve alteração no desempenho de alguns dos biomateriais quando comparado aos 03 meses. Comparando-se aos 03 meses a HA não apresentou diferença na absorção dos seus grânulos e na quantidade de osso formado. Os bifásicos 80/20, 70/30 e 30/70 apresentaram pequeno aumento na absorção dos biomateriais e consequentemente pequeno aumento na área de osso neoformado. Através da MEV foi possível observar que o TCP- β e o bifásico 20/80 foram os que apresentaram maior quantidade de biomaterial absorvido e osso neoformado, haja vista serem os que apresentam maior quantidade de TCP- β nas suas constituições.

Na avaliação das MEVs aos 12 meses pode se observar que a HA não apresentou diferença na quantidade de biomaterial absorvido quando comparado aos 03 e 06 meses (aproximadamente um milímetro), demonstrando mais uma vez que ela tem solubilidade reduzida e consequentemente permanece por muito mais tempo no organismo do que o TCP- β e outros bifásicos. Os bifásicos 70/30 e 80/20 apresentaram características semelhantes em relação à absorção e produção óssea comparando-se aos 03 e 06 meses. O TCP- β apresentou absorção completa dos grânulos de biomaterial na região cortical, demonstrando pequena quantidade de biomaterial em região compreendida por canal medular. Os bifásicos 30/70 e 20/80 apresentaram absorção completa dos biomateriais e consequentemente substituição total por tecido ósseo neoformado aos 12 meses, diferente do que foi observado por Yang et al. (2014) em calvárias de coelhos avaliando HA, TCP- β , HA/TCP- β 60/40 e HA/TCP- β 20/80,

nos períodos de duas e oito semanas. Esses autores concluíram que não houve diferença na formação óssea para os grupos 60/40 e 20/80. Entretanto, este resultado pode estar relacionado ao período curto de avaliação, oito semanas, quando comparado com os resultados do presente estudo que foram avaliados por 12 meses.

Jensen et al. (2007) em seu estudo, concluíram que a quantidade de osso formado foi diretamente dependente da quantidade de TCP- β presente nos biomateriais de fosfato de cálcio. A HA e o HA/TCP- β 60/40 exibiram similares padrões de absorção, enquanto o enxerto autólogo e o TCP- β mostraram rápida degradação e substituição por osso neoformado. Da mesma forma, no presente estudo o TCP- β e os bifásicos com maior proporção de TCP- β (30/70 e 20/80) foram os que apresentaram maior e mais rápida formação óssea, enquanto os bifásicos 70/30 e 80/20 e a HA foram os que apresentaram menor e mais lenta formação óssea.

Muitos biomateriais não apresentam propriedades osteoindutivas na ausência de agentes osteoindutivos adicionais, tal qual proteínas morfogenéticas (KONDO et al. 2006). Por exemplo, embora muitos fosfatos de cálcio exibam excelentes propriedades osteocondutivas, o implante por si só não induz a formação de osso. Contudo, muitos estudos têm demonstrado osteogênese com implantação de fosfatos de cálcio sozinhos (sem aditivos), quando aplicados em tecidos moles e tal osteocondutividade é característica desejável para materiais utilizados como substitutos ósseos. No presente estudo não foram utilizados agentes osteoindutivos adicionais, demonstrando que todos eles apresentam boas propriedades osteoindutivas.

Nas amostras analisadas neste estudo, tanto na MEV quanto no exame histológico, observou-se redução da quantidade de biomaterial com aumento simultâneo do novo osso formado, crescente a partir da superfície da região cortical e periferia do defeito ósseo, em direção ao canal medular. Esses achados corroboram com os encontrados por outros autores em trabalhos prévios, Doernberg et al. (2006) em estudo com TCP- β , Yang et al. (2014), com os bifásicos HA/TCP- β 60/40 e HA/TCP- β 20/80, Kunert-Keil et al. (2013) com os biomateriais TCP- β e HA/TCP- β 60/40, Lim et al. (2015), utilizando os bifásicos HA/TCP- β 70/30, HA/TCP- β 30/70 e HA/TCP- β 80/20 e Yuan et al. (1998) avaliando HA, TCP, BCP (bifásico) e CPC (cimento). Da mesma forma para Mayr et al. (2013) e Bernstein et al. (2013), em estudo com TCP- β em côndilos de fêmures de ovelhas, onde observaram que a neoformação de cartilagem teve início na porção mais externa com progressão em direção ao centro do implante.

A avaliação radiográfica neste estudo foi de grande importância, haja vista possibilitar a avaliação das tíbias antes e após a realização das cirurgias, bem como, investigar o comportamento dos biomateriais nos locais de implantação e possíveis alterações relacionadas a eles.

Devido à sua alta densidade, os biomateriais puderam ser facilmente visibilizados e distinguidos do osso cortical nos exames radiográficos pós-operatórios. Todos os orifícios foram completamente preenchidos com os biomateriais, sendo que eles foram colocados até o interior do canal medular.

Aos 06 e 12 meses, no momento de se fazer a coleta dos fragmentos ósseos para se encaminhar para os devidos laboratórios (MEV e Histologia), não foi possível observar os biomateriais macroscopicamente em seus locais de implantação, devido à cicatrização óssea estar completamente estabelecida na superfície cortical. Nesse momento a radiografia das peças (tíbias - figura 7) se mostrou eficiente em identificar os locais onde se encontravam os biomateriais, possibilitando assim, fazer o corte dos segmentos ósseos nos locais exatos, assim como realizado por Jensen et al (2007) em seu estudo em mandíbulas de Mini Pig. Dahlin et al. (2015) utilizaram parafusos de titânio de sete mm adjacentes aos orifícios para poder identificar os locais onde foram colocados os biomateriais, indicando que esta é uma metodologia que pode ser utilizada em estudos futuros.

A densidade radiográfica dos biomateriais implantados diminuiu gradativamente durante os períodos avaliados e essas mudanças radiográficas são sinais de absorção e remodelação óssea (MAYR et al. 2015). Durante a avaliação radiográfica foi possível observar que alguns biomateriais apresentaram diminuição gradativa em sua radiopacidade, como para o TCP- β e os bifásicos HA/TCP- β 30/70 e HA/TCP- β 20/80. Para a HA, e os bifásicos HA/TCP- β 70/30 e HA/TCP- β 80/20 a diferença foi praticamente imperceptível quando comparada com o pós-operatório imediato. Ainda nas avaliações radiográficas, foi possível observar que com 01, 03, 06 e 12 meses de pós-operatório, nenhum dos animais desenvolveu reação periosteal nos locais de implantação dos biomateriais.

6.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

No presente estudo não foram realizadas análises estatísticas dos exames histológicos, pois para a sua realização haveria a necessidade de estudo histomorfométrico das amostras. Este exame apresenta custo elevado e durante a elaboração do projeto não foi previsto verba para a sua realização.

Os cortes ósseos para a coleta dos seus fragmentos foram realizados no sentido transversal, no entanto, para melhor obtenção dos cortes histológicos sugere-se que o corte do osso seja no sentido longitudinal (no sentido da fibra óssea) que proporcionará melhor integridade das fibras ósseas.

CONCLUSÃO

Conclui-se com o presente estudo que as biocerâmicas sintéticas hidroxiapatita, o fosfato tricálcico- β e os bifásicos HA/TCP- β 70/30, HA/TCP- β 30/70, HA/TCP- β 80/20 e HA/TCP- β 20/80 sinterizados a temperatura de 1.100°C, com poros que variam de 200 a 500 μm e porosidade de 70% apresentam boa capacidade de osteoindução, osteocondução e osteointegração, promovendo boa capacidade de estimular a formação óssea, podendo ser utilizados como substitutos ósseos.

Os bifásicos HA/TCP- β 20/80 e HA/TCP- β 30/70 foram os que apresentaram absorção dos biomateriais e formação óssea mais rápida durante a evolução da cicatrização aos 03, 06 e 12 meses, seguido pelos biomateriais TCP- β , HA/TCP- β 70/30, HA/TCP- β 80/20 e a HA, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Europe Spine Journal**. v.10, p.96-101, 2001.
- ARINZEH, T. L. et al. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. **Biomaterials**. v. 26, p.3631-3638, 2005.
- ARINZEH, T. L. et al. Allogenic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical size canine segmental defect. **Journal of Bone and Joint Surgery American**. v.85-A, n.10, p.1927-1935, 2003.
- ARX, T. von et al. Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. **Clinical Oral Implant Research**. v.12, p.260-269, 2001.
- BAŞAR, B. et al. Synthesis, phase transitions and cellular biocompatibility of nanophase alumina–hydroxyapatite composites. **Advances in Applied Ceramics**. v.110, n.4, p.238-243, 2011.
- BERNSTEIN, A. et al. Microporous calcium phosphate ceramics as tissue engineering scaffolds for the repair of osteochondral defects: Histological results. **Acta Biomaterialia**. v.9, p.7490-7505, 2013.
- BOHNER, M.; BAUMGART, F. Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. **Biomaterials**. v.25, p.3569-3582, 2004.
- 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. **Hospital for Special Surgery Journal**. v.1, n.1, p.9-18, sep. 2005.
- 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 B: Applied Biomaterials**. v.103 b, n.7, p.1478-1487, oct. 2015.
- BURG, K. J.; PORTER, S.; KELLAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**. v.21. n.23, p.2347-2359, 2000.
- CAMARGO, N. H. A.; LIMA, S. A.; GEMELLI, E. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite/TiO₂n Nanocomposites for Bone Tissue Regeneration. **American Journal of Biomedical Engineering**. v.2, n.2, p.41-47, 2012.
- CHENG, L. et al. H. Osteoinduction of calcium phosphate biomaterials in small animals. **Materials Science and Engineering**. v.33 C, p.1254-1260, 2013.
- CONSTANTINEUSCU, G. M. **Clinical Anatomy for Small Animal Practitioners**. 1. ed. Iowa: Blackwell Publishing, p. 381, 2002.

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

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, fev. 2015.

CROCI, A. T. et al. Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongo como estimulação óssea. Estudo experimental. **Acta Ortopédica Brasileira**. v.11, n.4, p.230-239, oct./dec. 2003.

DACULSI, G. e. LEGEROS, J. P. Three-dimensional defects in hydroxyapatite of biological interest. **Journal of Biomedical Materials Research**. v.31, p.495-501, 1996.

DAHLIN, C. et al. Bone tissue modelling and remodeling following guided bone regeneration in combination with biphasic calcium phosphate materials presenting different microporosity. **Clinical Oral Implant Research**. v.26, p.814-822, 2015.

DALMÔNICO, G. M. L, et al. Elaboração e caracterização de biomateriais nanoestruturados de fosfatos de cálcio granulados para aplicação odontológica. CONGRESSO LATINO AMERICANO de ÓRGÃOS ARTIFICIAIS e BIOMATERIAIS. 22 a 25 de agosto de 2012. **Anais**.

DOERNBERG, M.C. von. Et al. In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. **Biomaterials**. v.27, p.5186-5198, 2006.

DELAMARTER, R.B.; SHERMAN, J.; CARR, .JB. Pathophysiology of spinal cord injury: recovery after immediate and delayed decompression. **Journal Bone Joint Surgery American**. v.77, p.1042-1049, 1995.

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, 2007.

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

DUCHEYNE, P.; RADIN. S.; KING, L. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution. **Journal Biomed Material Research**. v.27, n.1, p.25-34, Jan. 1993.

FOSSUM, T. W. et al. **Tratamento de Fraturas Específicas**. In: Cirurgia de Pequenos Animais. 3.ed., cap.32, p.1015-114. São Paulo: Elsevier, 2008.

GHANAATI, S. et al. The chemical composition of synthetic bone substitutes influences tissue reactions *in vivo*: histological and histomorphometrical analysis of the cellular inflammatory response to hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate ceramics. **Biomedical Material**. v.7, p.1-14, 2012.

GUTIERRES, M. et al. Substitutos Ósseos: Conceitos Gerais e Estado Atual. **Arquivos de Medicina**. v.19, n.4, p.153-162, 2006.

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

HEMERT, W.L.W. van et al. Tricalcium phosphate granules or rigid wedge preforms in open wedge high tibial osteotomy: a radiological study with a new evaluation system. **The Knee**. v.11, p.451-456, 2004.

HING, K. A. et al. Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v.16, p.467- 475, 2005.

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

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

JENSEN, S.S. et al. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. **Clinical Oral Implants Research**. v.18, p.752-760, 2007.

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**. p.171-181, 2008.

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

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

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

KUNERT-KEIL, C. et al. Comparative study of biphasic calcium phosphate with beta-tricalcium phosphate in rat cranial defects - A molecular-biological and histological study. **Annals of Anatomy**. p.1-6, 2014.

LAUREANO FILHO, J. R. et al. Comparação histológica entre o osso desmineralizado e polímero de mamona sobre a regeneração óssea. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v.73, 2,p.186-92, 2007.

LEVENGOOD, S. K. L. et al. Multiscale osteointegration as a new paradigm for the design of calcium phosphate scaffolds for bone regeneration. **Biomaterials**. v.31, p.3552-3563, 2010.

LIU, Y. et al. Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. **Biotechnology Advances**. v.31, p. 688-705, 2013.

LIM, H. C. et al. In Vivo Comparative Investigation of Three Synthetic Graft Materials with Varying Compositions Processed Using Different Methods. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**. v.0, p.1280-1286, 2015.

LOBO, S.E.; ARINZEH, T.L. Biphasic Calcium Phosphate Ceramics for Bone Regeneration and Tissue Engineering Applications. **Material**. v.3, p.815-826, 2010.

MAYR, H.O. et al. β -Tricalcium phosphate for bone replacement: Stability and integration in sheep. **Journal of Biomechanics**. v.48, p.1023-103, 2015.

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

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

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

MURUGAN, R. & RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**. v.65, p.2385-2406, 2005.

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

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

OKAMOTO, M. et al. Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on *in vitro* and *in vivo* bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. **Journal Material Science: Materials in Medicine**. v.17, p.327-336, 2006.

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

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

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

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

REGALIN, B. D. C. **Comportamento da neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nano estruturados em ovinos**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agro-veterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

ROCHA, R. et al. Hematoma Epidural com Paraplegia Flácida: Complicação de Pós-operatório Imediato. **Portuguese Journal of Orthopaedics and Traumatology**. v.22, n.1, p.94-10, 2014.

ROSS, M. H.; ROWRELL, L. J. **Histologia, texto e atlas**. Cap 8 Osso, p. 146. São Paulo: Panamericana, 1993.

RUMPEL, E. et al. The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes *in vivo*. **Folia Morphology**. v.065, n.1, p.43-48, 2006.

SAGER, M. et al. Immunohistochemical characterization of wound healing at two different bone graft substitutes. **International Journal Oral Maxillofacial Surgery**. v.41, p.657-666, 2012.

SAHITHI, K. et al. Polymeric composites containing carbon nanotubes for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 46, p.281-283, 2010.

SAIZ, E. et al. Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. **Dental Materials**. v.29, n.1, p.103-115, jan 2013.

SAMAVEDI, S. et al. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. **Acta Biomaterialia**. v.9, p.8037-8045, 2013.

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

SANTOS, K. S. **Princípios da cicatrização óssea (Revisão de literatura)**. 2011. 38 folhas. Seminário apresentado junto à Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Nível: Mestrado. Disponível em:
https://portais.ufg.br/up/67/o/Seminario2011_Kesia_Santos.pdf

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

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

SILVA, R.F. **Estudo de caracterização de pós nanoestruturados de fosfato de cálcio e nanocompósitos fosfato de cálcio/SiO₂n para aplicações biomédicas.** (2007) 96 f. Dissertação (Mestrado) - (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Centro de Ciências Tecnológicas – CCT, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville.

SOUZA, J. C. P. **Estudo e Caracterização de pós nanoestruturados de fosfato de cálcio e nanocompósitos de fosfato de cálcio/Al₂O₃-α sol-gel para aplicações biomédicas.** 2009. *Folhas*. Dissertação (Mestrado)- Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville.

SPALTHOFF, S. et al. Heterotopic bone formation in the musculus latissimus dorsi of sheep using b-tricalcium phosphate scaffolds: evaluation of an extended prefabrication time on bone formation and matrix degeneration. **International Journal Oral Maxillofacial Surgery.** v.44, n.6 p.791-797, jun. 2015.

STEIN, R. S.; SILVA, J. B.; SILVA, V. D. Estudo comparativo da neoformação óssea utilizando-se o enxerto autógeno e três substitutos: Defeitos ósseos em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia.** v.44, n.4, p.330-5, 2009.

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

THEISS, F. et al. Biocompatibility and resorption of a new brushite calcium phosphate cement. **Biomaterials.** v.26, n.21, p.4383-94, 2005.

VALE, R.P. Anestesia raquidiana com lidocaína, levobupivacaína ou suas associações no espaço lombo-sacro de ovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.** n.19, p.1679-735, jul. 2012.

WANG, H. et al. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nanohydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials.** v.28, p.3338-3348, 2007.

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

YANG, C. et al. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. **Journal of Biomedical Materials Research Part B.** v.102 B, p.80-88, 2014.

YUAN, H. et al. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine.** v.9, p.723-726, 1998.