FERNANDA SILVEIRA NÓBREGA

**Avaliação da interação biológica entre polímero de poliuretana de
mamona acrescido de carbonato de cálcio e tecido ósseo de
equinos**

São Paulo
2014

FERNANDA SILVEIRA NÓBREGA

**Avaliação da interação biológica entre polímero de poliuretana de mamona
acrescido de carbonato de cálcio e tecido ósseo de equinos**

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. André Luís do Valle De Zoppa

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2965
FMVZ

Nóbrega, Fernanda Silveira

Avaliação da interação biológica entre polímero de poliuretana de mamona acrescido de carbonato de cálcio e tecido ósseo de equinos / Fernanda Silveira Nóbrega. -- 2014.
156 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. André Luís do Valle De Zoppa.

1. Cavalo. 2. Biomaterial. 3. Polímeros naturais. 4. Biocompatibilidade. 5. Ortopedia.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Avaliação da interação biológica entre polímero de poliuretana de mamona acrescido de carbonato de cálcio e tecido ósseo de equinos”, protocolado sob o nº 2215/2011, utilizando 6 (seis) cavalos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. André Luis do Valle De Zoppa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/9/2012.

We certify that the Research “Assessment of biological interaction between castor oil poliuretane polymer plus calcium carbonate and equine bone tissue”, protocol number 2215/2011, utilizing 6 (six) horses, under the responsibility Prof. Dr. André Luis do Valle De Zoppa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/19/2012.

São Paulo, 5 de dezembro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: NÓBREGA, Fernanda Silveira

Título: Avaliação da interação biológica entre polímero de poliuretana de mamona acrescido de carbonato de cálcio e tecido ósseo de equinos

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Ao meu marido,
Márcio Poletto Ferreira

Aos meus pais,
Paulo Nóbrega e Sandra Nóbrega

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois acredito que nossa fé permite que possamos seguir em frente a cada dia.

Ao Prof. Dr. André Luís do Valle De Zoppa, meu orientador, por permitir meu ingresso no Doutorado, me dando total liberdade para execução do projeto. Pela disponibilidade e atenção que despendeu durante o período do projeto e principalmente, por entender e aceitar meus princípios para trabalhar com animais. Obrigada pela confiança.

À Prof^a. Dra. Luciana Corrêa pela sua imensa ajuda para o complemento da pesquisa, dando grandes sugestões para a adequação do projeto dentro da proposta de estudo da histologia óssea. Obrigada por colaborar com a etapa do estudo de Microscopia Óptica na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez por todos os ensinamentos dentro do estudo de microscopia eletrônica, por permitir a realização desta etapa dentro do Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Agradeço também a toda a equipe que trabalha no laboratório pela colaboração e coleguismo.

Ao Prof. Dr. Gilberto Chierice e a empresa Poliquil por ceder o biomaterial utilizado nesta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da Bolsa de Estudo durante o Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio Pesquisa para a execução do projeto.

Ao Programa de Pós Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela oportunidade concedida.

Ao Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial à Senhora Elza Maria Rosa Faquim.

Aos professores Aline Magalhães Ambrósio, Carla Bargi Belli, Luis Cláudio Lopes Correia da Silva, Raquel Yvone Arantes Baccarin, Wilson Roberto Fernandes por permitirem adaptar a rotina clínica e cirúrgica do HOVET/USP para permitir a realização das cirurgias e o alojamento dos animais do projeto durante aproximadamente 12 meses.

Ao Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno pela concessão da câmera térmica utilizada na avaliação termográfica da pesquisa.

A todos os funcionários do HOVET/USP, principalmente, Henrique Fragoso, Cícero Antônio da Silva, Marcos Alves, Gervásio da Silva e Rosendo Pires pela disponibilidade e companheirismo durante a execução e o todo período de alojamento dos animais.

À MV Msc. Mariana Baroni Selim, minha colega e parceira no desenvolvimento do projeto. Acredito que o trabalho em equipe foi fundamental para o sucesso da pesquisa.

À MV Msc. Lara Lopes Facó, pela realização das anestésias de todo o projeto. Pessoa que admiro pessoal e profissionalmente.

À MV Ana Paula Moraes por participar de todos os exames ultrassonográficos realizados no projeto.

Ao MV Dr. Marcos Della Nina pelas sugestões para avaliação termográfica da pesquisa.

A toda a equipe de residentes 2011 e 2012 do HOVET/USP por sempre colaborarem e ajudarem no manejo com os animais do projeto.

À Flavia Rosin pela colaboração e auxílio no processamento das amostras para avaliação histológica.

À Marta Lauro que esteve me ajudando nestes últimos dois anos a compreender situações na minha vida, direcionar meus objetivos e aceitar minhas limitações.

Ao Marcos da Silva Alexandre, que me ensinou a trabalhar com cavalos sob um ponto de vista que nunca havia experimentado: a equitação.

A todas as pessoas que conheci durante este período e que contribuíram de alguma forma para a realização desta pesquisa, em especial para Daniella Godói, Mônica Lente, Geissiane Marcondes, Joyce Xavier e Sofia Cicolo.

Ao Márcio Poletto Ferreira, pela participação nas cirurgias do projeto, pelo auxílio na confecção da tese, pelo companheirismo diário, pela paciência e tolerância, por aceitar minha forma de pensar sobre os animais do projeto e principalmente por adotá-los comigo.

Aos meus pais que sempre priorizaram o meu crescimento pessoal e profissional e que são meus grandes exemplos de ética e caráter. Que me ensinaram a amar incondicionalmente aos animais e usufruir do benefício da companhia desprestenciosa deles.

No final, mas não menos importante, os cavalos do projeto: Trovão, Buenacho, Ciclone, Garoa, Tufão e Chuvisco; eles fizeram todos os dias serem especiais e se tornaram inesquecíveis.

Epígrafe

“O poder nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a veemência e perseverante energia de sua alma a um fim, vencerá os obstáculos, e, se não atingir o alvo fará, pelo menos, coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

NÓBREGA, F. S. **Avaliação da interação biológica entre polímero de poliuretana de mamona acrescido de carbonato de cálcio e tecido ósseo de equinos.** [*Biocompatibility of castor oil-calcium carbonate polymer with the equine bone tissue*]. 2014. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A reconstrução anatômica de fraturas em ossos longos em equinos é um grande desafio para o Médico Veterinário. Na tentativa de melhorar os resultados da técnica, estabilizando e preenchendo áreas onde houve perda óssea, o uso de substitutos ósseos, entre eles os biomateriais, vêm apresentando bons resultados. Os polímeros podem ser uma opção viável, funcional e economicamente, de substituto ósseo para aplicação em ortopedia de equinos. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento biológico do equino frente à implantação de polímero de poliuretana de mamona acrescido de carbonato de cálcio após implante em osso III metacarpiano. Seis equinos hígidos foram submetidos à ostectomias unicorticais de 13mm de diâmetro na região proximal da superfície dorsal do III metacarpiano. Em seguida, de forma randômica, foi implantado o polímero de mamona em um membro torácico. No membro contralateral, foi reproduzida a técnica, porém a falha foi mantida sem preenchimento, servindo como controle do remodelamento ósseo. Todos os animais foram submetidos à avaliação física, radiográfica, ultrassonográfica, termográfica e perfil bioquímico previamente a cirurgia para identificação dos parâmetros pré-cirúrgicos. No período pós-operatório, os animais foram avaliados através de exame físico diário durante os 120 dias de observação, exame radiográfico, exame ultrassonográfico, exame termográfico e monitoramento do perfil sérico da fosfatase alcalina, cálcio e fósforo nos momentos sete, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de pós-operatório. Com 120 dias de pós-operatório, novamente sob anestesia geral, realizou-se biópsia óssea com trefina de 0,5cm de diâmetro na área de interface implante-osso (membro polímero) e osso-osso neoformado (membro controle). O material foi processado e desmineralizado para microscopia de luz sendo realizadas técnicas de coloração de Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson para análise descritiva e morfométrica. A avaliação física de cada animal

demonstrou não haver desconforto relacionado ao procedimento e à presença do implante, baseando-se na análise de presença de claudicação e parâmetros físicos (frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura retal) ao longo dos 120 dias. A avaliação ultrassonográfica permitiu identificação da formação de tecido mineralizado e pico de neovascularização no 30º dia de pós-operatório. A partir da dosagem sérica de fosfatase alcalina foi possível identificar pico desta enzima também no trigésimo dia. A avaliação termográfica demonstrou não haver aumento de temperatura local, decorrente de resposta inflamatória, ao longo do tempo de observação, porém foi possível identificar resposta mais intensa no 7º dia no membro polímero, quando comparado ao membro controle. O estudo histológico demonstrou comportamento osteocondutor do polímero sem reação de cápsula fibrosa ou resposta inflamatória crônica. Esta pesquisa apresentou resultados que demonstram biocompatibilidade do polímero de poliuretana de mamona acrescido de carbonato de cálcio em tecido ósseo equino e conclui-se que este biomaterial apresenta potencial para uso como substituto ósseo em equinos.

Palavras-chave: Cavalo. Biomaterial. Polímeros naturais. Biocompatibilidade. Ortopedia.

ABSTRACT

NÓBREGA, F. S. **Biocompatibility of castor oil-calcium carbonate polymer with the equine bone tissue.** [Avaliação da interação biológica entre polímero de poliuretana de mamona acrescido de carbonato de cálcio e tecido ósseo de equinos]. 2014. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Anatomical reconstruction of long bone fractures remains a challenge to the equine practitioner to date. Bone surrogate biomaterials have been developed to improve surgical outcomes in cases involving bone tissue loss, with promising results. Biopolymers may be a feasible, functional and economically viable alternative for bone substitution in horses. This study evaluated the biological behaviour of castor oil–calcium carbonate polymer following implantation in the equine third metacarpal bone. Six healthy horses were submitted to bilateral dorsal unicortical osteotomy (13 mm in diameter) on the proximal aspect of the third metacarpal bone. One front limb was randomly selected for castor oil polymer implantation while the contralateral limb was left untreated to serve as control for bone remodeling. Preoperative evaluation consisted of physical, radiographic, ultrasonographic and thermographic assessment, and serum biochemistry profile determination. Horses were submitted to daily physical examination during the 120-day follow-up period. Radiographic, ultrasonographic and thermographic reassessments were performed on postoperative days seven, 15, 30, 60, 90 and 120, along with determination of alkaline phosphatase, calcium and phosphorus serum levels. On postoperative day 120, horses were reoperated under general anesthesia and a 0.5 mm biopsy fragment collected from the bone-implant or bone-new bone interface. Biopsy specimens were processed, demineralized, stained with hematoxylin-eosin or Masson's trichrome and submitted to descriptive and morphometric analysis under light microscopy. Horses showed no signs of pain (i.e. lameness or changes in rectal temperature, heart and respiratory rates) related to the surgical procedure or the presence of the implant during the 120-day follow-up period. Ultrasonographic reassessment revealed mineralized tissue formation and peak neovascularization on postoperative day 30. Peak alkaline phosphatase levels were also observed on the same day. Local temperature differed significantly between treated and control limbs

on postoperative day 7, but not thereafter. Absence of encapsulation or signs of chronic inflammatory response on histology suggests osteoconductive behaviour of the *Ricinus communis* polymer. Based on the results of this study, castor oil-calcium carbonate polymer is biocompatible with the equine bone tissue and represents a potential surrogate biomaterial for bone substitution in horses.

Keywords: Horses. Biomaterial. Natural polymers. Biocompatibility. Orthopedics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Biomaterial utilizado na pesquisa e etapas do processamento para sua aplicação – São Paulo – 2014	77
Figura 2 -	Representação esquemática das etapas da realização da pesquisa – São Paulo – 2014	78
Figura 3 -	Realização do exame ultrassonográfico para a avaliação do processo regenerativo após ostectomia em III metacarpiano em equino – São Paulo – 2014	80
Figura 4 -	Sequência de imagens para avaliação ultrassonográfica <i>Power Doppler</i> da neovascularização durante processo de regeneração óssea do osso III metacarpiano sem preenchimento com biomaterial (membro controle) – São Paulo – 2014	81
Figura 5 -	Interface do programa de análise de imagens FLIR QuickReport® durante avaliação termográfica dos membro torácicos do equino submetido a osteotomia do III metacarpiano – São Paulo – 2014	82
Figura 6 -	Fotografia demonstrando acesso cirúrgico em semi-círculo para confecção da ostectomia em III metacarpiano de equino – São Paulo – 2014	85
Figura 7 -	Cirurgia de ostectomia em III metacarpiano de equino para implantação de polímero de poliuretana de mamona – São Paulo – 2014	85
Figura 8 -	Fotografia da sequência do momento de implantação do polímero de poliuretana de mamona em III metacarpiano de equino – São Paulo – 2014	86
Figura 9 -	Sequência de imagens da colheita de biópsia óssea no III metacarpiano de equino – São Paulo – 2014	88
Figura 10 -	Interface do programa WCIF ImageJ 1.37a® analisando área de osso neoformado em membro controle de equino – São Paulo – 2014	91
Figura 11 -	Interface do programa WCIF ImageJ 1.37a® analisando área de osso neoformado em membro com polímero de equino – São Paulo – Brasil	91

Figura 12 -	Interface do programa WCIF ImageJ 1.37a [®] utilizado para analisar o grau de maturidade óssea expressa por área em vermelho – São Paulo – 2014	92
Figura 13 -	Exame radiográfico nas projeções dorsopalmar (DP) e lateromedial (LM) do membro controle de equino submetido à ostectomia unicortical de III metacarpiano nos períodos de pós-operatório imediato (A) e 120 dias de pós-operatório (B) – São Paulo – 2014	96
Figura 14 -	Exame radiográfico nas projeções dorsopalmar (DP) e lateromedial (LM) do membro de equino preenchido com polímero de poliuretana de mamona acrescido de carbonato após ostectomia unicortical de III metacarpiano nos períodos de pós-operatório imediato (A) e 120 dias de pós-operatório (B) – São Paulo – 2014	97
Figura 15 -	Fotografia de imagem ultrassonográfica longitudinal da região dorsal do osso III metacarpiano, grupo controle, na área de ostectomia – São Paulo – 2014	101
Figura 16 -	Fotografia de imagem ultrassonográfica imagem longitudinal da região dorsal do osso III metacarpiano na área de ostectomia preenchida com polímero de mamona (círculo pontilhado amarelo) – São Paulo – 2014	101
Figura 17 -	Fotografia do material colhido do membro controle através de biópsia com uso de serra trefina de 5cm de diâmetro – São Paulo – 2014	107
Figura 18 -	Fotografia do material colhido do membro com polímero através de biópsia com uso de serra trefina de 5cm de diâmetro – São Paulo – 2014	107
Figura 19 -	Fotomicrografia de microscopia de luz mostrando detalhes do osso neoformado no membro controle com presença de osteoblastos – São Paulo – 2014	108
Figura 20 -	Fotomicrografia de microscopia de luz mostrando detalhes do osso neoformado no membro controle com presença de material osteóide – São Paulo – 2014	109
Figura 21 -	Fotomicrografia de microscopia de luz mostrando detalhes do osso neoformado no membro controle com presença de osteoclastos – São Paulo – 2014	109
Figura 22 -	Fotomicrografia de microscopia de luz mostrando detalhes do osso neoformado no membro com polímero – São Paulo – 2014	110

Figura 23 -	Fotomicrografia do tecido ósseo retirado por ostectomia mostrando tecido ósseo compacto com grande quantidade de sistema de Havers e espaços medulares restritos – São Paulo – 2014	111
Figura 24 -	Fotomicrografia da biópsia do membro controle – São Paulo – 2014	112
Figura 25 -	Fotomicrografia da biópsia do membro com polímero – São Paulo – 2014	112
Figura 26 -	Fotomicrografia mostrando aspectos microscópicos do polímero de poliuretana de mamona – São Paulo – 2014	113
Figura 27 -	Fotomicrografia evidenciando área de degradação do polímero de poliuretana de mamona – São Paulo – 2014	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tabela apresentando os valores da frequência cardíaca (bpm) máxima e mínima dos animais, média e desvio padrão durante os quatro meses de avaliação – São Paulo – 2014	98
Tabela 2 -	Tabela apresentando os valores da frequência respiratória (mpm) máxima e mínima dos animais, média e desvio padrão durante os quatro meses de avaliação – São Paulo – 2014	98
Tabela 3 -	Tabela apresentando os valores da temperatura retal (°C) máxima e mínima dos animais, média e desvio padrão durante os quatro meses de avaliação – São Paulo – 2014 .	99
Tabela 4 -	Tabela de comparação da concentração sérica de cálcio (mg/dL) ao longo do tempo – São Paulo – 2014	100
Tabela 5 -	Tabela de comparação da concentração sérica de fósforo (mg/dL) ao longo do tempo – São Paulo – 2014	100
Tabela 6 -	Tabela de comparação da concentração sérica de fosfatase alcalina (U/L) ao longo do tempo – São Paulo – 2014	100
Tabela 7 -	Avaliação ultrassonográfica do preenchimento da falha no membro controle realizada pelo Avaliador 1 – São Paulo – 2014	102
Tabela 8 -	Avaliação ultrassonográfica do preenchimento da falha no membro controle realizada pelo Avaliador 2 – São Paulo – 2014	102
Tabela 9 -	Comparação da avaliação ultrassonográfica do preenchimento da falha no membro controle entre os avaliadores – São Paulo – 2014	103
Tabela 10 -	Avaliação ultrassonográfica da presença de vascularização na falha do membro controle através de <i>Power Doppler</i> realizada pelo Avaliador 1 – São Paulo – 2014	104
Tabela 11 -	Avaliação ultrassonográfica da presença de vascularização na falha do membro controle através de <i>Power Doppler</i> realizada pelo Avaliador 2 – São Paulo – 2014	104
Tabela 12 -	Comparação da avaliação ultrassonográfica da presença de vascularização no membro controle através de <i>Power Doppler</i> entre os avaliadores – São Paulo – 2014	104

Tabela 13 -	Comparação ao longo do tempo da avaliação termográfica no membro com polímero – São Paulo – 2014	105
Tabela 14 -	Comparação ao longo do tempo da avaliação termográfica no membro controle – São Paulo – 2014	106
Tabela 15 -	Comparação da avaliação termográfica entre o membro com polímero e o membro controle em cada período de tempo – São Paulo – 2014	106
Tabela 16 -	Tabela da comparação da área (μm^2) de osso neoformado entre membro controle e membro com polímero – São Paulo – 2014	114
Tabela 17 -	Tabela da comparação do grau de maturidade óssea (%) entre cirurgia, biópsia do membro controle e biópsia do membro com polímero – São Paulo – 2014	114

LISTA DE ABREVIATURAS

III Mtc	Osso terceiro metacarpiano
III Mtt	Osso terceiro metatarsiano
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BMU	<i>Basic multicellular unit</i>
bpm	Batimentos por minuto
cm	Centímetros
C.O.R	Composto ósseo de ricínus
°C	Grau Celsius
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
DRG	<i>Doctors Research Group</i>
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FC	Frequência cardíaca
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
FO/USP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FR	Frequência respiratória
GQATP	Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros
HA	Hidroxiapatita
HOVET/CGA	Hospital Veterinário/Cirurgia de Grandes Animais
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleucina
MEC	Matriz extracelular
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitro
MMPs	Metaloproteinases da matriz
mpm	Movimentos por minuto
MOB	Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo

MOL	Microscopia de luz
mm	Milímetro
mg.kg ⁻¹	Miligrama por quilo de peso
NO	Óxido nítrico
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial de hidrogênio
Prof.	Professor
Prof ^a .	Professora
PU's	Poliuretanas
<i>s.i.d</i>	Uma vez ao dia
TGF-β ₁	Fator de transformação do crescimento beta 1
TM	Tricrômico de Masson
TPC	Tempo de reperfusão capilar
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
TR	Temperatura retal
US	Ultrassonografia

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A -	Tabelas de avaliação ultrassonográfica com escores atribuídos pelos Avaliadores 1 e 2	151
Apêndice B -	Imagens ultrassonográficas utilizadas para avaliação da regeneração óssea do equino nos períodos de 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias	152
Apêndice C -	Tabelas de avaliação ultrassonográfica <i>Power Doppler</i> do membro controle com escores atribuídos pelos Avaliadores 1 e 2	153
Apêndice D -	Imagens ultrassonográficas <i>Power Doppler</i> utilizadas para avaliação da presença de neovascularização na região de ostectomia do membro controle do equino nos períodos de 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias	154
Apêndice E -	Representação gráfica da temperatura média obtida por análise termográfica comparando membro controle e membro com polímero para cada animal do estudo durante período de 120 dias	155

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DE LITERATURA	34
2.1	Biologia óssea	34
2.1.1	Anatomia óssea	34
2.1.2	Estrutura do tecido ósseo	35
2.2	Modelamento e remodelamento ósseo	39
2.2.1	Efeitos físicos sobre o tecido ósseo	39
2.2.2	Considerações sobre equinos	41
2.2.2.1	<i>Regeneração óssea após fratura</i>	<i>42</i>
2.3	Substitutos ósseos	45
2.3.1	Polímeros	49
2.3.1.1	<i>Poliuretana de mamona</i>	<i>50</i>
2.3.2	Interação entre osso e biomaterial	53
2.3.2.1	<i>Biocompatibilidade.....</i>	<i>55</i>
2.3.2.2	<i>Biofuncionalidade</i>	<i>56</i>
2.3.2.3	<i>Osteointegração.....</i>	<i>57</i>
2.4	Estudos em equinos	57
2.5	Escolha do modelo experimental	59
2.6	Métodos de avaliação da regeneração óssea	59
2.6.1	Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo	60
2.6.2	Exame ultrassonográfico	62
2.6.2.1	<i>Avaliação Power-Doppler da neovascularização durante a regeneração óssea</i>	<i>63</i>
2.6.3	Exame termográfico	64
2.6.4	Exame histológico	65
2.6.4.1	<i>Estudos histológicos da biocompatibilidado do polímero de mamona</i>	<i>66</i>
2.6.4.2	<i>Estudo morfométrico</i>	<i>68</i>
3	OBJETIVOS	70
3.1	Objetivo geral	70
3.2	Objetivos específicos	70

4	HIPÓTESES	72
5	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	74
6	MATERIAL E MÉTODO	76
6.1	Animais	76
6.2	Biomaterial utilizado na pesquisa	76
6.3	Delineamento experimental	77
6.4	Métodos de avaliação	78
6.4.1	Avaliação clínica	79
6.4.2	Avaliação laboratorial – marcador bioquímico do metabolismo ósseo	79
6.4.3	Avaliação ultrassonográfica	79
6.4.3.1	<i>Avaliação ultrassonográfica Power-Doppler</i>	<i>80</i>
6.4.4	Avaliação termográfica	81
6.4.5	Avaliação histológica	82
6.5	Procedimento anestésico e cirúrgico	83
6.5.1	Procedimento pré-operatório e anestésico	83
6.5.2	Procedimento cirúrgico	84
6.5.3	Manejo pós-operatório	87
6.5.4	Procedimento cirúrgico para colheita de biópsia óssea	87
6.6	Fase laboratorial	89
6.6.1	Processamento para microscopia de luz – MOL	89
6.6.1.1	<i>Descalcificação para MOL</i>	<i>89</i>
6.6.1.2	<i>Diafanização e inclusão dos espécimes em parafina</i>	<i>89</i>
6.6.1.3	<i>Confecção das lâminas</i>	<i>90</i>
6.6.1.4	<i>Avaliação microscópica – MOL</i>	<i>90</i>
6.7	Avaliação estatística	93
6.7.1	Dados laboratoriais e imagem	93
6.7.2	Dados histológicos	93
7	RESULTADOS	95
7.1	Manejo dos animais	95
7.2	Protocolo anestésico e analgésico	95
7.3	Protocolo cirúrgico	95
7.4	Métodos de avaliação	97

7.4.1	Avaliação clínica	97
7.4.2	Avaliação laboratorial – marcador bioquímico do metabolismo ósseo	99
7.4.3	Avaliação ultrassonográfica	101
7.4.3.1	<i>Avaliação ultrassonográfica Power Doppler</i>	103
7.4.4	Avaliação termográfica	105
7.4.5	Avaliação histológica – análise macroscópica	106
7.4.6	Avaliação histológica – análise microscópica	108
7.4.6.1	<i>Técnica Hematoxilina-Eosina</i>	108
7.4.6.2	<i>Técnica Tricrômico de Masson</i>	110
8	DISCUSSÃO	116
9	CONCLUSÕES	131
	REFERÊNCIAS	133
	APÊNDICES	151

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os equinos, principalmente os utilizados em atividades esportivas, estão sujeitos a traumas que podem causar fraturas e o tratamento, nestes casos, ainda é desafiador, especialmente quando ocorrem fraturas em ossos longos. Algumas características particulares da espécie equina, associadas com tamanho, anatomia e locomoção, contribuem para o prognóstico reservado quando comparado a cães e gatos (LOPES; MARKEL, 2012). Complicações pós-operatórias como laminite, deformidade angular ou flexural em potros, infecção do foco cirúrgico, falha do implante metálico e falha do osso, contribuem para baixa taxa de sucesso em cirurgias de osteossíntese (McCLURE et al., 2010).

O tratamento destas fraturas tem evoluído nos últimos anos, especialmente devido às novas tecnologias dos materiais cirúrgicos, como implantes bioabsorvíveis, uso de plasma rico em plaquetas e células tronco (DORNBUSCH et al., 2010). Embora as técnicas para reparo de fraturas estejam bem estabelecidas para equinos, muitos tipos de injúrias ósseas excedem a capacidade natural da regeneração do osso, tornando-se necessário o uso de ferramentas que melhorem o prognóstico nestes casos (CARNEIRO, 2003; WASELAU et al., 2007). A pressão econômica da indústria que ocorre em torno destes animais, demanda não somente a perfeita estabilização da fratura, mas também rápida regeneração para minimizar as perdas econômicas em função de longos períodos de convalescença (PARRIER et al., 2008).

Muitos modelos experimentais são utilizados para estudar o processo de consolidação de fraturas, no entanto, devido às diferenças anatômicas, biológicas e técnicas, nem sempre tais modelos possuem parâmetros adequados para a espécie de interesse final (LACRETA JR et al., 2010) e por todas as particularidades dos equinos, faz-se necessário o estudo na própria espécie alvo, em função da pouca correlação com as demais espécies, utilizadas rotineiramente em estudos experimentais.

Biomaterial foi definido recentemente por Williams (2009) como substância que foi produzida para ser usada, seja sozinha ou como parte de

um sistema complexo, interligada com componentes de sistemas vivos, no curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico. Sua finalidade é promover o crescimento de tecidos novos e depende das características genéticas das células e do material de suporte onde ocorre sua implantação.

Os biomateriais utilizados na reconstrução óssea devem submeter-se aos princípios biológicos que norteiam a regeneração óssea. O tecido ósseo está em constante remodelação e sua massa total depende da relação de equilíbrio existente entre a formação e reabsorção óssea (SILVA et al., 2007). Com base nestas informações, os substitutos do tecido ósseo devem possuir características como biocompatibilidade, biodegradabilidade e osteocondutibilidade. Além disso, devem proporcionar condução de osteoblastos ou de células precursoras de osteoblastos para o sítio lesionado e de fatores regulatórios que promovam esse recrutamento, assim como o crescimento celular neste sítio (LIU; MA, 2004; WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006; CHEN et al., 2009).

Outra característica importante é proporcionar estrutura adequada, que servirá de suporte para a neoformação óssea (PRECHEUR, 2007). O biomaterial, além de cumprir função mecânica específica quando implantado, precisa ter propriedades compatíveis com o tecido receptor (MATEUS, 2013).

Logo após a introdução do biomaterial em tecido vivo, inicia-se a sequência de eventos histoquímicos e celulares que interferem na intensidade da resposta tecidual (MARIOLANI; BELANGERO; ARRUDA, 1993). O sucesso da implantação depende da resposta tecidual do sítio receptor e do tipo de interface e adesão que ocorre entre implante e tecido vivo do hospedeiro (TURRER; FERREIRA, 2008).

A poliuretana sintetizada a partir do óleo de mamona é biomaterial que vem sendo amplamente estudado para aplicação na área médica, demonstrando adequadas propriedades mecânicas (CLARO-NETO, 1997). Além disso, é biocompatível quando em contato com culturas de células e tecido conjuntivo e quando empregada sob a forma de implantes ou enxertos (ARA, 1999; BONINI, 1999; BONINI et al., 2002a, b; LAUREANO FILHO et al., 2007) em leitos subperiósticos (PURICELLI et al., 1999) ou em tecido ósseo (CARVALHO et al., 1997; KONIG JR et al., 1999; TEIXEIRA; RAMALHO, 1999; GARCIA JR, 2000; CAVALIERI; SÁ-LIMA; GOMES, 2001; INÁCIO et al., 2002;

SOUZA; BRANDT; LIMA, 2002; DEL CARLO et al., 2003; LEONEL et al., 2003; RIBEIRO, 2003; LEONEL et al., 2004; POPAK et al., 2004; SARAN, 2006). De acordo com Ignácio et al. (2002), por ser ácido graxo, teria o comportamento de lípide, permitindo sua degradação por mecanismo de lipólise.

A poliuretana derivada do óleo de mamona apresenta fácil processabilidade, flexibilidade de formulação, versatilidade de temperatura de curva e pico exotérmico na transição líquido/gel controlável. Possui também excelentes propriedades estruturais e bom poder de adesão, além de não liberar vapores e radicais tóxicos quando implantado, e apresentar baixo custo (LEONEL et al., 2003). Segundo Souza, Okamoto (1995), Vilarinho; Hetem; Ramalho (1996) a poliuretana derivada do óleo de mamona é substituto ósseo, que pode ser utilizado no preenchimento de perdas ósseas, ocorrendo substituição gradual deste polímero por osso neoformado.

Existem inúmeras técnicas para a avaliação do tecido ósseo. A ultrassonografia (US) permite avaliação do calo fibroso, que não pode ser avaliado no exame radiográfico (ER) uma vez que esta técnica só permite identificação de tecido mineralizado, sendo assim, pode-se dizer que a US permite avaliação mais precoce do processo de consolidação, quando comparado ao ER (POZZI; RISSELADA; WINTER, 2012). A utilização da US associada ao *Power Doppler* (PD) permite a identificação e o monitoramento da evolução vascular do calo ósseo em formação (RISSELADA et al., 2007).

Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo são empregados na prática clínica há muitas décadas, com o objetivo de retratar a formação ou a reabsorção óssea (VIEIRA, 1999). A fosfatase alcalina é uma enzima que indica a atividade de osteoblastos no organismo, e o aumento dos níveis séricos, concomitantemente à formação de calo ósseo, podem sugerir deposição de matriz óssea (SOUZA et al., 2011).

A termografia é considerada exame não invasivo de sensoriamento remoto que se baseia na detecção da radiação térmica emitida por todos os corpos de temperatura não nula (HOLST, 2000) e gradativamente tem se tornado meio diagnóstico de alterações que causa inflamação em equinos (EDDY; VAN HOOGMOED; SNYDER, 2001). Este método pode, em teoria, retratar a inflamação de forma gráfica, acompanhando sua progressão e/ou regressão, além de permitir detecção precoce de recorrência. Baseado nesta

característica e sabendo-se que um dos pontos cardeais do processo inflamatório é o incremento de temperatura no local da lesão, a termografia pode ser valiosa na identificação de inflamações musculoesquelética (REDAELLI et al., 2014).

Dentre as técnicas de avaliação microscópica, a microscopia de luz (MOL) é importante ferramenta para avaliar objetivamente eventos histológicos permitindo o estudo da dinâmica do tecido ósseo, fornecendo dados quantitativos e qualitativos. Esta técnica tem por objetivo observação e análise microestrutural de materiais sólidos, sendo a ferramenta mais utilizada para caracterização morfológica e morfométrica (MATEUS, 2013).

Esta pesquisa objetiva estudar o comportamento biológico do tecido ósseo do equino após implantação do polímero de mamona em ostectomia de III metacarpiano e, para tanto, utilizará métodos de imagem como ultrassonografia, *Power Doppler* e termografia além de métodos laboratoriais de análise do perfil bioquímico e histologia de material descalcificado. Pretende-se consolidar o uso deste substituto ósseo para uso futuro na rotina cirúrgica de tratamento de fraturas em equinos.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

O material apresentado a seguir referencia pesquisas atuais e relevantes da literatura sobre biologia óssea, biomateriais e polímero de poliuretano de mamona.

2.1 Biologia óssea

O osso é tecido vivo que sofre remodelamento durante a vida através da reabsorção por osteoclastos e formação por osteoblastos. Em condições normais, a reabsorção e a formação óssea são processos intimamente ligados que sempre ocorrem na mesma sequência e são executados por um grupo de osteoclastos e osteoblastos, que formam a unidade básica multicelular (BMU) (KLEIN-NULEND et al., 2005; NAKAHAMA, 2010; ROSENBERG, 2010).

2.1.1 Anatomia óssea

O osso faz parte do grupo de tecidos conectivos. Estes são caracterizados por serem compostos de células e matriz extracelular. A matriz, no caso do osso, apresenta componente orgânico predominantemente colágeno e componente inorgânico, principalmente hidroxapatita (GOODSHIP; SMITH, 2004).

Os membros torácicos no equino, quando em estação, suportam aproximadamente 55-60% da massa corpórea. Nesta espécie, somente está presente o II, III e IV ossos metacarpianos (Mtc), sendo que II e IV Mtc são reduzidos em tamanho. O osso III metacarpiano é bem desenvolvido e suporta grande parte do peso atribuído ao membro torácico (BUDRAS; SACK; RÖCK, 2009).

Os ossos longos, como III Mtc, podem ser divididos em três regiões: epífise, metáfise e diáfise. Estas regiões apresentam diferentes arranjos morfológicos do tecido ósseo. As regiões epifisária e metafisária são compostas por fina camada cortical de osso compacto suportada por camada interna de osso esponjoso. Este arranjo interno do tecido ósseo trabecular está preenchido com medula óssea ou gordura (GOODSHIP; SMITH, 2004).

O arranjo do tecido ósseo na região diafisária é marcadamente diferente. Esta região é similar a um tubo e a parede é composta por osso compacto, com diferentes espessuras e cavidade medular contendo vasos sanguíneos, medula e gordura. Este arranjo do osso reflete em diferente padrão mecânico de transmissão de carga quando comparado com ossos curtos onde, além da carga compressiva, geram-se através da participação de tendões e ligamentos, momentos de torção e flexão (GOODSHIP; SMITH, 2004).

Estes dois tipos de arranjos do tecido ósseo podem ser diferenciados histologicamente por suas propriedades mecânicas, estruturais e biológicas em osso imaturo (primário) e maduro (lamelar). Estes possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz óssea, porém apresentam diferente organização tridimensional em suas fibras colágenas (PURICELLI et al., 2010).

2.1.2 Estrutura do tecido ósseo

O tecido ósseo adulto inclui três grandes populações de células, cada uma com papel funcional específico, mas todas interagindo entre si e também com a matriz extracelular. Estes três tipos de células especializadas são: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. A interação coordenada de atividade destas células aperfeiçoa a morfologia do osso em relação às mudanças de demanda mecânica (GOODSHIP; SMITH, 2004).

Os osteoblastos são células que formam tecido ósseo, derivam das células mesenquimais indiferenciadas, as quais proliferam e iniciam o processo de diferenciação em osteoblastos, em resposta a complexo sistema de sinalização. Estas células são responsáveis pela osteogênese, ou seja, pela síntese, secreção, maturação e mineralização da matriz orgânica. Além de

sintetizar e excretar colágeno tipo I, também produzem outras proteínas não colágenas encontradas na matriz, como sialoproteína óssea, osteopontina, osteonectina, osteocalcina, proteína óssea morfogenética (BMP), proteoglicanos, entre outras (DUCY; SCHINKE; KARSENTY, 2000; MARKS; ODGREN, 2002).

Todas as superfícies ósseas nas quais não está ocorrendo formação e deposição de matriz, nem reabsorção óssea, são recobertas por osteoblastos em repouso, denominadas, por isso, células de revestimento ósseo. Estas células são achatadas, lembrando epitélio pavimentoso simples, pois recobrem continuamente o tecido osteóide e separam a matriz óssea dos tecidos circundantes. Por serem osteoblastos em repouso, estas células possuem receptores, no domínio basolateral da sua membrana plasmática, para vários fatores reguladores de sua atividade, podendo assim, voltar à atividade, tornando-se osteoblastos ativos (ARANA; BRADASCHIA, 2012).

O osteoblasto ao envolver-se completamente na matriz óssea calcificada, fica aprisionado em cavidades denominadas lacunas, diferenciando-se deste modo em osteócitos. Os osteócitos possuem núcleo esférico rodeado por escasso citoplasma e com poucas organelas, refletindo seu baixo metabolismo. Apresentam longas projeções citoplasmáticas que delimitam canalículos intercomunicantes constituindo rede de comunicação entre as células e a superfície óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ROSENBERG, 2010). Existe tanto no osso compacto como no osso esponjoso, intensa movimentação de fluido ósseo no interior da matriz mineralizada, cuja composição é semelhante à do plasma sanguíneo e pelo qual chegam os nutrientes a todos os osteócitos (ARANA; BRADASCHIA, 2012).

Durante décadas, osteoblastos e osteoclastos foram considerados protagonistas da remodelação óssea e, por esse motivo, foram mais estudados do que osteócitos, porém estes correspondem a 90-95% de todas as células ósseas. Investigando o comportamento dos osteócitos, observou-se que, assim como osteoblastos, eles também respondem ao estímulo mecânico, exibindo a ativação das mesmas proteínas presentes nos osteoblastos (BUCKWALTER et al., 1996; BONEWALD, 2006).

Embora ainda não exista nenhuma comprovação científica, é amplamente divulgado que os osteócitos são as células que instrumentam a

remodelação óssea (DUNCAN; TURNER, 1995; BONEWALD, 2006), liberando mediadores bioquímicos que regulam a atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Seguindo esta teoria, observou-se que osteócitos produzem prostaglandinas – mediadores da atividade dos osteoblastos e osteoclastos – mais rápido do que osteoblastos, após estímulo mecânico (KLEIN-NULEND et al., 1995). Osteócitos submetidos ao fluxo de fluido estimulam atividade osteogênica dos osteoblastos (TAYLOR et al., 2007). Espera-se que osteoblastos sejam sensíveis ao estímulo mecânico, uma vez que osteócitos derivam dessas células (GUSMÃO; BELANGERO, 2009).

Osteoclastos são células grandes, multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleares. Possuem capacidade de fagocitose de matriz óssea, sendo a principal célula responsável pela remodelação óssea. Diferentemente das células vistas anteriormente, osteoclastos derivam de células precursoras mononucleares, as quais, por sua vez, originam-se de células da medula óssea (ARANA; BRADASCHIA, 2012).

Quando é ativado, o citoesqueleto dos osteoclastos se reorganiza pela ação da proteína intracelular c-Src, estabelecendo polarização da célula e pela qual a face denominada podeossomo se adere a matriz mineralizada. A dissolução de cristais de mineral ocorre pela acidificação do meio, devido ao bombeamento de íons de hidrogênio, que leva a queda do pH inicialmente neutro, para valores entre quatro e cinco. Após a dissolução do mineral, o osteoclasto libera uma série de enzimas proteolíticas, entre elas cisteína protease, serina protease, metaloproteinase, catepsina e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e, posteriormente, os componentes orgânicos degradados são fagocitados (ARANA; BRADASCHIA, 2012).

O perióstio é um tecido conectivo especializado que recobre a superfície externa da maioria dos ossos e serve como região transicional entre osso cortical e as camadas de tecido mole como a musculatura. Os ossos longos exibem superfície periosteal contínua, embora esta superfície possa não estar coberta por camada intacta de perióstio, que está ausente nas superfícies articulares, inserção de tendões e superfície dos ossos sesamóides (ALLEN; HOCK; BURR, 2004). O perióstio é composto por duas camadas distintas, uma camada externa fibrosa composta de fibroblastos, fibras de colágeno, elastina, nervo e rede microvascular, e a camada interna, em contato

direto com a superfície óssea, que contém células progenitoras mesenquimais adultas, células progenitoras osteogênicas diferenciadas, osteoblastos, fibroblastos, microvasos e nervos simpáticos (AUGUSTIN; ANTABAK; DAVILA, 2007). Esta camada fornece células para regeneração de fraturas e crescimento ósseo aposicional (HOHMANN et al., 1986). Em adultos, o potencial para formação óssea do periósteo é reativado por trauma, infecção e também em alguns casos de tumores (MALIZOS; PAPATHODOROU, 2005).

Devido a sua alta vascularização, o periósteo contém pericitos endoteliais em abundância. Os pericitos estão em contato físico com células do endotélio capilar e possuem capacidade para se diferenciarem em numerosos tipos celulares, incluindo osteoblastos. Estas células podem servir como fonte suplementar de células osteoprogenitoras e são importantes na ossificação periosteal devido a sua abundância no periósteo (ALLEN; HOCK; BURR, 2004).

O endósteo é uma camada fina de tecido conjuntivo que reveste a superfície interna do tecido ósseo formador da cavidade medular dos ossos longos e as trabéculas do osso esponjoso, participando da atividade de remodelamento (LIRANI, 2004).

O osso imaturo é tecido altamente celular, relativamente pouco mineralizado que contém grande número de osteócitos irregularmente distribuídos no interior das trabéculas ósseas neoformadas. Caracteriza-se por ter alta velocidade de deposição e reabsorção óssea (30 a 50µm/dia ou mais) e por ter matriz de colágeno desorganizada sem a estrutura lamelar dos sistemas harvesianos (FREITAS, 2001).

O tecido ósseo lamelar substitui gradativamente o tecido ósseo primário pela deposição gradual de estratos ou camadas de matriz. Este se caracteriza por ter formação lenta (0,6µm/dia), alta resistência mecânica e fibras colágenas organizadas em lamelas, dispostas paralelamente umas às outras, em camadas concêntricas em torno de um canal central, denominado canal de *Havers*, por onde passam vasos sanguíneos e nervos, sendo que, cada conjunto destes, forma um sistema de *Havers*. Os canais medulares de *Havers* comunicam-se entre si com a cavidade medular e com a porção externa do osso por canais transversais ou oblíquos, os canais de *Volkman* (FREITAS, 2001; BETTI, 2011).

2.2 Modelamento e remodelamento ósseo

Durante processo de crescimento do osso e adaptação às mudanças de carga, o formato ou arquitetura do osso podem ser alterados por atividade celular. Esta modificação é resultado de processos de reabsorção e formação óssea que ocorrem simultaneamente, mas em diferentes regiões. Este processo é chamado modelamento e permite mudanças na forma tridimensional (GOODSHIP; SMITH, 2004).

Modelamento difere de remodelamento porque, neste processo, a formação óssea não está associada à reabsorção óssea prévia. O modelamento é um processo menos frequente do que o remodelamento e ocorre em indivíduos normais podendo estar aumentado em alguns estados patológicos (BRANDI, 2009).

Remodelamento ósseo é outra característica do osso. Neste processo ocorre a reabsorção de certa quantidade de tecido por osteoclastos, seguida por deposição de novo osso na cavidade formada. Este processo ocorre constantemente durante a vida, a qualquer momento e enquanto aproximadamente 10% da superfície óssea no esqueleto adulto é submetido a ativo remodelamento, os 90% restante estão em quiescência. A duração do ciclo de remodelamento é de aproximadamente seis meses, sendo a maior parte do tempo ocupado pela formação do tecido. Em média, 10% do esqueleto é renovado por remodelamento a cada ano (BRANDI, 2009).

A manutenção da massa óssea é regulada por diversos estímulos, que podem ser agrupados em bioquímicos (fatores de crescimento e hormônios) e mecânicos. A respeito destes últimos, sabe-se que imobilização prolongada e situações de diminuição da gravidade provocam redução da massa óssea. O impacto sobre o tecido ósseo, provocado, por exemplo, pela prática de exercícios físicos, aumenta a massa óssea (GUSMÃO; BELANGERO, 2009).

2.2.1 Efeitos físicos sobre o tecido ósseo

A função primordial do tecido ósseo é suportar a carga do corpo. Segundo a lei de Wolff, esse tecido é capaz de se adaptar às solicitações mecânicas produzidas pelo peso do indivíduo e pelas atividades físicas que podem causar alteração em todo o esqueleto. Em humanos, a deformação sofrida pelo tecido ósseo durante a locomoção varia de 0,04 a 0,3% e raramente excede 0,1% (RUBIN; LANYON, 1984; FRITTON; KENNETH; RUBIN, 2000). Entretanto, estudos *in vitro* mostraram que a deformação necessária para as células ósseas responderem ao estímulo mecânico é 10 a 100 vezes maior do que o necessário para o tecido ósseo como um todo (~1-10%).

Se a mesma deformação relativa (*strain*) usada para estimular células ósseas fosse utilizada no tecido ósseo ele sofreria fratura (DUNCAN; TURNER, 1995; YOU; COWIN; SCHAFFLER, 2001). Esta aparente contradição entre estimulação nos níveis macroscópico e microscópico (celular) foi explicada e justificada pelo modelo matemático experimental desenvolvido por You; Cowin; Schaffler (2001), no qual o sistema canalicular em que as células ósseas (osteócitos) estão inseridas serve como amplificador da deformação mecânica gerada pela atividade física.

O efeito piezoelétrico é a resposta biológica ao estímulo mecânico conhecida há bastante tempo e documentada por Fukada e Yasuda (1957), após observarem produção de carga elétrica negativa em áreas de compressão no osso e de carga elétrica positiva nas áreas de tração (FUKADA; YASUDA, 1957).

Atualmente, sabe-se que o efeito piezoelétrico não é a mecanotransdução, é apenas um marcador do fluxo de fluido. Ele provoca ativação de canais iônicos mecanossensíveis, principalmente os de potássio e de cálcio, induzindo fluxo iônico na célula óssea, que resulta em alteração do potencial da membrana celular, podendo ser positivo (despolarização) ou negativo (hiperpolarização). O que determina intensidade da ativação dos canais iônicos não está claro, mas sabe-se que intensidade e frequência do estímulo mecânico, bem como velocidade do fluxo do fluido, regulam ativação

desses canais. A hiperpolarização está associada à osteogênese, enquanto a despolarização, com reabsorção óssea. Além de regular a resposta celular ao estímulo mecânico, acredita-se que a ativação de canais iônicos transmite, bioquimicamente, deformação mecânica para osteócitos vizinhos, osteoblastos e osteoclastos (GUSMÃO; BELANGERO, 2009).

2.2.2 Considerações sobre equinos

Em fraturas de ossos longos, a expectativa é que a consolidação óssea ocorra em quatro meses nos animais adultos e três meses em potros (LOPES; MARKEL, 2012). O III metacarpiano e III metatarsiano podem ser considerados os ossos mais vulneráveis do corpo do equino, em função de sua localização, formato, função e falta de cobertura por tecidos moles (ORSINI, 2012).

Em cavalos de corrida, as fraturas condilares de III metacarpiano/metatarsiano são consideradas as lesões mais frequentes de ossos longos durante treinamento (JACKLIN; WRIGHT, 2012).

Poucas fraturas no cavalo são fatais considerando-se apenas a perspectiva patofisiológica. Na maioria dos casos, a real causa da morte do equino fraturado é a decisão humana, baseada frequentemente no mau prognóstico para retorno ao mesmo nível funcional, em decorrência do tipo de fratura, complicações e investimento econômico necessário para tratamento adequado (ORSINI, 2012).

O bom prognóstico para retorno ao nível atlético depende primariamente do local e do tipo de fratura, sendo mau prognóstico para fraturas que acometem ossos que suportam carga primária, fraturas completas, fraturas articulares e àquelas que envolvam áreas de inserção de importantes tecidos moles (ORSINI, 2012).

O tratamento de fraturas de ossos longos de equinos ainda é desafiadora. São agregados desafios distintos na espécie, associados com o tamanho, anatomia e locomoção, que contribuem para o prognóstico reservado no tratamento de fraturas em equinos, quando comparado com as demais espécies (LOPES; MARKEL, 2012). Complicações pós-operatórias como

laminite, deformidade angular ou flexural em potros, infecção do foco cirúrgico, falha ou perda do implante metálico e falha do osso contribuem para baixa taxa de sucesso em cirurgias de osteossíntese (McCLURE et al., 2010). Considerando estas dificuldades, é fundamental o conhecimento das propriedades dos diferentes substitutos ósseos que possam auxiliar no tratamento de fraturas, principalmente de ossos longos em equinos (FLORIN et al., 2005). Métodos para acelerar a regeneração de fraturas em equinos tem sido objeto de inúmeras pesquisas com o objetivo de reduzir complicações e melhorar as taxas de sucesso na espécie (LOPES; MARKEL, 2012).

2.2.2.1 Regeneração óssea após fratura

A regeneração de fraturas é um conjunto orquestrado por complexo número de eventos biológicos que recebem sinalização intracelular e extracelular, e seguem sequência temporal definida. Mecanismos moleculares que regulam o desenvolvimento embrionário do esqueleto são reativados durante o processo de regeneração (FERGUSON et al., 1999).

Segundo Martin; Gooi; Sims (2009), durante a regeneração de fraturas, existe equilíbrio entre processo anabólico (formador de osso) e catabólico (reabsorção óssea). Schindeler et al. (2008) sugeriram que a velocidade de consolidação da fratura pode ser determinada por processos não específicos anabólicos e catabólicos. Os eventos são influenciados por numerosos fatores fisiológicos e farmacológicos, no ambiente de reparo, que ditam o ritmo do processo. Os principais eventos envolvem localização, natureza e extensão da lesão, forças biomecânicas atuantes, infecção e/ou doença concomitante, estabilidade da fratura, fármacos, nutrição, saúde do paciente e condições genéticas.

A fratura causa interrupção vascular e distorção da arquitetura medular. O extravasamento de sangue no local da fratura é contido pelos tecidos circunvizinhos e formam o hematoma. Em seguida, fatores de degranulação plaquetária, macrófagos, granulócitos e monócitos infiltram-se no hematoma e entre os fragmentos, combatem os agentes infecciosos e secretam citocinas e

fatores de crescimento que avançam a coagulação para trombo fibrinoso (PAPE et al., 2010). Com a evolução, capilares sanguíneos invadem o coágulo e são reorganizados em tecido de granulação. Macrófagos, células gigantes e outras células fagocíticas removem células degeneradas e outros debris (SCHINDELER et al., 2008; ROSENBERG, 2010). As células-tronco originárias do periósteo, da medula óssea, circulação e tecidos moles circundantes atuam como contribuintes no processo (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008).

A fase de formação de tecido de granulação tem duração média de quatro dias, mediada principalmente por TGF- β_1 liberado a partir da degranulação de plaquetas e macrófagos, exercendo quimiotaxia para macrófagos, estimulando mitose das células tronco mesenquimais, osteoblastos e condroblastos (ROZEN et al., 2007).

A formação do calo fibrocartilagenoso é mediada principalmente por células, como condrócitos e fibroblastos, que formam calo semirrígido capaz de proporcionar suporte mecânico para a fratura e que servirá de suporte para o calo mineralizado, formado mais tardiamente. O calo cartilagenoso é essencialmente avascular, embora sua substituição por osso envolva invasão capilar. Os condrócitos, derivados de células progenitoras mesenquimais, proliferam e sintetizam matriz cartilaginosa até que todo o tecido de granulação seja substituído por cartilagem. Nas fases finais da formação do calo cartilagenoso, os condrócitos sofrem hipertrofia e mineralização antes que ocorra a apoptose (SCHINDELER et al., 2008; RAGGATT, 2010).

O calo cartilagenoso passa pelo processo de remodelamento que envolve remoção gradual da fibrocartilagem, por ação de osteoclastos. Contudo, algumas evidências mais recentes sugerem que esta célula pode não estar envolvida no remodelamento do calo fibrocartilagenoso; assim, é mais provável que o mecanismo envolva processos catabólicos não específicos com contribuição de vários tipos celulares (SCHINDELER et al., 2008).

A formação do calo mineralizado representa o período de osteogênese mais ativo e é caracterizado por níveis elevados de atividade dos osteoblastos e formação de matriz óssea mineralizada. O calo cartilagenoso é gradualmente removido e concomitantemente ocorre a revascularização. O osso novo é

denominado calo rígido e é tipicamente irregular e sub-remodelado (SCHINDELER et al., 2008; ROSENBERG, 2010).

O calo ósseo pode se formar em ausência de modelo de cartilagem, em processo conhecido como ossificação intramembranosa, onde ocorre diferenciação direta das células osteoprogenitoras em osteoblastos ou, durante a fase de desenvolvimento embrionário, pela diferenciação direta de células mesenquimais em osteoblastos (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008).

No processo de ossificação intramembranosa, as células osteoprogenitoras diferenciam-se, rapidamente, em osteoblastos começando a formar espículas de matriz osteóide que depois se mineraliza. A confluência de vários destes centros de ossificação tem como resultado o desenvolvimento de uma estrutura entrelaçada de trabéculas ósseas, envolvidas por periósteo, que apresentam entre si amplas cavidades ocupadas por tecido conjuntivo frouxo e tecido hematopoiético em desenvolvimento, originando um osso primário com características de imaturidade. Com o aparecimento dos osteoclastos, o tecido ósseo imaturo é gradualmente reabsorvido e substituído por tecido ósseo maduro ou lamelar (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008).

O estágio final do reparo da fratura compreende a remodelação óssea. Inicialmente este processo envolve a conversão de calo ósseo irregular em tecido ósseo lamelar, que é essencial para recuperar a integridade mecânica do osso (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008). A remodelação pode prolongar-se por meses sendo o osteoclasto a principal célula envolvida neste processo. O ambiente ácido desmineraliza a matriz, enquanto as proteinases degradam os componentes orgânicos, tais como o colágeno. Os componentes da degradação são removidos e os osteoclastos podem sofrer apoptose ou retornar a forma não reabsortiva (NAKAHAMA; 2010; ROSENBERG, 2010).

Embora o remodelamento seja impulsionado principalmente pelos osteoclastos, é essencial que a atividade anabólica paralela seja mantida pelos osteoblastos. Além dos processos anabólico/catabólico, a remodelação é modulada por forças mecânicas (SCHINDELER et al., 2008).

2.3 Substitutos ósseos

A regeneração de fraturas com concomitante perda óssea é uma das mais desafiadoras situações em um procedimento reconstrutivo de trauma em todas as espécies, mas especialmente em equinos. O lento metabolismo ósseo do equino e, conseqüentemente, sua lenta formação do calo e ponte óssea entre os fragmentos, faz com que a carga mecânica permaneça quase que exclusivamente sobre os implantes metálicos pelos primeiros dois meses (PERRIER et al., 2008). Apesar da larga variedade de substitutos ósseos disponíveis atualmente (HALL et al., 1999; CAMPOS et al., 2005; ALAM et al., 2007; BETTI et al., 2011), seu uso ainda é pouco frequente no paciente equino em situações não experimentais, sendo mais frequentemente aplicados em pesquisas (COHEN et al., 2012; LOPES; MARKEL, 2012). Os substitutos ósseos são classificados usualmente de acordo com sua origem, mecanismo de ação, comportamento biológico e composição química (DALAPICULA et al., 2006).

Quanto a sua origem, podem ser classificados como: a) autógeno: obtido do próprio paciente; b) aloenxerto ou enxertos homogêneos: obtidos de banco de ossos de doadores da mesma espécie; c) xenoenxerto ou enxerto heterogêneo: provém de doadores de outra espécie; d) aloplásticos: dispositivos de origem sintética utilizados para a implantação em tecido vivo.

Quanto aos mecanismos de ação, podem ser: a) osteoindutores – capacidade de atrair células mesenquimais, que mais tarde se diferenciarão em osteoblastos e isto ocorre em virtude da presença de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) entre seus componentes; b) osteocondutores – servem como arcabouço sustentando estrutura por onde proliferam vasos sanguíneos, trazendo, então, componentes necessários à formação óssea; c) osteogênicos – crescimento ósseo ocorre em função das células viáveis, transferidas junto com o osso; d) osteopromotores – caracterizado pelo uso de meios físicos que promovem o isolamento anatômico do local, permitindo a seleção e a proliferação de grupo de células, predominantemente osteoblastos a partir do leito receptor e, simultaneamente, impedem a ação de fatores concorrentes inibitórios ao processo de regeneração (DALAPICULA et al., 2006).

Os substitutos ósseos podem ser classificados pela forma como interagem com os tecidos adjacentes: a) biotoleráveis – não estabelecem osteointegração verdadeira, levando a formação de cápsula fibrosa, geralmente delgada, acelular e contínua, sendo que a formação do tecido fibroso é interpretada como resposta do tecido ao material, que estimula as células adjacentes a sintetizar, secretar e manter tecido conjuntivo na interface osso/biomaterial; b) bioinerte – ao contrário, estabelecem contato direto como tecido ósseo circundante; c) bioativo – estabelecem osteointegração direta além de interagir com tecidos vizinhos de forma a estimular a proliferação de células, a síntese de produtos específicos e a adesão celular (DALAPICULA et al., 2006).

Dentre os substitutos ósseos encontram-se os biomateriais, que podem ser definidos como sendo todos os materiais destinados a tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Assim, os biomateriais podem ser substâncias ou mistura de substâncias produzidas por interação física ou por reações químicas, que atuam nos sistemas biológicos (tecidos e órgãos) parcial ou totalmente, podendo ser de origem natural ou sintética (WILLIAMS, 1987; RATNER et al., 2004; CHAN et al., 2009).

Há muito tempo a possibilidade de recuperação óssea desperta interesse de pesquisadores, no sentido de desenvolver materiais que possam apresentar características biológicas aceitáveis para serem utilizados como substitutos do tecido ósseo (DA CUNHA, 2012). De maneira geral, o enxerto autógeno é o material mais indicado para preenchimento de defeitos ósseos, visto o potencial osteogênico que o mesmo apresenta. No entanto, nem sempre a utilização deste material é viável, pois há situações em que o tamanho do defeito, desconforto do paciente, tempo de recuperação e ausência do tecido doador suficiente, limitam sua utilização, pois podem apresentar sequelas no sítio doador do enxerto, além da sua qualidade depender da idade e das condições gerais do indivíduo (SCHEPERS, 1991; GRANJEIRO, 1992; JENSEN, 1996).

Devido às dificuldades relacionadas com a obtenção de quantidade ideal de tecido ósseo e com a morbidade do sítio doador, no caso de enxertos autógenos, e com antigenicidade, no caso de enxertos homogêneos e heterogêneos, grande variedade de materiais para preenchimento, denominados

de aloplásticos ou biomateriais, foram desenvolvidos. O grande desafio do estudo dos biomateriais é encontrar um material que tenha alto grau de semelhança com o tecido vivo, de modo que este possa reconhecê-lo como parte de sua estrutura e não como agressor ao seu meio (LEONEL et al., 2004).

Bhatt e Rozental (2012) enfatizaram alguns aspectos que devem ser considerados na escolha entre enxerto ósseo e substituto ósseo, incluindo características físicas do material, viabilidade, morbidade do paciente, imunogenicidade, potencial para transmissão de doença e custos.

Os biomateriais utilizados na reconstrução óssea devem obedecer aos princípios biológicos que norteiam a regeneração óssea. O tecido ósseo está em constante remodelamento e sua massa total depende da relação de equilíbrio existente entre formação e reabsorção óssea (SILVA et al., 2007). Baseado nisso, os substitutos ósseos devem possuir características distintas como biocompatibilidade, biodegradabilidade e osteocondutibilidade. Além disso, devem proporcionar condução de osteoblastos ou de células precursoras de osteoblastos para o sítio lesionado e de fatores regulatórios que promovam esse recrutamento, assim como o crescimento celular neste sítio (LIU; MA, 2004; WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006; CHEN et al., 2009). E ainda, precisam proporcionar estrutura adequada, que servirá de suporte para a neoformação óssea (PRECHEUR, 2007).

Substituto ósseo pode ser considerado ideal quando mimetiza a matriz extracelular do tecido hospedeiro, de forma que ele possa atuar como guia tridimensional para promover multiplicação e migração por parte das células ósseas. Dentre as características importantes, ressalta-se que o material deve ser biocompatível ou bioativo, biodegradado à medida que o processo de reparação ou regeneração ocorre, poroso e permeável, para permitir difusão apropriada, possuir tamanho de poros adequado para crescimento do tipo celular a que se destina, possuir adequada propriedade mecânica para o meio ao qual se destina, oferecer superfície condutiva para aderência celular (RATNER et al., 2004; BRANDL; SOMMER; GOEPFERICH, 2007), resistência à infecção, permanecer estável por longo tempo, radiopaco para visualização através de exame radiográfico e não ser alergênico ou carcinogênico (CONSTANTINO et al., 1991).

Os materiais de origem biológica apresentam uso crescente nas últimas décadas, principalmente na confecção de próteses e órteses (FLEMING; CORNELL; MUSCHLER, 2000; TOMFORD, 2000). Segundo Banwart (1995) os diferentes materiais utilizados para estimular regeneração de fraturas com perda de tecido ósseo ainda possuem limitações na sua aplicação, na sua integração com tecidos vizinhos e na sua resistência e/ou durabilidade.

Ainda não existe o substituto ósseo perfeito que agregue todas as qualidades ideais do enxerto ósseo autólogo, exceto pelas proteínas morfogenética ósseas (BMPs), estes produtos não apresentam rotineiramente capacidade osteogênica ou osteoindutivas, a menos que sejam misturados a enxerto ósseo autólogo. A maioria dos substitutos ósseos tem capacidade osteocondutiva, criando matriz que aloja células que participam do processo regenerativo e também são osteointegrados. Os substitutos ideais são reabsorvidos e têm resistência similar ao osso cortical ou esponjoso, porém, estas características podem variar com o tipo de material. O custo também apresenta grande variação entre os diversos tipos de materiais. O substituto ósseo é mais efetivo nos defeitos ósseos bem vascularizados e com boa cobertura de tecidos moles (CONSTANTINO et al., 1991; RATNER et al., 2004; BRANDL; SOMMER; GOEPFERICH, 2007).

Pela evolução dos biomateriais, identificam-se como os de primeira geração, aqueles considerados bioinertes e cujo foco para seu desenvolvimento era o de não provocar reação de corpo estranho no organismo (HENCH, 1980). A segunda geração traz os conceitos de biocompatibilidade e biodegradabilidade, e a terceira geração, que inclui os materiais capazes de estimular respostas celulares específicas a nível molecular (HENCH; POLAK, 2002). Estas três gerações são interpretadas de forma conceitual e não cronológica, visto que cada uma delas representa evolução nas propriedades dos materiais envolvidos, de acordo com as necessidades e exigências que surgiram (NAVARRO et al., 2008).

Atualmente, para a utilização como substitutos do tecido ósseo, existem diversos biomateriais disponíveis. Eles variam, além de sua composição química (metálicos, cerâmicos, polímeros e compósitos), em sua ação mecânica e configuração espacial (blocos sólidos, lâminas, esponjas porosas e

hidrogéis) (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; ABUKAWA et al., 2006).

2.3.1 Polímeros

Os polímeros são cadeias extensas de unidades monoméricas repetidas, unidas por ligações covalentes, com peso molecular elevado (PARK; LAKES, 2007). As propriedades físico-químicas destes materiais são marcadamente influenciadas por vários fatores, dos quais se destacam: composição química, estrutura, extensão da cadeia macromolecular (peso molecular) e distribuição de tamanhos nas cadeias. Polietileno, polipropileno, poliuretana, ácido polilactídico e polimetilmetacrilato são exemplos de polímeros utilizados como implantes (AFONSO, 1998).

Os polímeros de poliuretana apresentam resistência mecânica à deformação e ruptura, resistência à abrasão e inatividade química e, por estas características, sua utilização como biomaterial está crescendo. São formados por duas unidades químicas diferentes: poliol e diisocianato (JACQUES et al., 2004).

Os polímeros naturais são geralmente biodegradáveis e possuem melhor biocompatibilidade quando comparados aos polímeros sintéticos. Aspectos da estrutura química do material podem ser alterados para se obter respostas biológicas previsíveis, como adição de sítios de ligação (COOK et al., 1997) ou combinação de diferentes moléculas em uma única estrutura, o que pode favorecer a migração celular e/ou adesão de fatores de crescimento. Os polímeros sintéticos são geralmente degradados por hidrólise simples, enquanto que os polímeros naturais são, principalmente, degradados por enzimas (TABATA, 2009). A capacidade de degradação dos polímeros elimina a necessidade de segunda intervenção cirúrgica para remover o implante (AFONSO, 1998).

A utilização de materiais poliméricos apresentam vantagens quando comparados com materiais metálicos, pois a diferença no módulo de

elasticidade entre o implante e o osso é reduzida, diminuindo a tensão de contato que minimiza a reabsorção óssea (AFONSO, 1998).

2.3.1.1 *Poliuretana de mamona*

O óleo de mamona possui, em sua composição, 90% de triglicerídeo derivado do ácido ricinolêico, que é ácido graxo hidroxilado e pouco frequente nos óleos vegetais, sendo os outros 10% constituídos de ácidos graxos não hidroxilados, tais como ácido linoléico (4,2%), ácido olêico (3%), ácido estereático (1%), ácido palmítico (1%), ácido dihidroxiesteárico (0,7%), ácido linolênico (0,3%) e ácido eicosanáico (0,3%) (PEREIRA, 2010).

O desenvolvimento das poliuretanas utilizadas em enxertos derivados de óleo de mamona iniciou na década de 1940 (BAADSGAARD, 1970; BOER, 1988; BONINI, 1999), quando foram sintetizados polímeros para aplicação em tintas e vernizes. Os primeiros relatos sobre a utilização de poliuretanas em aplicações médicas descrevem a implantação de espuma rígida de poliesteruretana para fixação de osso *in situ*. A expectativa inicial era que este material fornecesse suporte estrutural até o novo crescimento ósseo. Estudos subsequentes demonstraram que a espuma rígida de poliesteruretana fornecia suporte estrutural inadequado, com pouca promoção do crescimento ósseo, adesão pobre, alta incidência de infecção e degradava *in vivo* (PEREIRA, 2010).

A poliuretana derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*) é polímero natural, apresenta fórmula molecular que tem demonstrado compatibilidade com os tecidos vivos, com aspectos favoráveis de processabilidade, flexibilidade de formulação, notáveis propriedades estruturais, ausência de emissão de vapores tóxicos, bom poder de adesão e baixo custo. Leva à formação de composto com baixo índice de resíduos e grande gama de estruturas físicas, apresentando variações de resistência, densidade, consistência e porosidade, permitindo variações no processo de osteocondução. A poliuretana também tem a vantagem de polimerização com baixa exotermia (40-45 °C), enquanto outros polímeros têm reações

exotérmicas que atingem 50-100 °C, o que provoca necrose celular do tecido ósseo (PROUBASTA; MUR; PLANELL, 1997; KHAN, 2000).

De acordo com Mazzer (1995) a resina poliuretana, preparada com polímero do óleo da mamona, apresenta propriedades autoesterilizante sendo este dotado de propriedades bactericidas e apresentando potencial de utilização como antisséptico.

Estudos mostraram que a integração da poliuretana de mamona depende de uma série de fatores, como forma de preparação e a consequente forma física final para o implante. A polimerização do composto, dentro ou fora do sítio de implante pode gerar diferenças importantes na sua integração (PROUBASTA; MUR; PLANELL, 1997; DAVIES, 2000; FLEMING; CORNELL; MUSCHLER, 2000; KHAN, 2000; VACCARO et al., 2002).

A adição de carbonato de cálcio na composição do polímero tem por objetivo conferir melhor padrão de resistência e elasticidade em relação ao tecido ósseo (CLARO-NETO, 1997). Além disso, esta associação tem a função de fornecer íons cálcio, facilitando a troca iônica na interface de contato osso-polímero, com depósito desses íons na matriz colágena (IGNÁCIO et al., 1997; KHARMANDAYAN, 1997).

Em 1999, a poliuretana derivada do óleo de mamona desenvolvida pelo Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, campus de São Carlos (GQATP), foi aprovada pelo Ministério da Saúde do Brasil, como biomaterial e em junho de 2003, passou pelos testes de aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA), agência do governo Norte Americano responsável pela liberação de novos alimentos e medicamentos.

O grupo americano *Doctors Research Group Inc.*, comercializa o produto como *Kryptonite Bone Cement* e, de acordo com informações fornecidas pelo próprio grupo, desde 2007, foram realizados mais de 10.000 procedimentos utilizando o polímero, que continua sendo estudado em inúmeras pesquisas para diferentes aplicações. Fedak et al. (2011) apresentaram resultados clínicos de sua aplicação em 30 pacientes humanos, no fechamento primário do esterno após cirurgias torácicas. Os resultados apresentados pelos autores descrevem o material como biocompatível e apresentando rígida fixação óssea e estabilidade.

Uma das principais características apresentadas pelo polímero de mamona é sua arquitetura interna porosa (LEONEL et al., 2003). A existência de porosidade nos implantes, seu diâmetro, conformação e presença de intercomunicação são características importantes que regulam a migração vascular e celular para o interior destes implantes, permitindo neoformação óssea (CAMPOS et al., 2005).

A poliuretana sintetizada a partir do óleo de mamona é um biomaterial que vem sendo amplamente estudado para aplicação na área médica, demonstrando adequadas propriedades mecânicas (CLARO-NETO, 1997). Além disso, é biocompatível quando em contato com culturas de células e tecido conjuntivo, e quando empregada sob a forma de implantes ou enxertos (COSTA et al., 1997; FRASCINO, 1998; ARA, 1999; BONINI, 1999; BONINI et al., 2002a, b; LAUREANO FILHO et al., 2007; CELESTE et al., 2010), em leitos subperiósticos (PURICELLI et al., 1999) ou em tecido ósseo (CARVALHO et al., 1997; KONIG JR et al., 1999; TEIXEIRA; RAMALHO, 1999; GARCIA JR, 2000; CAVALIERI; SÁ-LIMA; GOMES, 2001; INÁCIO et al., 2002; SOUZA; BRANDT; LIMA, 2002; DEL CARLO et al., 2003; LEONEL et al., 2003; RIBEIRO, 2003; LEONEL et al., 2004; POPAK et al., 2004; SARAN, 2006). De acordo com Ignácio et al. (2002), por ser ácido graxo, tem comportamento de lípide, permitindo sua degradação por mecanismo de lipólise.

Devido ao grande potencial de uso deste biomaterial, Garcia et al. (2009) testaram a toxicidade da ingestão de derivado do polímero de mamona em ratos. De acordo com esta pesquisa, o alcalóide denominado rícina, princípio tóxico da semente de mamona, quando administrado por via oral, pode provocar gastroenterite, diminuição do apetite e até anorexia, vindo a apresentar quadro clínico-patológico de ordem nervosa. Segundo os autores desta pesquisa, a ausência de efeitos tóxicos e de má formação devido à ingestão do polímero de mamona, por ratos, deve ser vista com ressalvas pelo pequeno número de informações encontradas na literatura.

Diversas pesquisas relataram a ausência de reações inflamatórias (OHARA et al., 1995) e sinais clínicos de rejeição quando o polímero de mamona foi utilizado como prótese (REZENDE et al., 2001; MARIA et al., 2004; BOLSON et al., 2005) ou substituto parcial de tecidos (GERMANI et al., 1998; MARIA et al., 2004; MORALES et al., 2005). A interação do polímero com

diferentes tecidos corpóreos e com outras substâncias adjuvantes deve, entretanto, ser mais bem discutida e estudada sob o ponto de vista toxicológico (GARCIA et al., 2009).

Pascon et al. (2000a, b) analisaram a citotoxicidade da resina poliuretana derivada do óleo de mamona. Para tal, a toxicidade do polímero do óleo de mamona (poliol) foi comparada a outras quatro marcas comerciais de cimentos endodônticos (AH 26[®], Dentinol[®], Kerr Sealer[®] e Sealapex[®]). O método utilizado para avaliação foi de liberação de crômio radioativo em cultura de células L929, *in vitro*. Foram testadas dez amostras de cada material, por quatro e 24 horas de contato material/células. O teste mostrou que o polímero não apresenta comportamento tóxico com relação às células utilizadas.

Bonini et al. (2002b), em pesquisa que testou a citotoxicidade e a ativação de macrófagos em resposta a presença da poliuretana derivada da mamona, demonstraram, através da cultura de macrófagos peritoneais de camundongos isogênicos C57/BL/6 e por meio de análise espectrofotométricas, o material-teste revelou-se não citotóxico ao interagir com os macrófagos em cultura e foi constatado que, embora tenha induzido a liberação de NO em níveis relativamente baixos, não ativou macrófagos para a produção de H₂O₂.

2.3.2 Interação entre osso e biomaterial

A configuração do material influencia na diferenciação óssea ou fibroblástica do tecido. A proliferação de osteoblastos é sensível à topografia da superfície, tensão e outros estímulos mecânicos. Tamanho da partícula, forma e rugosidade da superfície influenciam na adesão e proliferação celular. Essas características de superfície são particularmente importantes quando se considera material absorvível, uma vez que esse material é dinâmico, sempre apresentando alteração da superfície (BOYAN et al., 1996).

A superfície do material é o local que primeiro entra em contato com fluidos orgânicos e, com o decorrer do processo, é a área onde irão ocorrer todos os fenômenos envolvidos no processo regenerativo, que levam a manutenção e ao sucesso clínico do implante (AFONSO, 1998).

A resposta biológica inicia logo após a implantação do material, com formação de hematoma, resposta inflamatória com recrutamento de água e glicoproteínas, que revestem e se aderem ao implante, fenômeno conhecido como adsorção. Este processo é dinâmico e sujeito a mudanças com o tempo e com a atividade das células. Por quimiotaxismo, numerosas células são recrutadas para o local, incluindo neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos (reação a corpo estranho). Estas últimas, além da atividade fagocítica, estimulam ação dos linfócitos, fibroblastos, osteoclastos e células polimorfonucleares.

Em seguida, inicia-se a angiogênese, com migração e proliferação de células endoteliais, que vão formar rede de capilares, formando o suporte vascular. Por fim, devido ação das citocinas (IL-1 e IL-2) e dos diversos fatores de crescimento (TGF- β , PDGF, IGF, BMP's), ocorrerá processo de diferenciação das células mesenquimatosas pluripotenciais, com a formação de matriz óssea e de osso imaturo (MASUDA et al., 1998; DAVIES, 2000). A ancoragem das células requer a presença de proteínas de ligação específicas, enquanto a proliferação e diferenciação requerem que fatores de crescimento e citocinas estejam presentes (BOYAN et al., 1996).

A arquitetura vascular cortical será danificada pelo trauma cirúrgico independentemente da geometria do implante. No córtex, ocorrerá, a princípio, necrose do tecido ósseo. Somente através de remodelamento ósseo ocorrerá, posteriormente, substituição do osso peri-implante, com a possibilidade de formação de novo tecido ósseo na superfície do implante (DAVIES, 1996).

Após a implantação, podem-se estabelecer dois tipos de integração osso/implante: osteointegração direta, quando se estabelece contato direto entre o osso e a superfície do implante e osteointegração indireta ou fibrosa, que ocorre quando cápsula fibrosa se interpõe entre o implante e a superfície do osso (LEGEROS; CRAIG, 1993).

Existem duas possíveis formas pelas quais as células ósseas migram para a superfície do implante: na primeira, as células vêm diretamente da trabécula vizinha e na segunda, as células migram através da matriz tridimensional. O primeiro método é o menos provável, uma vez que a trabécula vai estar danificada pelo trauma cirúrgico e a superfície estará coberta com proteínas adsorvidas. No segundo método, ou seja, migração

através da rede tridimensional, é preciso que a superfície do implante ancore a esta rede. A ancoragem é necessária para suportar as contrações de tecido que ocorrem quando há remodelamento (DAVIES, 1996).

As células interagem com o meio através de proteínas de adesão específicas. As células mesenquimais tendem a usar fibronectina para ancorá-las ao colágeno de sua matriz extracelular. A fibronectina é sintetizada pelas células de origem mesenquimal e está presente no soro do local do trauma cirúrgico (REDEPENNING, 1996).

Dentre as moléculas envolvidas no processo de remodelamento tecidual, que ocorre no tecido ósseo em contato direto ou indireto com biomateriais, podem-se citar as metaloproteinases da matriz (MMPs), enzimas-chave para o metabolismo do colágeno, tanto em condições fisiológicas como nas alterações patológicas (PAGE-McCAW; EWALD; WERB, 2007; KRANE; INADA, 2008).

2.3.2.1 Biocompatibilidade

Biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade do material em ter resposta apropriada em uma aplicação específica, minimizando reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com tecidos vivos ou fluidos orgânicos. A biocompatibilidade pode ser avaliada através de estudos *in vitro*, *in vivo* e/ou *ex vivo* (EL-WARRAK et al., 2004; DONTOS, 2005; JUNG et al., 2005; MENEZES; FREITAS; GONÇALVES, 2009) e compreende a interação dos tecidos e fluidos, incluindo sangue, com o implante. As interações podem vir da ação do material no corpo ou do meio fisiológico sobre o material (EDMUNDS, 1985; RATNER et al., 2004; JALILI et al., 2009).

Nos implantes ortopédicos, biocompatibilidade apresenta dualidade, pois o material não pode alterar adversamente o ambiente ao redor, ao mesmo tempo em que o material não pode ter suas características alteradas pelos tecidos ou fluidos do hospedeiro (ADRIÃO, 2011). Ao ser introduzido no organismo, o implante produz reação inflamatória. Se o polímero for biotolerável, a inflamação será pequena e ele será encapsulado por tecido fibroso. A estrutura e o peso molecular, a solubilidade, a existência de cargas

elétricas superficiais e a toxicidade dos subprodutos oriundos da degradação dos polímeros determinam a extensão da reação inflamatória. A reação inflamatória será maior quanto mais solúvel (biodegradável) for o polímero, podendo persistir enquanto o polímero estiver presente (MARIOLANI; BELANGERO; ARRUDA, 1993).

A biocompatibilidade de polímeros envolve normalmente quatro fenômenos: concentração das biomacromoléculas junto à superfície dos materiais (adsorção), após implantação destes no corpo; resposta local do tecido à presença do biomaterial (respostas inflamatórias e imunológicas); efeito do ambiente corpóreo no material (processos de degradação do polímero); resposta do corpo como um todo à presença do biomaterial (aparecimento de tumores, alergias ou imperfeições generalizadas) (RATNER et al., 2004; DAREA et al., 2009).

Nenhum material implantado em tecidos vivos pode ser classificado como inerte, uma vez que sempre ocorrerá algum tipo de resposta, mesmo que pequena. Há quatro tipos de respostas teciduais possíveis, como consequência da presença do material (RATNER et al., 2004): a) Se o material é tóxico, o tecido circunvizinho morre; b) Se o material é não tóxico e dissolve ou é decomposto, o tecido o substitui; c) Se o material é não tóxico e biologicamente inativo, cápsula fibrosa se forma em torno do material implantado; d) Se o material é não tóxico e biologicamente ativo, há a formação de interface contínua entre o tecido e o material implantado (AFONSO, 1998).

2.3.2.2 Biofuncionalidade

O comportamento funcional de um biomaterial é conhecido como biofuncionalidade e descreve o comportamento do material implantado no organismo. Biofuncionalidade refere-se a propriedades mecânicas e físicas que permitem ao implante desempenhar funções esperadas (BOSS et al., 1995).

O biomaterial além de cumprir função mecânica específica quando implantado, precisa ter propriedades compatíveis com o tecido vivo tendo

capacidade de realizar função desejada semelhante ao tecido ao qual está substituindo (MATEUS, 2013).

2.3.2.3 Osteointegração

Inicialmente o termo osteointegração era definido como contato direto, detectado por microscopia óptica, entre osso e implante. Com a evolução dos recursos e meios de análise, que permitem maiores ampliações e maior observação de detalhes, este conceito precisou ser revisto, pois muitas vezes não existe contato real entre osso e material, apenas contato físico. O conceito de osteointegração é baseado na definição histológica, sendo apenas parcialmente observada através de avaliação clínica e radiográfica. Sendo assim, a afirmação de osteointegração apenas através da avaliação do exame clínico e radiográfico é incorreta (AFONSO, 1998).

2.4 Estudos em equinos

O uso de enxerto ósseo autógeno em equinos apresenta grande número de indicações, como para melhorar estabilidade de osteossíntese ou artrodese, além de auxiliar no preenchimento de defeitos ósseos. Apesar de haver grande quantidade de áreas onde o enxerto pode ser colhido, existem algumas limitações que podem dificultar seu uso. Entre elas, deve-se considerar a morbidade da região doadora (deiscência de pontos, dor e fraturas), aumento no tempo cirúrgico, possibilidade de haver necessidade de segunda equipe cirúrgica e, em caso de banco de ossos, redução da viabilidade do enxerto em casos de grande período de armazenamento (KAWCAK et al., 2000).

Foi comparado por Kawcak et al. (2000) a regeneração óssea com uso de matriz óssea desmineralizada e enxerto autógeno de osso esponjoso em defeito induzido na costela de equinos. O local de implantação foi biopsiado após 56 dias. Não foi observada consolidação da região. Houve melhor

resultado, com maior crescimento ósseo, no grupo tratado com enxerto autógeno.

Perrier et al. (2008) compararam a eficácia de BMP associada a cimento de fosfato de cálcio em ostectomia de II e IV metatarsiano de equinos. Os animais foram avaliados clinicamente por 12 semanas. Na análise histológica houve maior formação de osso maduro nas falhas preenchidas com material, em relação à falha controle.

Dornbusch et al. (2010) testaram comportamento do polímero de mamona aplicada em falhas ósseas induzidas de 8mm de diâmetro em rádio de equinos. Foram realizadas avaliações clínicas e radiográficas. Segundo os autores, a presença do biomaterial retardou a regeneração óssea sob ponto de vista radiográfico.

Ishihara et al. (2010) testaram a aceleração no processo de regeneração óssea utilizando injeções percutâneas de fibroblasto autólogo em osteotomia transversal de 0,1mm de IV metacarpiano e IV metatarsiano. Após seis semanas foi realizado estudo histológico do material, onde foi possível demonstrar que a terapia acelerou a regeneração na região do defeito.

McDuffee et al. (2012) compararam a eficácia da regeneração óssea utilizando fibrina (grupo controle) e fibrina associada a células osteoprogenitoras (grupo tratado) de ostectomia de 1cm em IV metacarpo de equinos durante 12 semanas. Não foi encontrada diferença estatística entre o membro controle e o membro tratado.

Cohen et al. (2012) testaram a eficácia na osteocondução e a biocompatibilidade de esponjas a base de hidrogel de tiolato como substituto ósseo em defeitos ósseos induzidos em II e IV metacarpianos de equinos. Durante o período de avaliação os animais apresentaram boa recuperação e ausência de claudicação. O material apresentou bons resultados, sendo considerado promissor para uso na espécie.

2.5 Escolha do modelo experimental

Muitos modelos experimentais são utilizados para estudar o processo de consolidação de fraturas, no entanto, devido às diferenças anatômicas, biológicas e técnicas, nem sempre tais modelos possuem parâmetros adequados para a espécie de interesse final, para a qual se realiza o experimento (LACRETA JR et al., 2010). Segundo Southwood et al. (2006) o modelo experimental é fundamental para avaliação objetiva do efeito de um novo método de tratamento na regeneração óssea em equinos.

Estudos que investigam a interação entre osso-implante, as características da biologia óssea de cada espécie, microestrutura e composição do osso, bem como as propriedades de regeneração e do remodelamento são fundamentais (PEARCE et al., 2007).

Estudos realizados em coelhos demonstraram, ao exame macroscópico, presença de tecido fibroso e, posteriormente, recobrimento por osso quando se utilizaram corpos de prova de poliuretana de mamona. Quando aplicado em cães, o recobrimento do polímero ocorreu apenas por tecido fibroso. Baseado nestes achados, foram identificados indícios de que este material se comporta de diferentes maneiras entre as espécies e somente a pesquisa na espécie alvo pode trazer resultados fidedignos para uso de um biomaterial (MARIA; PADILHA FILHO; CASTRO, 2003).

2.6 Métodos de avaliação da regeneração óssea

Determinar o momento exato da consolidação da fratura pode ser difícil. A avaliação clínica requer detalhada consideração sobre numerosos fatores incluindo injúria inicial, período padrão de regeneração, dor no foco de fratura, palpação do calo, claudicação e estabilidade no exame manual (LOPES; MARKEL, 2012).

O uso de métodos laboratoriais, que permitam avaliação do metabolismo ósseo de maneira confiável, rápida e prática, tem sido foco de pesquisas atualmente (SOUZA et al., 2011).

Existem inúmeras técnicas para a avaliação do tecido ósseo de equinos. O exame radiográfico é o método mais frequentemente utilizado na prática clínica para avaliar o processo de consolidação óssea. A ultrassonografia permite a avaliação do calo fibroso, enquanto que a radiografia não permite tal avaliação, sendo assim, pode-se dizer que a ultrassonografia permite avaliação mais precoce do processo de consolidação, quando comparado à radiografia. A utilização da ultrassonografia associada ao *Power Doppler* permite identificação e monitoramento da evolução vascular no foco da lesão. Outros métodos que podem ser utilizados são tomografia computadorizada, ressonância magnética e cintilografia (POZZI; RISSELADA; WINTER, 2012; CHEN et al., 2014).

Avaliação histológica permite análise de densidade e arquitetura óssea, fornecendo dados quantitativos e qualitativos, como contagem de células (HERNANDES et al., 2012). Albertin (2004), Guskuma et al. (2013) (no prelo)¹ ressaltaram que a análise morfométrica pode expressar a quantidade de tecido ósseo e a taxa de formação ou reabsorção óssea.

2.6.1 Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo

Pode-se definir marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo como substâncias que retratam a formação ou a reabsorção óssea. Como a formação é dependente da ação dos osteoblastos, os marcadores de formação, na realidade, avaliam produtos decorrentes da ação destas células e consequentemente, são todos oriundos de síntese osteoblástica (VIEIRA, 1999).

¹ GUSKUMA, M. H.; HOCHULI-VIEIRA, E.; PEREIRA, F. P.; RANGEL-GARCIA, I.; OKAMOTO, R.; OKAMOTO, T.; MAGRO FILHO, O. Evaluation of the presence of VEGF, BMP2 e CBFA1 proteins in autogenous bone graft: histometric and immunohistochemical analysis. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**. In press. (Aceito para publicar em 09/08/2013).

Enquanto exames como radiografia e densitometria óssea fornecem informações primariamente sobre a macroestrutura óssea, integridade, quantidade e resultado final da consolidação, somente marcadores bioquímicos podem fornecer panorama dinâmico sobre processos adjacentes do remodelamento ósseo, como o *turnover* ósseo e podem, inclusive, sugerir se o processo está dentro do tempo esperado ou se a consolidação será tardia (MUKHOPADHYAY et al., 2011).

Os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo (MOB) são separados em três categorias: as enzimas ou proteínas secretadas pelas células envolvidas na remodelação, os produtos da quebra do colágeno e os produtos oriundos da síntese de novo osso. Esses marcadores refletem o estado geral da remodelação, mas são, em geral, classificados de acordo com as situações nas quais estão mais elevados (WATTS, 1999). Por exemplo, tem sido observado aumento da atividade da fosfatase alcalina na região de formação do calo pouco tempo depois da fratura e esta alteração pode ser refletida nos níveis de fosfatase alcalina sérica (MUKHOPADHYAY et al., 2011).

Komnenou et al. (2005) estudaram a correlação da atividade da fosfatase alcalina sérica com o processo de regeneração óssea em ossos longos de cães. O estudo foi baseado em casos clínicos de fraturas fechadas completas de ossos longos. Foram colhidas amostras para dosagem sérica de fosfatase alcalina, cálcio e fósforo, nos períodos de 10, 20, 30 dias do pós-operatório e mensalmente, até consolidação da fratura. Os animais estavam distribuídos em três grupos, sendo o primeiro sem complicação na consolidação; o segundo, consolidação com atraso e formação de calo hipertrófico; e o terceiro grupo, grande atraso e visualização da linha de fratura após dois meses.

Os resultados da pesquisa demonstraram padrão semelhante na mudança da atividade da fosfatase alcalina sérica no primeiro e segundo grupo, com pico em 10 dias após a cirurgia e gradual redução a partir deste período. No terceiro grupo não houve mudanças na atividade da enzima. O trabalho concluiu que em fraturas de ossos longos de cães a mensuração seriada da fosfatase alcalina sérica, durante processo de regeneração e em

combinação com exames radiográficos e avaliação clínica, pode ser ferramenta útil para prever risco de desenvolver não união (KOMNENOU et al., 2005).

2.6.2 Exame ultrassonográfico

A ultrassonografia (US) pode ser utilizada para avaliar casos de consolidação indireta de fraturas (CHEN et al., 2014). Esta forma de regeneração depende do desenvolvimento de calo formado a partir do hematoma e tecido de granulação, que originam o calo fibroso e que posteriormente será submetido à mineralização. A ultrassonografia permite avaliação do calo fibroso, enquanto que o exame radiográfico não é capaz de realizar tal avaliação, reforçando sua precocidade quando comparado ao exame radiográfico (CRAIG; JACOBSON; MOED, 1999; RISSELADA et al., 2007). Segundo estudo realizado em humanos por Blane; Herzenberg; DiPietro (1991), imagens ultrassonográficas revelaram neoformação óssea três semanas antes das imagens radiográficas a detectarem.

Apesar do exame radiográfico ainda ser o método mais largamente utilizado para quantificar regeneração óssea, esta técnica falha no momento de avaliar tecidos moles ao redor do foco de fratura, o que é importante durante o desenvolvimento do calo ósseo fibroso. Recentes estudos têm indicado que a US é método sensível e acurado para detecção precoce do processo de regeneração em fraturas diafisárias de ossos longos em pesquisas clínicas (POZZI; RISSELADA; WINTER, 2012).

Estudo realizado por Craig; Jacobson; Moed (1999), que acompanharam a consolidação da tíbia de cães após osteossíntese, através de exame ultrassonográfico, descreveram o processo regenerativo como progressivo aparecimento de tecido hiperecótico (presumindo a formação do calo) preenchendo o foco de fratura. A união óssea, utilizando critérios de padrão ultrassonográfico, foi obtida em 5,6 semanas, enquanto o padrão radiográfico de consolidação foi visualizado em 7,3 semanas.

Nesta pesquisa os autores concluíram que apesar da ultrassonografia não ser a principal modalidade diagnóstica para acompanhamento de fraturas, o conhecimento da aparência típica da fratura no exame ultrassonográfico pode

auxiliar em casos onde não há clareza no diagnóstico radiográfico. Com relação à regeneração óssea, o trabalho descreveu a facilidade na visualização do calo e salientou a antecipação da identificação com relação ao exame radiográfico, inclusive com relação à consolidação da fratura, sendo esta identificada primeiramente através do exame ultrassonográfico (CRAIG; JACOBSON; MOED, 1999).

2.6.2.1. Avaliação Power Doppler da neovascularização durante a regeneração óssea

Durante o processo de regeneração, ocorre o desenvolvimento de novos vasos oriundos dos tecidos moles adjacentes ao foco da fratura e ocorre também, hipertrofia de vasos pré-existentes. Esta hipervascularização irá regredir quando a estabilidade e a continuidade da cavidade medular for reestabelecida (RISSELADA et al., 2007).

A angiogênese tem papel chave para consolidação da fratura. Novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes para o aumento da atividade metabólica durante o período de regeneração e formação do calo, e servem como rota para células inflamatórias, células precursoras de cartilagem e osso, que chegam ao local da injúria (CARUSO et al., 2000; HANKENSON et al., 2011). Imediatamente após a injúria, o volume do leito vascular do tecido torna-se aumentado devido à vasodilatação.

A vasodilatação contribui para o desenvolvimento de edema e tumefação no membro acometido, porém, também contribui para a formação do hematoma, que servirá posteriormente como molde para a formação do “calo vascular” (HANKENSON et al., 2011). Segundo Caruso et al. (2000), estudos histológicos indicaram que uma das mudanças mais precoces durante a nova formação óssea é o desenvolvimento de pequenos vasos sanguíneos, sendo a imagem em *Power Doppler* capaz de avaliações mais precoces que a imagem ultrassonográfica em escala de cinza.

Dentro das modalidades de avaliação por imagem não invasivas do processo de regeneração, o *Power Doppler* pode ser utilizado para reconhecer

padrão vascular de imagem, porém, esta técnica exige do examinador conhecimento prévio do processo que ocorre durante os fenômenos fisiológicos do processo regenerativo das fraturas (DORIA et al., 2007; RAHIMZADEH et al., 2012).

O *Power Doppler* detecta pequenas áreas com fluxo sanguíneo durante a regeneração óssea, por detectar mudanças na frequência causada pelo movimento de células vermelhas. Este fato demonstra a progressiva formação de novos vasos no osso durante o processo regenerativo inicial. No momento em que o osso sofre remodelamento, há diminuição nestes sinais de fluxo. Este fato é atribuído à redução da penetração de ondas, com aumento na deposição óssea sobre a região acometida. Em contrapartida, a falta de desenvolvimento de sinais de fluxo sanguíneo durante o período inicial da regeneração é atribuído a atraso da regeneração óssea (RAJENDRAN; SUNDARESAN, 2007).

2.6.3 Exame termográfico

O termo imagem térmica refere-se à representação gráfica da radiação eletromagnética emitida por uma superfície, sendo esta transformada em imagem visível (REDAELLI et al., 2014). O termógrafo é o equipamento que realiza leitura de ondas eletromagnéticas de frequências infravermelhas emitidas pela superfície do corpo. O calor é a energia que se transporta por este tipo de onda, portanto, pode ser avaliado por câmeras termográficas. (BASILE et al., 2010).

A temperatura superficial é influenciada pela circulação local e o metabolismo tecidual que geralmente é constante. A alteração na temperatura superficial é causada por mudanças na perfusão local. A vascularização e o suprimento sanguíneo são as bases da representação termográfica. A termografia pode ser considerada método fisiológico, pois permite avaliação em tempo real nas mudanças que ocorrem, criando imagem dinâmica do objeto. Esta característica representa considerável vantagem sobre outras técnicas de imagem que oferecem somente representação estática, como a radiografia,

tomografia ou ressonância magnética. Este método pode detectar temperatura superficial de forma mais objetiva quando comparada ao exame clínico de palpação (HEAD; DYSON, 2001; REDAELLI et al., 2014).

É conhecido que um dos pontos cardeais do processo inflamatório é o incremento de temperatura no local da lesão, devido a este fato, a termografia é valiosa na identificação de inflamação musculoesquelética. Trauma ou lesões teciduais sempre causam mudanças na circulação e a termografia pode detectar o ponto de calor (*hot spot*) que está associado com a inflamação local (BRIOSCHI; MACEDO; MACEDO, 2003; REDAELLI et al., 2014). Cabe ressaltar que o equipamento somente demonstrará as alterações que forem capazes de transmitir o incremento calorífico para a superfície do corpo (BASILE et al., 2010).

Atualmente, existem diversas técnicas para monitorar injúrias ósseas e para estudar o processo de inflamação aguda. A imagem térmica infravermelha é capaz de mensurar a temperatura da pele que reflete o grau de inflamação em tecidos lesionados (RING; AMMER, 2012).

O uso da termografia vem tornando-se gradativamente aceito como método de diagnóstico por imagem em equinos (HOOGMOED et al., 2000; TUNLEY; HENSON, 2004; LEVET et al., 2009; ERBER et al., 2012; REDAELLI et al., 2014). Eddy; Van Hoogmoed; Snyder (2001) descreveram a importância da avaliação termográfica em afecções que acometem o III Mtc/Mtt de equinos, uma vez que estes segmentos ósseos não apresentam recobrimento muscular e a técnica pode detectar alterações antes da manifestação clínica.

2.6.4 Exame histológico

A resposta do tecido ósseo a lesão consiste em uma sequência histológica definida, ordenada e bem diferenciada de arranjos morfológicos, dos quais resulta a regeneração do tecido ósseo lesionado e este apresenta forma bastante semelhante à sua estrutura inicial (NACER et al. 2012). O estudo histológico permite obtenção de resultados nas pesquisas onde se

deseja avaliar a interface tecido ósseo/material implantado, durante neoformação óssea (MATEUS, 2013).

A microscopia de luz tem por objetivo observação e análise microestrutural de materiais sólidos. Fornece imagem plana e sem profundidade e é a ferramenta mais utilizada para caracterização morfológica. A coloração Tricrômico de Masson é uma técnica histoquímica usada para demonstrar fibras de colágeno em contraste com osso e tecidos moles. Assim, é a coloração que permite a identificação e visualização de colágeno no tecido ósseo, permitindo avaliação do grau de maturidade do tecido neoformado (GAMBLE, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.6.4.1 Estudos histológicos da biocompatibilidade do polímero de mamona

Ribeiro (2003) realizou avaliação clínica e histológica do implante poliuretano de mamona em espaço alveolar após exodontia em oito equinos. Os animais foram observados durante 120 dias e, após este período, realizou-se biópsia da região do implante. Na análise histológica, o autor mencionou presença de polímero em dois animais, sendo também descrito formação de osso cortical e trabecular em suas respectivas regiões. Os resíduos do polímero apresentavam envoltório de tecido conjuntivo fibroso. Em um animal foi descrito presença de tecido de granulação vascularizado e infiltrado inflamatório em região adjacente ao polímero. O autor descartou reação ligada ao polímero residual. O autor concluiu que o polímero de mamona foi biocompatível, auxiliando o preenchimento da cavidade alveolar por tecido ósseo.

Estudo utilizando poliuretano de mamona em tíbia de cães foi realizado por Maria; Padilha Filho; Castro (2003). A metodologia empregada foi a realização de ostectomia medial com introdução do material na forma de cilindro dentro do canal medular, percorrendo a porção medular do osso. Foram avaliados grupos de 30, 60 e 90 dias após a implantação do material e não foi observado rejeição ao polímero, porém descreveu-se que em todos os animais foi possível identificar presença de cápsula conjuntiva fibrosa

circundando o polímero e presença de proliferação óssea em face medial da tíbia. Os autores concluíram que o material é biocompatível com a espécie em estudo, permanecendo biotolerante ao longo do tempo, sem osteointegração.

Para estudar a ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea, Leonel et al. (2004) utilizaram o implante em defeitos de 1cm criados no arco zigomático de ratos. Os animais foram avaliados histologicamente nos períodos de 15, 30, 60, 90 e 120 dias após a implantação. Os critérios avaliados foram grau de inflamação, formação de tecido conjuntivo, presença de neoformação óssea e quantidade residual de polímero. Em 120 dias foram encontrados fragmentos de polímero em contato direto com tecido ósseo neoformado, que apresentava aspecto lamelar, ausência de células inflamatórias e ausência de cápsula fibrosa circundando o polímero. Os autores concluíram que o polímero auxiliou no processo regenerativo dos defeitos ósseos. Foi atribuído característica osteocondutora ao biomaterial.

Bolson et al. (2005) realizaram análise clínica e histológica em codornas submetidas a implante de polímero de mamona no seio pneumático do osso úmero. Os animais foram avaliados histologicamente nos períodos 15, 30, 60 e 90 dias após a implantação. Dentre os resultados obtidos, relatou-se presença do polímero intacto em algumas regiões, compatibilidade com a espécie estudada e reação inflamatória leve no período inicial da avaliação. Os autores concluíram que o polímero apresenta-se como alternativa para utilização em cirurgia ortopédica de aves.

Laureano Filho et al. (2007) compararam, através de estudo histológico, a regeneração óssea de coelhos após implante de matriz óssea desmineralizada e polímero de mamona. Foram realizados defeitos na calvária dos animais. Os grupos foram avaliados em 4, 7 e 15 semanas após a implantação. A pesquisa demonstrou que todos os grupos apresentaram aumento da regeneração óssea, com o passar do tempo, porém, o grupo controle apresentou processo em menor tempo e importante redução do tamanho da falha. O trabalho descreveu comportamento osteocondutor do polímero de mamona e salientou a pouca reabsorção do polímero após 15 semanas, em comparação com a matriz óssea que apresentou rápida reabsorção. Foi atribuída biocompatibilidade a ambos os materiais, com

melhores resultados ao polímero de mamona em relação à organização tecidual e processo regenerativo.

Dias et al. (2009) realizaram avaliação histológica do polímero de mamona no dorso nasal de macacos-prego após 270 dias. Os achados foram grande remodelação óssea com presença de células osteogênicas, ausência de células inflamatórias e reação a corpo estranho, além da presença de fragmentos do polímero em meio a tecido ósseo neoformado. Os autores concluíram que o material foi biocompatível e que o implante não induziu neoformação óssea, e atribuíram a formação óssea encontrada, ao estímulo do trauma cirúrgico no broto ósseo remanescente e a presença do periósteo do osso nasal.

2.6.4.2 Estudo morfométrico

Egan; Brennan; Pignolo (2012) definiram a morfometria como o exame dos tecidos com base na mensuração quantitativa da organização e da estrutura microscópica, usando-a para fornecer informações sobre resposta celular, lesões teciduais e distúrbios metabólicos do osso. Análises histomorfométricas são técnicas largamente utilizadas para avaliar mudanças na estrutura e função tecidual. Essas medidas básicas traduzem os índices morfométricos primários, incluindo volume tecidual, volume ósseo, volume do osteóide e superfície de mineralização.

Dentre as vantagens das análises morfométricas, há possibilidade de estas serem feitas com o uso de *software* de reconhecimento de imagens. Existem programas comercializados que permitem aumento da automação da análise histomorfométrica, como o *software* distribuído gratuitamente pela internet *ImageJ* desenvolvido pelo *National Institute of Health* (EGAN; BRENNAN; PIGNOLO, 2012).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a regeneração óssea após implante de polímero de mamona acrescido de carbonato de cálcio², em falhas ósseas não críticas no osso terceiro metacarpiano de equinos.

3.2 Objetivos específicos

Validar o uso da fosfatase alcalina sérica como marcador bioquímico de atividade de neoformação óssea no equino.

Avaliação ultrassonográfica da regeneração óssea após ostectomia de III metacarpiano em membro sem preenchimento da falha e em membro onde foi implantado polímero.

Monitoramento da formação de neovascularização após a ostectomia através do uso de *Power Doppler* e implantação de polímero de poliuretana de mamona acrescido de carbonato de cálcio.

Avaliação, através de exame termográfico, da inflamação causada após o ostectomia no membro controle e possíveis alterações causadas em decorrência da presença do polímero no membro contralateral.

Avaliação histológica, através de microscopia de luz, da quantidade e qualidade do tecido ósseo neoformado no membro controle e no membro com implante de polímero após ostectomia de III metacarpiano de equino.

² Composto ósseo de rícino (COR) – Poliquil – Araraquara, Brasil.

Hipóteses

4 HIPÓTESES

O polímero de poliuretana de mamona acrescido de carbonato de cálcio será biocompatível com a espécie equina, não causando reação a corpo estranho e auxiliando no processo regenerativo.

Defeitos ósseos não críticos induzidos experimentalmente em III metacarpiano de equinos irão regenerar em 120 dias, podendo ser evidenciado através de exame ultrassonográfico o preenchimento da área de ostectomia e através de *Power Doppler* será possível acompanhar o processo de neovascularização após a injúria.

Defeitos ósseos não críticos criados experimentalmente em III metacarpiano de equinos preenchidos com poliuretana de mamona associada a carbonato de cálcio apresentarão maior duração do processo regenerativo, porém com presença de tecido ósseo neoformado, sendo possível, após 120 dias, encontrar o biomaterial no local da implantação.

O exame ultrassonográfico permitirá o monitoramento do processo regenerativo após a ostectomia, o *Power Doppler* será capaz de detectar precocemente a formação da neovascularização e o exame termográfico será capaz de identificar resposta inflamatória causada pelo biomaterial.

Limitações do estudo

5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O estudo foi realizado com amostra de seis animais normorreativos e submetidos à falha não crítica, e com esta metodologia é esperado preenchimento dentro de 120 dias. O número de animais para pesquisa de comportamento da espécie equina pode ser pequeno e comprometer os resultados, caso ocorra discrepância estatística entre resultados obtidos em cada animal do estudo.

O período de avaliação limita-se ao tempo que se considera normal para consolidação de fraturas de equinos adultos, não se obtendo dados a respeito de resultados em longo prazo do comportamento e reabsorção do polímero.

Em virtude da morbidade a qual os animais foram submetidos e a opção por não submeter nenhum animal à eutanásia, não foi possível colheita de biópsia óssea em diferentes momentos do processo de regeneração óssea, limitando assim a avaliação da resposta tecidual frente ao material no período inicial do processo regenerativo.

Material e Método

6 MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa foi realizada após avaliação e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com protocolo nº 2215/2011.

6.1 Animais

Foram utilizados seis equinos adultos hígidos, machos e castrados. Durante período de adaptação de 30 dias e no transcorrer do estudo, os animais receberam água, feno *ad libitum* e ração concentrada³ para dieta de manutenção. Os animais foram mantidos em confinamento durante todo período de avaliação.

6.2 Biomaterial utilizado na pesquisa

Para preenchimento da falha óssea foi utilizado polímero de poliuretana produzida a partir do óleo vegetal de mamona (*Ricinus communis*), desenvolvido pelo Prof. Dr. Gilberto Chierice e sua equipe, do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. Comercialmente, o produto recebe nome de C.O.R – Composto Ósseo de Rícinus (Figura 1), poliuretana composta por pré-polímero derivado de isocianato, poliol poliéster derivado do óleo de mamona e carbonato de cálcio. Segundo informações técnicas, a relação de mistura é de 1,00 do pré-polímero para 0,65 de poliol e o carbonato de cálcio corresponde a 50% da soma da massa dos dois componentes. O material utilizado na pesquisa foi fornecido pela empresa Poliquil®.

³ Royal Horse – Socil – Paulínia, Brasil.

Figura 1 – Biomaterial utilizado na pesquisa e etapas do processamento para sua aplicação - São Paulo – 2014

Legenda: Fotografia da embalagem externa do produto (A); biomaterial na embalagem externa que protege embalagem interna estéril (B) e sequência da usinagem e ajustes para preenchimento da ostectomia do III metacarpiano (C, D e E).

Fonte: Nóbrega (2014).

6.3 Delineamento experimental

Foram avaliados seis equinos submetidos à ostectomia na diáfise proximal na face dorso-medial do osso III metacarpiano. Foi confeccionada falha circular unicortical de 13 mm de Ø em ambos os membros torácicos. Foi realizado estudo randomizado e implantou-se polímero a base de poliuretano de mamona em um membro, ficando o membro contralateral como controle. Os animais foram avaliados através de exame físico, exame ultrassonográfico e *Power Doppler*, termografia, dosagem sérica de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina nos momentos pré-cirúrgico, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de pós-

operatório e, ao término deste período, colheram-se biópsias na região da falha (Figura 2), com a qual se realizou estudo histológico através de microscopia de luz para análise descritiva e histomorfométrica do osso neoformado.

Figura 2 – Representação esquemática das etapas da realização da pesquisa - São Paulo 2014

Legenda: **A:** Membro torácico após ostectomia no terço proximal do osso III metacarpiano. Nota-se pontilhado vermelho representando tendão extensor digital comum. **B:** Membro torácico após 120 dias do procedimento submetido a duas biópsias na área de interface do osso neoformado/osso preexistente no membro controle e osso neoformado/polímero no membro polímero.

Fonte: Hebrock (2011) adaptado por Nóbrega (2014).

6.4 Métodos de Avaliação

Neste item será realizada descrição dos métodos utilizados para avaliação do comportamento da espécie equina frente ao implante do biomaterial.

6.4.1 Avaliação clínica

Foi realizada avaliação da ferida cirúrgica quanto à integridade da sutura, presença de secreção e reação inflamatória, caracterizada por dor e edema. O exame físico completo foi realizado diariamente, onde se aferiu: frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), tempo de perfusão capilar (TPC), coloração de mucosas e temperatura retal (TR). Foi realizado exame de claudicação, ao passo, após o procedimento cirúrgico onde se registrou 0 (zero) como ausência de claudicação e 1 (um) como presença de claudicação.

6.4.2 Avaliação laboratorial – marcador bioquímico do metabolismo ósseo

Inicialmente colheu-se amostra para controle pré-cirúrgico e posteriormente, a cada 15 dias até o 120º dia de pós-operatório, foram colhidas amostras de sangue para dosagem sérica de fosfatase alcalina⁴, cálcio⁵ e fósforo⁶. Utilizou-se método de análise por espectrofotometria automatizada.

6.4.3 Avaliação ultrassonográfica

Realizou-se inicialmente exame ultrassonográfico da superfície dorsal do osso III metacarpiano esquerdo e direito para avaliar integridade dos mesmos, utilizando equipamento modelo MylabTM30VET Gold⁷, transdutor multifrequencial linear de 12MHz e 4cm de profundidade. Os períodos de avaliação seguiram protocolo de sete, 15, 30, 60, 90 e 120 dias após a cirurgia.

⁴ Alkaline Phosphatase (ALP) – AMP, Biosystems – Curitiba, Brasil.

⁵ Calcium – Arsenazo, Biosystems – Curitiba, Brasil.

⁶ Phosphorus, Biosystems – Curitiba, Brasil.

⁷ Esaote – Indianapolis, Indiana.

Para realização dos exames os animais foram mantidos em tronco de contenção (Figura 3).

Após a realização dos exames, as imagens foram analisadas por dois avaliadores cegos que preencheram tabela de avaliação do escore de preenchimento da falha, baseado na passagem de onda através do orifício (Apêndice 1).

Figura 3 – Realização do exame ultrassonográfico para a avaliação do processo regenerativo após ostectomia em III metacarpiano em equino – São Paulo – 2014

Legenda: Fotografia demonstrando posicionamento do animal para realização do exame ultrassonográfico (A) e exemplo de imagem para avaliação do processo regenerativo (B).

Nota: Seta branca identifica região da ostectomia sem preenchimento e elipse em amarelo pontilhado delimita área do polímero de poliuretana de mamona.

Fonte: Nóbrega (2014).

6.4.3.1 Avaliação ultrassonográfica Power-Doppler

Durante o mesmo momento da avaliação ultrassonográfica, foi realizada avaliação com *Power Doppler* (Figura 4). As imagens foram armazenadas e posteriormente avaliadas por dois avaliadores cegos que preencheram tabela com escore de grau de neovascularização (Anexo B).

Figura 4 – Sequência de imagens para avaliação ultrassonográfica *Power Doppler* da neovascularização durante processo de regeneração óssea do osso III metacarpiano sem preenchimento com biomaterial (membro controle) – São Paulo – 2014

Fonte: Nóbrega (2014).

6.4.4 Avaliação termográfica

Utilizou-se câmera térmica⁸ de aquisição de imagens infravermelhas portátil, modelo Thermacam T400[®] com sensibilidade térmica de 0,05°C, paleta *Rainbow High Contrast* e calibração automática. Os animais foram mantidos sem curativo por trinta minutos antes da aquisição de imagens para aclimação a temperatura do ambiente. Os membros foram escaneados a uma distância de aproximadamente um metro do animal.

Para minimizar efeitos ambientais o exame foi realizado na própria baia onde o animal estava alojado permanentemente, no mesmo período do dia, sem presença de sol, nenhum animal recebeu sedativo para contenção, os animais foram contidos fisicamente. Os animais foram analisados antes de serem submetidos ao procedimento cirúrgico, para exame controle, e posteriormente aos sete, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de pós-operatório.

Na avaliação dos resultados foram utilizados os valores encontrados durante aquisição das imagens infravermelhas da região metacarpiana. A imagem da área do terço proximal de cada III metacarpiano foi delimitada e obteve-se a área para mensuração. Esta área foi avaliada pelo programa de imagens incluído no sistema da câmera infravermelha, sendo registrada temperatura média da região (Figura 5).

⁸ FLIR , Shatin, Hong Kong.

Figura 5 – Interface do programa de análise de imagens FLIR QuickReport® durante avaliação termográfica dos membro torácicos do equino submetido à ostectomia do III metacarpiano – São Paulo – 2014

Legenda: **A**: membro controle **B**: membro com polímero
 Fonte: Nóbrega (2014).

6.4.5 Avaliação histológica

Após 120 dias de pós-operatório, os animais foram submetidos à anestesia geral e a área da ostectomia foi acessada, de forma cirúrgica, para colheita de fragmento da região de interface entre osso preexistente e osso neoformado. Este material foi processado, submetido ao processo de desmineralização e posteriormente avaliado através de microscopia de luz utilizando técnica de coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM).

6.5 Procedimento anestésico e cirúrgico

Descreve-se a seguir protocolos pré-operatório, anestésico e operatório utilizados nos seis animais deste projeto.

6.5.1 Procedimentos pré-operatório e anestésico

Os animais foram mantidos em jejum alimentar de 12 horas, realizou-se tricotomia do membro, iniciando no limite proximal na altura do carpo e finalizando no limite distal o boleto. Realizou-se anestesia geral inalatória seguindo protocolo padrão do HOVET/CGA sendo: pré-medicação com cloridrato de detomidina⁹ (0,01 mg.kg⁻¹), indução anestésica com associação de diazepam¹⁰ (0,05 mg.kg⁻¹) e cloridrato quetamina¹¹ (2 mg.kg⁻¹). A manutenção da anestesia foi realizada com isoflurano¹² vaporizado em oxigênio 100%. Ao término do procedimento foi administrado cloridrato de tramadol¹³ (2 mg.kg⁻¹) e após desmame da ventilação mecânica, o animal foi sedado com cloridrato de xilazina¹⁴ (0,3 mg.kg⁻¹). Em associação ao protocolo da anestesia geral, realizou-se bloqueio perineural digital alto de quatro pontos com associação de bupivacaína¹⁵ 0,5% e lidocaína¹⁶ 2%. Como profilaxia antimicrobiana, administrou-se sulfato de amicacina¹⁷ (500mg diluído em 20ml de solução fisiológica) por perfusão regional intravenosa, 30 minutos antes do acesso cirúrgico.

⁹ Dormium V – Agener – Pouso Alegre, Brasil.

¹⁰ Diazepam injetável – União Química – Embu-Guaçu, Brasil.

¹¹ Ketamina Agener – Agener – Pouso Alegre, Brasil.

¹² Isoforine – Cristália – Itapira – SP – Brasil.

¹³ Tramal – Pharmacia - Rio de Janeiro, Brasil.

¹⁴ Sedomin – König – Argentina.

¹⁵ Neocaína bupivacaína 0,5% sem vasoconstritor Cristália – Itapira, Brasil

¹⁶ Xylestesin Iodocaína 2% sem vasoconstritor - Cristália - Itapira, Brasil

¹⁷ Novamin – Teuto – Anápolis, Brasil.

6.5.2 Procedimento cirúrgico

Os animais foram posicionados em decúbito lateral e preparados para procedimento cirúrgico de forma asséptica. Para acesso ao osso terceiro metacarpiano, incizou-se a pele em semicírculo de cinco centímetros (Figura 6), distante aproximadamente 10 centímetros da articulação carpometacárpica, o tendão extensor digital comum foi afastado com auxílio de afastador. O tecido subcutâneo na face dorsomedial do membro foi divulsionado até identificação do periósteo, sendo este também incisado no padrão de semicírculo expondo a diáfise do osso. Uma falha óssea circular de 13 mm de diâmetro ($\emptyset$) foi confeccionada perpendicular ao eixo longitudinal, com auxílio de trefina, acoplada a perfuradora elétrica¹⁸, modelo TRS, sob irrigação contínua com solução de NaCl¹⁹ 0,9%. A profundidade da falha foi determinada individualmente, sendo o limite a transposição completa da cortical-*cis* de cada animal.

O biomaterial utilizado apresentava forma de bloco nas dimensões 5x5x1cm e para a implantação foi necessária usinagem do mesmo, sendo confeccionado um cilindro. Para tanto, foi utilizado serra trefina de 15mm de diâmetro e o ajuste de tamanho do polímero com a falha foi feito manualmente com auxílio de lâmina de bisturi, de forma a manter maior contato com o osso. A área da ostectomia foi recoberta pelo periósteo por síntese realizada com fio poligrecapone²⁰ 25 nº 2-0, no padrão contínuo simples. O tendão extensor digital comum foi reposicionado dorsalmente e o tecido subcutâneo foi suturado com mesmo fio no padrão contínuo simples. A pele foi suturada com fio mononylon²¹ nº 2-0, no padrão isolado simples.

Após procedimento em um membro torácico, foi seguido mesmo protocolo no membro contralateral, sendo neste, mantida falha sem preenchimento. A Figura 7 demonstra o acesso ao III metacarpiano para realização da ostectomia. A Figura 8 apresenta etapas de confecção da falha, usinagem do biomaterial e aspecto final dos membros controle e com polímero.

¹⁸ Synthes, Zurique, Suíça.

¹⁹ Isofarma, Eusébio, Brasil.

²⁰ Caprofil – Ethicon – São Paulo, Brasil.

²¹ Mononylon – Ethicon – São Paulo, Brasil.

Figura 6 – Fotografia demonstrando acesso cirúrgico em semicírculo para confecção da ostectomia em III metacarpiano de equino – São Paulo – 2014

Legenda: **A:** Aspecto da incisão de pele, tecido subcutâneo e periósteo em semicírculo. **B:** Aspecto após síntese de pele apresentando ponto onde está localizada a ostectomia.

Fonte: Nóbrega (2014).

Figura 7 – Cirurgia de ostectomia em III metacarpiano de equino para implantação de polímero de poliuretana de mamona – São Paulo – 2014

Legenda: **A** – Incisão de pele em semicírculo (pontilhado amarelo). **B** – Incisão de tecido subcutâneo e periósteo com exposição da superfície óssea, onde será realizada a falha. **C** – Momento da realização da ostectomia de 13 mm de diâmetro com serra trefina com irrigação de solução fisiológica. 1C. Exposição da superfície óssea; 2C. Serra trefina; 3C. Irrigação com solução fisiológica. **D** – Aspecto final da ostectomia unicortical com 13 mm de diâmetro.

Fonte: Nóbrega (2014).

Figura 8 – Fotografia da sequência do momento de implantação do polímero de poliuretana de mamona em III metacarpiano de equino – São Paulo – 2014

Legenda: **A** – Marcação na região dorsal do III metacarpiano com serra trefina (13 mm). **B** – Usinagem do polímero de mamona com serra trefina de 15 mm de diâmetro. **C** – Fragmento ósseo removido após ostectomia (seta branca), comparado ao biomaterial após usinagem inicial apresentando dimensões de 15 mm de diâmetro interno e 30 mm de comprimento (seta preta). **D** – Aspecto final da falha mantida sem preenchimento (membro controle). **E** – Aspecto final da falha após implantação do polímero de poliuretana de mamona.
 Fonte: Nóbrega (2014).

6.5.3 Manejo pós-operatório

Os animais receberam fenilbutazona²² (4,4 mg.kg⁻¹, IV, s.i.d, por 5 dias) e sulfato de amicacina (15 mg.kg⁻¹, IV, s.i.d, por 5 dias). O curativo da ferida cirúrgica foi substituído após sete dias do procedimento e os animais foram mantidos com bandagem estéril até retirada dos pontos, com quinze dias de pós-operatório. Durante todo período de avaliação, os animais foram mantidos com bandagem elástica para proteção da região do metacarpo.

6.5.4 Procedimento cirúrgico para colheita de biópsia óssea

Após 120 dias os animais foram submetidos ao mesmo protocolo pré-operatório, anestésico e de acesso cirúrgico empregado no momento de confecção da ostectomia. Foi identificada área de interface entre osso/neoformação óssea no membro controle, e osso/polímero no membro onde houve a implantação deste. Realizaram-se duas biópsias em cada membro com uso de trefina de 0,5 cm de diâmetro interno (Figura 9). Este material foi mantido em solução fisiológica até o término do procedimento cirúrgico, fixado por 48 horas em solução a base de paraformaldeído e posteriormente processado para estudo histológico através de microscopia de luz.

²² Equipalazone – Marcolab – Rio de Janeiro, Brasil.

Figura 9 – Sequência de imagens da colheita de biópsia óssea no III metacarpiano de equino – São Paulo – 2014

Legenda: **A** – Aspecto do osso III metacarpiano do membro controle após 120 dias da ostectomia. **B** – Aspecto do osso III metacarpiano com polímero após 120 dias da ostectomia com preenchimento pelo biomaterial. **C** – Aspecto do osso após a colheita da biópsia com trefina de 0,5 cm de diâmetro onde se identifica interface osso/polímero (seta preta). **D** – Segmento ósseo colhido do membro polímero. **E** – Segmento ósseo colhido do membro controle.

Fonte: Nóbrega (2014).

6.6 Fase laboratorial

6.6.1 Processamento para microscopia de luz - MOL

O protocolo de processamento segue metodologia do Laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Estomatologia – Faculdade de Odontologia – Universidade de São Paulo (FO-USP), tendo como responsável a Prof. Dra. Luciana Corrêa.

6.6.1.1 *Descalcificação para MOL*

O material colhido foi mantido em fixador a base de paraformaldeído durante 48 horas. Posteriormente, este material foi lavado em água corrente por 24 horas e iniciou-se processo de desmineralização em solução de ácido etilenodiamínico tetra-acético²³ (EDTA) 10% em pH 7,4. Realizou-se substituição do líquido a cada 48 horas, sendo finalizado o processo, em média, após 210 dias.

6.6.1.2 *Diafanização e inclusão dos espécimes em parafina*

As peças foram acondicionadas em cassetes e encaminhadas para diafanização, onde foram submetidas à submersão em série crescente de álcool e xilol por período de 12 horas. Em seguida, o material foi incluído em parafina para realização de microtomia e confecção das lâminas.

²³ EDTA Ácido PA – Labsynth – São Paulo, Brasil.

6.6.1.3 Confeção das lâminas

Para análise descritiva e morfométrica em microscopia de luz, preparou-se lâminas e realizaram-se técnicas de coloração de Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson.

6.6.1.4 Avaliação microscópica - MOL

As lâminas coradas com HE e TM foram analisadas e descritas por profissional patologista.

Coloração Hematoxilina-Eosina

Realizou-se análise em microscópio óptico de luz²⁴ onde foram adquiridas as imagens para posterior avaliação.

Foi realizada análise descritiva das imagens priorizando características do osso neoformado e sua celularidade bem como aspectos relevantes do polímero, como a interação do polímero com o osso e produção de matriz osteóide.

Coloração Tricrômico de Masson

Realizou-se análise em microscópio óptico de luz, com auxílio de *software*²⁵, procedeu-se a aquisição das imagens, que posteriormente foram analisadas em outro *software*²⁶, sob os aspectos:

- a) Quantidade de osso neoformado (Figuras 10 e 11)
- b) Grau de maturidade óssea nos diferentes momentos de cada animal, sendo avaliado o material contido na área da ostectomia para realização da falha e posteriormente comparado com o tecido

²⁴ Leica, modelo DM2500, Alemanha

²⁵ Leica, Leica Application Suite® (LAS V4.1), Alemanha

²⁶ WCIF ImageJ 1.37a®, National Institute of Health, EUA

neoformado no membro controle e no membro com polímero (Figura 12).

Figura 10– Interface do programa WCIF ImageJ 1.37a[®] analisando área de osso neoformado em membro controle de equino – São Paulo – 2014

Legenda: Em **A** observa-se a imagem original do campo utilizado para realizar a mensuração da área de tecido neoformado em membro controle. Em **B** a área de tecido neoformado está delimitada em toda sua extensão (pontilhado amarelo) para cálculo da área que é apresentada na área de quadrado vermelho.

Fonte: Nóbrega (2014).

Figura 11 – Interface do programa WCIF ImageJ 1.37a[®] analisando área de osso neoformado em membro com polímero de equino – São Paulo – 2014

Legenda: Em **A** vê-se a imagem original do campo utilizado para realizar a mensuração da área de tecido neoformado em membro polímero. Em **B** a área de tecido neoformado está delimitada em toda sua extensão (pontilhado amarelo) para cálculo da área que é apresentada no quadrado vermelho.

Fonte: Nóbrega (2014).

Figura 12 - Interface do programa WCIF ImageJ 1.37a[®] utilizado para analisar o grau de maturidade óssea expressa por área em vermelho – São Paulo – 2014

Legenda: Em **A** vê-se a imagem original do campo utilizado para realizar a mensuração de maturidade óssea em osso removido durante ostectomia para confecção da falha óssea. Em **B** é possível graduar as áreas vermelhas presentes no tecido ósseo utilizando o rolamento da barra (seta preta). A área do tecido imaturo (áreas vermelhas) é apresentada no retângulo vermelho.

Fonte: Nóbrega (2014).

6.7 Avaliação estatística

A seguir são descritas técnicas de análise estatística utilizadas na pesquisa.

6.7.1 Dados laboratoriais e imagem

Os dados foram digitados no programa Excel e posteriormente exportados para programa SPSS v.18.0 para análise estatística. As variáveis quantitativas foram descritas pela média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo. Para comparação da mudança das variáveis ao longo do tempo, foi utilizado teste de Friedman. Para localizar diferenças entre os tempos, quando este teste foi significativo, foi utilizado teste *post-hoc* proposto por Schaich and Hamerle. O teste Wilcoxon foi utilizado para comparar membro polímero e controle nos diferentes tempos. Considerou-se nível de significância de 5%.

6.7.2 Dados histológicos

Foram digitados os dados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS v. 18.0 para análise estatística. Foram descritas as variáveis pela média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo. Foi comparada a área de osso neoformada entre os membros pelo teste de Wilcoxon. O grau de maturidade óssea foi comparado entre cirurgia, biópsia controle e biópsia polímero pelo teste de Friedman, e entre os equinos pelo teste de Kruskal-Wallis. Para localizar as diferenças entre os equinos foi utilizado o teste *post-hoc* de Tukey aplicado na ordenação por postos da variável. Foi considerado um nível de significância de 5%.

Resultados

7 RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados obtidos durante a pesquisa.

7.1 Manejo dos animais

Por se tratarem de animais provenientes de manejo extensivo foi fundamental o alojamento e intervalo para a adaptação de trinta dias previamente à realização do procedimento cirúrgico. Este período de adaptação possibilitou introdução de dieta balanceada, administração de antiparasitários e manejo diário dos animais, tornando-os dóceis, o que possibilitou a realização dos exames físicos diários e exames de imagens durante os períodos pré-determinados.

7.2 Protocolo anestésico e analgésico

Tanto o protocolo para procedimento cirúrgico, como os fármacos utilizados para analgesia apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que não houve intercorrência durante os procedimentos operatórios. No pós-operatório os animais não demonstraram sinais de desconforto, não sendo necessário uso de medicação de resgate analgésico em nenhum animal.

7.3 Protocolo cirúrgico

A escolha do osso III metacarpiano neste estudo facilitou as avaliações macroscópicas e de imagem. A técnica cirúrgica possibilitou fácil acesso a área e a ostectomia de 13 mm de diâmetro permitiu padronização do tamanho da

falha. Foi possível identificação macroscópica da região de interface do tecido neoformado/ osso preexistente em ambos os membros para realização da biópsia em 120 dias. No membro com polímero, foi possível visualização do biomaterial preenchendo a falha na superfície dorsal do III Mtc. A incisão de pele em semicírculo manteve a área de estudo livre da interferência dos fios de sutura, bem como do processo inflamatório e cicatricial envolvidos com incisões de pele e periósteo. Desta forma, a avaliação ultrassonográfica foi realizada sem interferências (Figura 12).

Após 120 dias do procedimento, os animais apresentavam imagem radiológica de consolidação da falha do membro controle (Figura 13) e visualização da área de ostectomia no membro com polímero (Figura 14).

Figura 13 – Exame radiográfico nas projeções dorsopalmar (DP) e lateromedial (LM) do membro controle de equino submetido à ostectomia unicortical de III metacarpiano – São Paulo – 2014

Legenda: Pós-operatório imediato (A) e 120 dias de pós-operatório (B).

Fonte: Nóbrega (2014).

Figura 14 – Exame radiográfico nas projeções dorsopalmar (DP) e lateromedial (LM) do membro de equino preenchido com polímero de poliuretana de mamona acrescido de carbonato após ostectomia unicortical de III – São Paulo – 2014

Legenda: Pós-operatório imediato (A) e 120 dias de pós-operatório (B).
Fonte: Nóbrega (2014).

7.4 Métodos de avaliação

A seguir serão apresentados resultados obtidos pelos métodos de avaliação clínica, laboratorial e de imagem.

7.4.1 Avaliação clínica

A aferição diária dos parâmetros físicos dos animais permitiu monitoramento de todo período de avaliação. A partir dos dados obtidos, pode-se afirmar que os animais estiveram durante os 120 dias de pós-operatório, com os parâmetros dentro dos valores de referência da espécie. Com estes

dados, infere-se que o procedimento não causou desconforto aos animais, a ponto de gerar alteração de parâmetros (Tabelas 1, 2 e 3). Não foram observadas alterações no comportamento, apetite e função mecânica em nenhum dos membros operados. Com base nesta avaliação, não foi possível identificar qualquer tipo de reação ao implante da poliuretana nos animais testados que gerasse dor ou processo inflamatório exacerbado.

Os animais apresentaram claudicação leve nas avaliações do 15º e 30º dia, que regrediu espontaneamente, sendo ausente a partir do 60º dia.

As feridas cirúrgicas cicatrizaram por primeira intenção, sendo os pontos de pele removidos no 10º dia de pós-operatório.

Tabela 1 – Tabela apresentando valores da frequência cardíaca (bpm) máxima e mínima dos animais, média e desvio padrão durante os quatro meses de avaliação – São Paulo – 2014

Frequência cardíaca	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4
Máxima	40,8	41,7	43,1	43,2
Mínima	28,8	31,5	35,1	34,8
Média	40,8(±4,38)	41,7(±4,45)	43,1(±2,86)	43,2(±3,19)

Referência de normalidade: 28 - 46 bpm

Fonte: Nóbrega (2014).

Tabela 2 - Tabela apresentando valores da frequência respiratória (mpm) máxima e mínima dos animais, média e desvio padrão durante os quatro meses de avaliação – São Paulo – 2014

Frequência respiratória	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4
Máxima	18,7	19	20	19,3
Mínima	15,8	16,7	17,8	18,3
Média	17,47(±1,00)	17,83(±0,84)	19,02(±0,99)	18,35(±1,54)

Referência de normalidade: 8 - 16 mpm

Fonte: Nóbrega (2014).

Tabela 3 - Tabela apresentando valores da temperatura retal (°C) máxima e mínima dos animais, média e desvio padrão durante os quatro meses de avaliação – São Paulo – 2014

Temperatura retal	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4
Máxima	37,5	37,5	37,5	37,5
Mínima	37,2	37,3	37,2	37
Média	37,33(±0,15)	37,38(±0,09)	37,37(±0,12)	37,28(±0,19)

Referência de normalidade: 37,5 - 38,5 °C

Fonte: Nóbrega (2014).

7.4.2 Avaliação laboratorial – marcador bioquímico do metabolismo ósseo

Os valores séricos de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina demonstraram grande variação ao longo do período, para cada animal. Os resultados estão representados na forma de tabelas.

Na Tabela 4, a seguir, observa-se comparação da concentração sérica de cálcio ao longo do tempo. O teste estatístico não apontou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,751$).

Na Tabela 5, a seguir, observa-se comparação da concentração sérica de fósforo ao longo do tempo e o teste estatístico não apontou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,086$).

Na Tabela 6, a seguir, observa-se diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) na concentração da fosfatase alcalina sérica ao longo do tempo. O teste *post-hoc* apontou que esta diferença se localizou entre o dia 30 e o dia 120.

Tabela 4 - Tabela de comparação da concentração sérica de cálcio (mg/dL) ao longo do tempo – São Paulo – 2014

Cálcio	D ₀	D ₁₅	D ₃₀	D ₄₅	D ₆₀	D ₇₅	D ₉₀	D ₁₀₅	D ₁₂₀	P*
Média	11,10	11,02	11,32	11,23	11,07	11,60	11,25	11,63	11,25	0,751
DP	0,47	0,79	0,44	0,83	0,88	0,28	0,36	0,58	1,02	
Mínimo	10,20	9,70	10,60	10,10	10,00	11,20	10,90	10,90	10,20	
Máximo	11,50	11,70	12,00	12,10	12,40	12,00	11,89	12,40	12,60	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman

Referência de normalidade: 9,7 - 12,4 mg/dL

Fonte: Nóbrega (2014).

Tabela 5 - Tabela de comparação da concentração sérica de fósforo (mg/dL) ao longo do tempo – São Paulo – 2014

Fósforo	D ₀	D ₁₅	D ₃₀	D ₄₅	D ₆₀	D ₇₅	D ₉₀	D ₁₀₅	D ₁₂₀	P*
Média	2,90	3,37	2,85	2,40	2,50	2,58	2,65	2,85	2,95	0,086
DP	0,50	0,41	0,89	0,70	0,33	0,86	0,24	0,86	0,53	
Mínimo	2,40	2,90	2,20	1,50	2,10	2,00	2,40	2,10	2,40	
Máximo	3,60	4,00	4,60	3,50	2,90	4,20	2,90	4,40	3,70	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman

Referência de normalidade: 3,1 - 5,6 mg/dL

Fonte: Nóbrega (2014).

Tabela 6 - Tabela de comparação da concentração sérica de fosfatase alcalina (U/L) ao longo do tempo – São Paulo – 2014

Fosfatase alcalina	D ₀	D ₁₅	D ₃₀ **	D ₄₅	D ₆₀	D ₇₅	D ₉₀	D ₁₀₅	D ₁₂₀ **	P*
Média	123,15	130,83	152,63	117,63	110,47	95,23	95,87	77,23	70,77	<0,001
DP	37,92	35,33	42,21	31,77	40,64	34,77	30,53	18,95	16,87	
Mínimo	81,40	95,40	81,80	87,20	50,90	53,30	50,50	50,20	48,00	
Máximo	179,60	183,80	200,10	164,60	176,90	158,60	126,20	100,70	98,00	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman

** Tempos diferentes estatisticamente pelo teste *post hoc* proposto por Schaich and Hamerle (1984)

Referência de normalidade: 143 – 395 U/L

Fonte: Nóbrega (2014).

7.4.3 Avaliação ultrassonográfica

Os intervalos escolhidos para realização dos exames ultrassonográficos permitiram acompanhamento de todo o processo de preenchimento da falha no membro controle (Figura 15), bem como monitoramento da área onde foi implantado o biomaterial no membro contralateral (Figura 16). No exame ultrassonográfico do membro com polímero, foi possível avaliação da superfície óssea em contato com o polímero, e também do periósteo que recobria a área do implante, porém não foi possível avaliar o processo regenerativo ocorrido no interior da falha, pois o material implantado impediu a passagem das ondas sonoras, produzindo sombra acústica posterior.

Figura 15 – Fotografia de imagem ultrassonográfica longitudinal da região dorsal do osso III metacarpiano, grupo controle, na área de ostectomia – São Paulo – 2014

Nota: Preenchimento gradual da falha durante período de avaliação de 120 dias com formação de ponte óssea em 120 dias (seta amarela).
Fonte: Nóbrega (2014).

Figura 16 – Fotografia de imagem ultrassonográfica imagem longitudinal da região dorsal do osso III metacarpiano na área de ostectomia preenchida com polímero de mamona (círculo pontilhado amarelo) – São Paulo – 2014

Nota: Visualização do aspecto dorsal da superfície óssea sendo a área do polímero identificada através da região onde se identifica sombra acústica posterior durante todo período de avaliação de 120 dias.
Fonte: Nóbrega (2014).

Na Tabela 7 observa-se comparação da avaliação ultrassonográfica do preenchimento da falha feita pelo Avaliador 1 ao longo do tempo (Apêndices A e B). Houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) na distribuição do escore ao longo do tempo e esta diferença foi localizada entre os dias 7 – 120 e 15 – 120.

Na Tabela 8 observa-se comparação da avaliação ultrassonográfica do preenchimento da falha feita pelo Avaliador 2 ao longo do tempo. Houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) na distribuição do escore ao longo do tempo e esta diferença foi localizada entre os dias 7 – 120 e 15 – 120.

Na Tabela 9 observa-se comparação entre pontuações do escore de preenchimento da falha pelos dois avaliadores e não se encontrou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos momentos.

Tabela 7 - Avaliação ultrassonográfica do preenchimento da falha no membro controle realizada pelo Avaliador 1 – São Paulo – 2014

Tempo	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	P*
Mediana	0	0	1	2	2	3	<0,001
Mínimo	0	0	1	1	2	3	
Máximo	0	1	2	2	3	3	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman
Fonte: Nóbrega (2014).

Tabela 8 - Avaliação ultrassonográfica do preenchimento da falha no membro controle realizada pelo Avaliador 2 – São Paulo – 2014

Tempo	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	P*
Mediana	0	0	1	2	2	3	<0,001
Mínimo	0	0	0	1	2	3	
Máximo	0	1	2	2	2	3	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman
Fonte: Nóbrega (2014).

Tabela 9 - Comparação da avaliação ultrassonográfica do preenchimento da falha no membro controle entre os avaliadores – São Paulo – 2014

Dia	Avaliador	Mediana	Mínimo	Máximo	P*
7	1	0	0	0	1,000
	2	0	0	0	
15	1	0	0	1	0,564
	2	0	0	1	
30	1	1	1	2	0,655
	2	1	0	2	
60	1	2	1	2	0,564
	2	2	1	2	
90	1	2	2	3	0,157
	2	2	2	2	
120	1	3	3	3	1,000
	2	3	3	3	

* Valor P obtido pelo teste de Wilcoxon

Fonte: Nóbrega (2014).

7.4.3.1 Avaliação ultrassonográfica Power Doppler

A Tabela 10, a seguir, apresenta valores da avaliação ultrassonográfica *Power Doppler* da presença de vascularização realizada pelo Avaliador 1 (Apêndices C e D), onde foi possível identificar diferença estatisticamente significativa ($P = 0,001$) nos valores do escore ao longo do tempo localizada entre os dias 7 e 30.

A Tabela 11, a seguir, apresenta valores de avaliação ultrassonográfica *Power Doppler* da presença de vascularização realizada pelo Avaliador 2 e observa-se diferença estatisticamente significativa ($P=0,007$) nos valores do escore ao longo do tempo, localizada entre os dias 7 e 30.

Na Tabela 12 observa-se comparação entre pontuações do escore de presença de vascularização pelos dois avaliadores onde não se encontrou diferença estatisticamente significativa.

Tabela 10 - Avaliação ultrassonográfica da presença de vascularização na falha do membro controle através de *Power Doppler* realizada pelo Avaliador 1 – São Paulo – 2014

Tempo	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	P*
Mediana	0	0	2	1	1	1	0,001
Mínimo	0	0	1	1	1	0	
Máximo	0	1	2	2	2	2	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman

Fonte: Nóbrega (2014).

Tabela 11 - Avaliação ultrassonográfica da presença de vascularização na falha do membro controle através de *Power Doppler* realizada pelo Avaliador 2 – São Paulo – 2014

Tempo	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	P*
Mediana	0	1	2	1	1	1	0,007
Mínimo	0	0	1	1	1	1	
Máximo	0	2	2	2	2	2	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman

Fonte: Nóbrega (2014).

Tabela 12 - Comparação da avaliação ultrassonográfica da presença de vascularização no membro controle através de *Power Doppler* entre os avaliadores – São Paulo – 2014

Dia	Avaliador	Mediana	Mínimo	Máximo	P*
7	1	0	0	0	1,000
	2	0	0	0	
15	1	0	0	1	0,083
	2	1	0	2	
30	1	2	1	2	1,000
	2	2	1	2	
60	1	1	1	2	0,317
	2	1	1	2	
90	1	1	1	2	1,000
	2	1	1	2	
120	1	1	0	2	0,157
	2	1	1	2	

* Valor P obtido pelo teste de Wilcoxon

Fonte: Nóbrega (2014).

7.4.4 Avaliação termográfica

Os intervalos escolhidos para realização dos exames termográficos permitiram monitoramento da região onde foi realizada ostectomia.

Na Tabela 13, observa-se comparação da termografia ao longo do tempo no membro com polímero. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição da termografia ao longo do tempo ($P = 0,362$).

Na Tabela 14, observa-se comparação da termografia ao longo do tempo no membro controle. Não houve diferença estatisticamente significativa na avaliação termográfica ao longo do tempo ($P = 0,456$).

Na Tabela 15, foi realizada comparação em cada tempo dos membros com polímero e controle e pôde-se observar diferença estatisticamente significativa no D_7 ($P = 0,046$) sendo maior temperatura média apresentada pelo membro polímero ($T^{\circ}\text{C } 31,3$).

Encontra-se no Apêndice E os gráficos onde foi comparado membro controle e membro com polímero para cada animal. Observou-se que não há variação entre os membros com relação à curva térmica, porém há variações entre os animais, não sendo seguido o mesmo padrão térmico de aumento ou redução da temperatura local.

Tabela 13 - Comparação ao longo do tempo da avaliação termográfica no membro com polímero – São Paulo – 2014

Polímero	D_0	D_7	D_{15}	D_{30}	D_{60}	D_{90}	D_{120}	P^*
Média	28,20	31,30	29,85	31,37	29,38	31,90	30,37	0,362
DP	4,03	1,88	1,14	1,98	3,68	2,39	3,31	
Mínimo	22,40	28,30	28,50	28,80	24,30	28,90	26,30	
Máximo	32,20	33,00	31,30	33,80	33,20	35,10	34,70	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman
Fonte: Nóbrega (2014).

Tabela 14 - Comparação ao longo do tempo da avaliação termográfica no membro controle – São Paulo – 2014

Controle	D ₀	D ₇	D ₁₅	D ₃₀	D ₆₀	D ₉₀	D ₁₂₀	P*
Média	28,12	30,73	30,25	31,70	29,18	31,80	30,27	0,456
DP	3,91	2,22	1,07	2,34	3,85	2,60	3,37	
Mínimo	22,20	27,30	28,70	28,70	23,80	27,80	26,70	
Máximo	31,20	33,20	31,30	33,90	33,20	35,30	34,80	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman

Fonte: Nóbrega (2014).

Tabela 15 - Comparação da avaliação termográfica entre membro com polímero e membro controle nos períodos pré-cirúrgico (D₀), 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias – São Paulo – 2014

Dia	Grupo	Média	DP	Mínimo	Máximo	P*
D ₀	Polímero	28,20	4,03	22,40	32,20	0,752
	Controle	28,12	3,91	22,20	31,20	
D ₇ **	Polímero	31,30	1,88	28,30	33,00	0,046
	Controle	30,73	2,22	27,30	33,20	
D ₁₅	Polímero	29,85	1,14	28,50	31,30	0,066
	Controle	30,25	1,07	28,70	31,30	
D ₃₀	Polímero	31,37	1,98	28,80	33,80	0,293
	Controle	31,70	2,34	28,70	33,90	
D ₆₀	Polímero	29,38	3,68	24,30	33,20	0,345
	Controle	29,18	3,85	23,80	33,20	
D ₉₀	Polímero	31,90	2,39	28,90	35,10	0,674
	Controle	31,80	2,60	27,80	35,30	
D ₁₂₀	Polímero	30,37	3,31	26,30	34,70	0,581
	Controle	30,27	3,37	26,70	34,80	

* Valor P obtido pelo teste de Wilcoxon

Fonte: Nóbrega (2014).

7.4.5 Avaliação histológica – análise macroscópica

A amostra colhida do membro controle apresentava aspecto semelhante ao osso pré-existente, sendo que na superfície cortical foi observado periósteo fortemente aderido. O material apresentava consistência e aspecto homogêneos (Figura 17).

A amostra colhida do membro com polímero apresentava clara interface entre polímero e osso, sendo que o polímero apresentava consistência macia e quebradiça. Não houve aderência de periósteo na superfície cortical do osso nem no polímero. Na porção medular da amostra, pôde-se observar presença de tecido com aspecto de osso (Figura 18).

Figura 17 – Fotografia do material colhido do membro controle através de biópsia com uso de serra trefina de 0,5 cm de diâmetro – São Paulo – 2014

Legenda: **A:** Amostra colhida apresentando tecido ósseo em toda sua extensão. **B:** Vista transversal da amostra evidenciando área onde o periósteo estava aderido (seta branca).
Fonte: Nóbrega (2014).

Figura 18 – Fotografia do material colhido do membro com polímero através de biópsia com uso de serra trefina de 0,5cm de diâmetro interno – São Paulo – 2014

Legenda: **A:** Corte longitudinal da amostra apresentando delimitação da região de tecido ósseo e do polímero que apresenta aspecto irregular e com diferentes colorações ao longo de sua extensão. **B:** Material após processo de desmineralização mantendo integridade do polímero e presença de tecido de aspecto ósseo na região distal (seta preta).
Fonte: Nóbrega (2014).

7.4.6 Avaliação histológica – análise microscópica

Os resultados da leitura das lâminas serão apresentados a seguir.

7.4.6.1 Técnica Hematoxilina-Eosina (HE)

A análise descritiva das lâminas coradas com HE é apresentada em fotomicrografias (Figuras 19 a 22).

No membro controle foi possível observar que o processo regenerativo desenvolveu-se dentro do período esperado, com formação de tecido ósseo e áreas de remodelamento.

Não foi identificada reação inflamatória crônica e presença de cápsula fibrosa envolvendo o biomaterial.

Figura 19 - Fotomicrografia de microscopia de luz mostrando detalhes do osso neoformado no membro controle com presença de osteoblastos – São Paulo – 2014

Legenda: Espaço medular evidenciando células poligonais de citoplasma amplo e eosinofílico compatíveis com osteoblastos originando linha que delimita o espaço medular. Em área focal, evidencia-se secreção de matriz óssea (* em branco). (Aumento original de 400X, Hematoxilina-Eosina).

Fonte: Nóbrega (2014).

Figura 20 - Fotomicrografia de microscopia de luz mostrando detalhes do osso neoformado no membro controle com presença de material osteóide – São Paulo – 2014

Legenda: Área focal de material osteóide (* em branco) por entre o tecido conjuntivo celularizado evidenciando a fase de aposição óssea. (Aumento original de 400X, Hematoxilina-Eosina).
Fonte: Nóbrega (2014).

Figura 21 - Fotomicrografia de microscopia de luz mostrando detalhes do osso neoformado no membro controle com presença de osteoclastos – São Paulo – 2014

Legenda: Detalhe da área de neoformação óssea em que se nota células gigantes multinucleadas (* em branco) sugestivas de osteoclastos simbolizando a fase de remodelação óssea. (Aumento original de 400X, Hematoxilina-Eosina).
Fonte: Nóbrega (2014).

Figura 22 - Fotomicrografia de microscopia de luz mostrando detalhes do osso neoformado no membro com polímero – São Paulo – 2014

Legenda: Aspecto microscópico do polímero onde se nota coágulo em decomposição (C) nos poros do polímero (P) e áreas focais de matriz óssea (* em branco). (Aumento original de 100X, Hematoxilina-Eosina).
Fonte: Nóbrega (2014).

7.4.6.2 Técnica Tricrômico de Masson (TM)

Análise descritiva

As lâminas coradas com TM são apresentadas na forma de fotomicrografias (Figuras 23 a 27), identificando as estruturas encontradas.

Figura 23 - Fotomicrografia do tecido ósseo retirado por ostectomia evidenciando tecido ósseo compacto com grande quantidade de sistema de Havers e espaços medulares restritos – São Paulo – 2014

Nota: Observa-se grau de maturidade óssea elevado com poucas áreas de osso imaturo (áreas vermelhas). (Aumento original de 50X, Tricrômico de Masson).
Fonte: Nóbrega (2014).

Figura 24 - Fotomicrografia da biópsia do membro controle – São Paulo – 2014

Legenda: Tecido ósseo neoformado (ON) e limite nítido (setas) com osso preexistente (OP). O tecido ósseo neoformado exibe padrão compacto com sistemas de Havers ainda pouco nítidos e áreas de tecido ósseo imaturo (áreas vermelhas). (Aumento original de 25X, Tricrômico de Masson).
Fonte: Nóbrega (2014).

Figura 25 – Fotomicrografia da biópsia do membro com polímero – São Paulo – 2014

Legenda: Tecido ósseo neoformado (ON) adjacente a material exógeno compatível com polímero (P), exibindo padrão compacto sem sistemas de Havers evidentes. Nota-se tecido conjuntivo denso (TC) bem celularizado no interior dos poros do polímero. Limite (setas) entre tecido ósseo neoformado e osso preexistente (OP) é nítido. Em comparação ao membro controle, a área de tecido ósseo neoformado é pequena. (Aumento original de 50X, Tricrômico de Masson).
Fonte: Nóbrega (2014).

Figura 26 - Fotomicrografia mostrando aspectos microscópicos do polímero de poliuretana de mamona – São Paulo – 2014

Legenda: Tecido conjuntivo denso (TC) muito celularizado no poro do polímero (P), com área focal de tecido ósseo neoformado (* em branco). (Aumento original de 100X, Tricrômico de Masson).
Fonte: Nóbrega (2014).

Figura 27 – Fotomicrografia evidenciando área de degradação do polímero de poliuretana de mamona – São Paulo – 2014

Legenda: Área de degradação do polímero (P) com área de tecido ósseo focal (* em branco) adjacente ao osso preexistente (OP). (Aumento original de 100X, Tricrômico de Masson).
Fonte: Nóbrega (2014).

Análise histomorfométrica

Os resultados obtidos através da análise morfométrica são apresentados na forma de tabelas.

A Tabela 16 apresenta resultados da comparação da área de osso neoformado entre os membros com polímero e controle. Há uma diferença estatisticamente significativa entre os valores ($P=0,028$).

Na Tabela 17 observa-se a comparação do grau de maturidade óssea entre osso preexistente, biópsia do membro controle e biópsia do membro com polímero. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores.

Tabela 16 – Tabela da comparação da área (μm^2) de osso neoformado entre membro controle e membro com polímero – São Paulo – 2014

	Membro Controle	Membro Polímero	P*
Média	900843,42	294181,17	0,028
Mediana	1089454,75	281922,25	
Desvio padrão	354677,57	149082,40	
Mínimo	256734,00	96764,00	
Máximo	1148665,00	558787,50	

* Valor de P obtido por teste de Wilcoxon
Fonte: Nóbrega (2014).

Tabela 17 - Tabela da comparação do grau de maturidade óssea (%) entre cirurgia, biópsia do membro controle e biópsia do membro com polímero – São Paulo – 2014

	Cirurgia	Biópsia polímero	Biópsia controle	P*
Média	2,71%	24,44%	11,28%	0,223
Mediana	1,99	18,07	8,38	
Desvio padrão	2,5	28,27	12,14	
Mínimo	0,46%	0,00	2,43%	
Máximo	7,25%	79,07%	35,08%	

* Valor de P obtido por teste de Friedman
Fonte: Nóbrega (2014).

Discussão

8 DISCUSSÃO

Os resultados da pesquisa suportam o uso do polímero de poliuretano de mamona acrescido de carbonato de cálcio como substituto ósseo para uso em casos de fraturas com perda óssea em equinos. Uma vez que houve a aceitação do animal ao biomaterial, observada através de exames clínicos e laboratoriais, bem como achados histológicos, foi possível identificar comportamento osteocondutor do biomaterial e formação de tecido ósseo na região da ostectomia.

Fraturas em equinos

O tratamento de fraturas de ossos longos em equinos ainda é um desafio para o cirurgião ortopédico, seja pelo grande dano tecidual envolvido, inclusive com perda de fragmentos que impedem a reconstrução anatômica do osso, ou ainda pela grande quantidade de complicações decorrentes do pós-operatório. Além disso, o processo de consolidação de fratura requer período longo, de aproximadamente quatro meses em equinos adultos (McCLURE et al., 2010; LOPES; MARKEL, 2012), porém a perda de tecido ósseo pode, além de comprometer a estabilidade da osteossíntese, gerar período superior para completo reestabelecimento do animal e retorno funcional do mesmo (PARRIER et al., 2008). Esta importante limitação, desenvolveu o interesse na pesquisa de buscar uma alternativa viável como método auxiliar para potencializar o sucesso da técnica de osteossíntese, onde a ausência de fragmento ósseo pode comprometer a estabilidade da técnica, além de limitar as opções de condutas cirúrgicas.

Uso de substitutos ósseos

A pesquisa com uso de substitutos ósseos é ampla e vem sendo aprimorada ao longo dos anos (IGNÁCIO et al., 1997; ARA, 1999; HALL et al., 1999, CAVALIERI; SÁ-LIMA; GOMES, 2001; SOUZA; BRANDT; LIMA, 2002; MARIA et al., 2004; CAMPOS et al., 2005; ALAM et al., 2007; ABUKAWA et al.,

2006; NAVARRO et al., 2008; OLIVEIRA, et al., 2010; BETTI et al., 2011; BHATT; ROZENTAL, 2012), inclusive na espécie equina (KAWCAK et al., 2000; DORNBUSCH et al., 2010; COHEN et al., 2012), principalmente o uso de biomaterias que possam estimular a osteocondução e a osteoindução.

Diante da necessidade de se encontrar substituto ósseo para utilização em equinos, agregando as qualidades de um bom biomaterial sem que o custo inviabilizasse seu uso, foi utilizado o polímero de poliuretana de mamona, material atualmente comercializado no mercado nacional e internacional, com características conhecidas e estudadas em outras espécies (IGNÁCIO et al., 2002; DEL CARLO et al., 2003; BOLSON et al., 2005; SARAN et al., 2006; CELESTE et al., 2010). Tendo como fator diferencial realidade financeira da ortopedia de equinos, no mercado nacional, critério de escolha para realização do estudo que também foi considerado por Laureano Filho et al. (2007) para justificar a pesquisa deste biomaterial para uso futuro em casos clínicos na medicina.

Polímero de poliuretana de mamona

Estudos apresentando a eficácia *in vivo* do polímero de poliuretana de mamona no processo de regeneração óssea foram descritos em ratos (LEONEL et al., 2004), coelhos (LAUREANO FILHO et al., 2007), cães (MARIA; PADILHA FILHO; CASTRO, 2003), humanos (FEDAK et al., 2011) e equinos. Embora Ribeiro (2003) e Dornbusch et al. (2010) tenham realizado estudo experimental em equinos, o primeiro autor trabalhou com implante do polímero em espaço alveolar e o segundo realizou apenas avaliações radiográficas. Neste sentido, não foi encontrado na literatura estudo semelhante com os métodos de avaliação utilizados no presente projeto de pesquisa, principalmente associados em um mesmo trabalho e em equinos.

O uso do bloco pré-moldado do polímero foi utilizado para se observar o comportamento do biomaterial como auxílio no suporte da osteossíntese, criando uma ponte entre os segmentos ósseos, sendo este o principal resultado que se busca nas pesquisas de substitutos ósseos em equinos (WASELAU et al., 2007).

O polímero colhido pela biópsia após 120 dias da implantação apresentava consistência diferente da original, sendo amolecida e friável. Esta característica pode comprometer a estabilidade do foco de fratura se este processo de perda da configuração original ocorrer precocemente, antes da formação do calo ósseo.

Estudo da biocompatibilidade

Considerando-se o grande número de materiais que vêm sendo desenvolvidos, testados e clinicamente utilizados para preenchimento ou substituição óssea (WILLIAMS, 1987; RATNER et al., 2004; CHAN et al., 2009), cada um com composição química e características físicas adequadas para cada situação clínica, o requisito mínimo para implantação junto a tecidos biológicos, é adequada biocompatibilidade (BOSS, 1995). O polímero de mamona apresenta ampla literatura a respeito de seu comportamento e tolerância pelas mais variadas espécies, onde há consenso, de todos os autores, que ele apresenta biocompatibilidade após implante em tecido ósseo (KONIG JR et al., 1999; TEIXEIRA; RAMALHO, 1999; GARCIA JÚNIOR, 2000; CAVALIERI; SÁ-LIMA; GOMES, 2001; BONINI et al., 2002a; BONINI et al., 2002b; INÁCIO et al., 2002; DEL CARMO et al., 2003; JACQUES et al., 2004; LEONEL et al., 2004; SARAN, 2006).

Biocompatibilidade e capacidade de osteointegração não devem ser consideradas propriedades exclusivas da composição química dos biomateriais, uma vez que suas características físicas também podem ter papel decisivo no resultado final da regeneração (EL-WARRAK et al., 2004; JUNG et al., 2005; MENEZES; FREITAS; GONÇALVES, 2009). Propriedades como tamanho e forma das partículas, rugosidade superficial, existência e tamanho dos poros são fatores importantes na escolha do material e seu desempenho como implante (BOYAN et al., 1996; DAVIES, 1996; LEONEL et al., 2003). O material estudado apresentava características físicas previamente estabelecidas, com importantes qualidades buscadas para o uso em equinos, entre elas, estrutura sólida, porosa e com possibilidade de participação da estabilização da fratura em casos de perdas ósseas, critérios preconizados por Ratner et al. (2004) e Brandl; Sommer; Goepferich (2007).

Características dos equinos e metodologia empregada

Observou-se consolidação radiográfica no membro controle dos seis equinos utilizados na pesquisa. No entanto, embora o III Mtc, em sua origem embrionária, se desenvolva a partir de ossificação endocondral, não foi possível identificação de consolidação por via endocondral através do exame histológico. Contudo, ficou evidente a participação do periósteo no processo, reforçando a teoria da ativação desta estrutura após o trauma, como descrito por Hohmann et al. (1986), Malizos e Papathodorou (2005) e Augustin; Antabak; Davila (2007), o que promove neoformação óssea, conforme descrito por Rozen et al. (2007) e Schindeler et al. (2008).

O uso de cada animal como controle dele mesmo permitiu reduzir as variáveis do processo de regeneração óssea, provocada pelas particularidades de cada indivíduo. Pesquisa realizada por McDuffee et al. (2012) apontou resultados diferentes, em um mesmo período de tempo, para cada equino do estudo, porém, o padrão de regeneração do membro controle e do membro tratado foi semelhante entre si em um mesmo animal. Este fato reforça a proposta de comparação individual utilizada neste estudo e ratifica, ainda, a teoria de Waselau et al. (2007) com relação ao uso de cada equino como sendo controle dele mesmo, reduzindo as variáveis e aumentando o poder estatístico.

O modelo de ostectomia utilizada para avaliar o processo de regeneração foi adaptado da proposta de McDuffee et al. (2012), onde foi utilizado o osso IV metacarpiano. Southwood et al. (2006) afirmaram que a criação de defeito neste osso é um bom modelo para avaliação de novos métodos de tratamento para regeneração de fraturas em equinos. Para a proposta do estudo desta tese, com avaliação termográfica e ultrassonográfica, bem como a intenção de utilizar um osso, que sofre grande carga durante o processo regenerativo, optou-se por adaptar a técnica e realizar o ostectomia no osso III metacarpiano.

Outro critério para a seleção do osso III Mtc foi a incidência, bem como a gravidade, dos casos de fratura nesta região. Optou-se por falha na porção diafisária, por ser uma região formada por osso cortical, que apresenta taxa mais lenta de regeneração quando comparada ao osso esponjoso, permitindo

observar comportamento do processo de osteointegração do material implantado no período proposto, semelhante ao tempo de consolidação de fraturas em equinos (LOPES; MARKEL, 2012).

A ostectomia realizada não produziu defeito crítico, porém segue metodologia empregada em estudos prévios que avaliaram regeneração óssea de equinos após confecção de falha (SOUTHWOOD et al., 2006; PARRIER et al., 2008; McCLURE et al. 2010), embora estes tenham realizado a falha em osso II e IV metacarpiano ou metatarsiano.

Experimentação animal

O uso de animais em experimentação vem sofrendo inúmeras restrições para sua realização. A pesquisa desenvolvida, por se tratar de avaliar a resposta da espécie alvo, frente a um biomaterial específico, não permitiria que fossem extrapolados resultados obtidos de pesquisas com uso de ratos, coelhos ou macacos. Este critério também foi utilizado por Pearce et al. (2007) e Lacreta Jr et al. (2010). Maria; Padilha Filho; Castro (2003) enfatizaram os diferentes comportamentos que a poliuretana de mamona apresentou quando aplicada em diferentes espécies. Baseado nestas informações, reforçou-se a necessidade do estudo na espécie equina para que os resultados fossem fidedignos.

Observando-se os critérios atuais de bem estar animal, tanto legais quanto éticos, um grande diferencial na pesquisa desenvolvida, em se tratando do uso de equinos, foi que o estudo realizado não submeteu animais à eutanásia. Foi possível, através de biópsia óssea, colher material suficiente para realização de análises histológicas, diferentemente dos estudos realizados por Waselau et al. (2007), Ishihara et al. (2010), Cohen et al. (2012) e McDuffee et al. (2012), onde os animais foram submetidos a eutanásia para a colheita do material.

Avaliação clínica

Avaliação clínica permitiu monitoramento do estado geral do animal. O local onde foi realizada a ostectomia não apresentava recobrimento por tecidos

moles, além de não ter sido necessária manipulação de musculatura. Baseando-se nestes fatos esperava-se que os animais não apresentassem intenso desconforto no pós-operatório imediato. Os animais mantiveram-se sem demonstração de dor, tanto após o procedimento cirúrgico de confecção da falha, quanto no pós-operatório da realização da biópsia óssea. Nenhum dos animais apresentou impotência funcional dos membros operados, nem permanência em decúbito por tempo maior que o habitual para a espécie, sendo este parâmetro de avaliação também utilizado por Cohen (2012) após realização de ostectomia para avaliação de implante em equino.

Pelo exame físico diário foi possível demonstrar que durante todo o período de avaliação, os animais não apresentaram alterações dos parâmetros físicos. Através de exame foi observada claudicação no período de 30 a 60 dias e atribuiu-se esta claudicação ao momento de maior atividade regenerativa. Estes achados clínicos também foram encontrados por Waselau et al. (2007), que estudaram a regeneração óssea com implantes de cimento ósseo a base de magnésio em ostectomia de II e IV metatarsos de equinos, porém, os autores não relataram claudicação em nenhum momento da pesquisa. Este fato pode ser em função do osso III metacarpiano sofrer carga maior que os ossos II e IV metatarsianos e, por isso, ocasionar maior desconforto, uma vez que passam a maior parte do dia em estação com apoio de aproximadamente 60% do peso sobre os membros torácicos, principalmente sobre o III metacarpiano (BUDRAS; SACK; RÖCK, 2009).

Avaliação laboratorial

Os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo são citados na literatura como forma não invasiva do monitoramento do processo de regeneração (VIEIRA 1999; WATTS, 1999; MUKHOPADHYAY et al., 2011; SOUZA et al., 2011).

A consolidação normal de uma fratura é geralmente realizada por aumento da atividade osteoblástica. Os osteoblastos responsáveis tanto pela neoformação de matriz óssea, como em sua mineralização, secretam grande quantidade de fosfatase alcalina (MUKHOPADHYAY et al., 2011) como

observado nos equinos deste trabalho, com pico desta enzima em trinta dias de pós-operatório.

Os dois principais eventos que ocorrem após a fratura são reação aguda caracterizada por aumento sérico da atividade da fosfatase alcalina, hipocalcemia e hiperfosfatemia, além de processo hormonal anabólico que causa alterações no metabolismo do cálcio. Quando a formação do calo cessa a atividade da fosfatase alcalina e as concentrações de cálcio e fósforo retornam ao normal (KOMNENOU et al., 2005). Diante dos resultados encontrados na pesquisa com relação ao perfil da atividade da fosfatase alcalina, foi possível identificar o pico plasmático em 30 dias, quando, então, os níveis foram diminuindo gradativamente, e isto pode representar o período de maior atividade osteoblástica.

Komnenou et al. (2005) em estudo realizado em fraturas de ossos longos em cães, relataram o pico sérico de fosfatase alcalina após 10 dias da cirurgia. Os autores também observaram este mesmo comportamento nos níveis de cálcio e fósforo, com todos os parâmetros retornando para níveis basais a partir do 10º dia de pós-operatório. O mesmo perfil não foi observado nos equinos, pois os níveis de cálcio e fósforo não seguiram o mesmo padrão, sendo suas variações não significantes estatisticamente e podendo sua flutuação estar relacionada por fatores externos como a alimentação. O que não ocorreu nesta pesquisa, pois todos os equinos recebiam a mesma dieta.

Através da análise dos resultados da dosagem sérica da fosfatase alcalina foi possível identificar curva crescente com relação ao valor basal (D_0) até o trigésimo dia, quando os valores foram decrescendo gradativamente. Apesar da atividade da fosfatase alcalina sérica estar correlacionada com processo de regeneração, a isoenzima óssea da fosfatase alcalina é considerada o marcador mais específico de formação óssea (VIEIRA, 1999). Porém, não se encontra com facilidade laboratórios que façam esta mensuração para equinos. Na tentativa de validar o uso da fosfatase alcalina sérica como ferramenta auxiliar no monitoramento do processo de consolidação, foi realizado mensalmente exames para avaliar o perfil hepático, com o objetivo de descartar qualquer outro fator que pudesse interferir no valor da enzima atribuindo assim, as alterações nos níveis séricos da fosfatase alcalina, à atividade osteoblástica.

Avaliação ultrassonográfica

O exame ultrassonográfico permite avaliar precocemente o processo regenerativo (CRAIG; JACOBSON; MOED, 1999) e, segundo estudos recentes, é o método mais sensível e acurado para detecção precoce do processo de regeneração em fraturas diafisárias de ossos longos em pacientes clínicos (RISSELADA et al., 2007; POZZI; RISSELADA; WINTER, 2012). Baseado nestas pesquisas foi utilizado monitoramento do membro controle para o detalhamento do processo regenerativo, bem como método de padronização do processo na espécie equina. No membro com polímero, limitou-se a realização da análise das reações superficiais que pudessem ser causadas pelo polímero, uma vez que não foi possível avaliar a falha na presença do biomaterial, pela formação de sombra acústica posterior.

O uso do monitoramento ultrassonográfico como forma não invasiva de avaliar processo regenerativo permitiu visualização imediata das estruturas e mudanças que ocorreram durante o processo de consolidação da fratura. Além disso, uma característica salientada por Chen et al. (2014) de grande importância, é que esta técnica mostra-se livre de radioatividade, tanto para o paciente como para o examinador.

A US e o *Power Doppler* foram empregados para o monitoramento da nova formação óssea no foco da fratura, método também empregado por Caruso et al. (2000) e Hankenson et al. (2011) que observaram capilares circundando o foco de fratura considerando-os como sinais de neoangiogenese, sendo acompanhado de proliferação osteoblástica, inclusive na primeira semana após a fratura. Este processo só poderá ser identificado pela imagem ultrassonográfica aproximadamente três semanas após a injúria óssea (CRAIG; JACOBSON; MOED, 1999; RISSELADA et al., 2007). Esta precocidade pode ser comprovada através da análise dos avaliadores durante este projeto, pois o período onde se visualizou pela primeira vez material com ecogenicidade semelhante ao osso foi no dia 30, período onde foi detectado maior valor de fosfatase alcalina provavelmente decorrente da atividade osteoblástica intensa no local da ostectomia.

Foi possível o reconhecimento da presença de neovascularização com diferença estatística entre 7 e 30 dias, sendo que a avaliação ultrassonográfica

só apresentou resultados que identificassem neoformação óssea com resultados estatisticamente significantes entre 7 e 120 dias e 15 e 120 dias. Através da interpretação dos dados desta avaliação, o trigésimo dia foi onde se detectou maior presença de vascularização, período onde já havia sido constatado início de formação de tecido mineralizado decorrente de atividade osteoblástica, detectada pelo pico sérico da fosfatase alcalina.

O *Power Doppler* demonstrou presença de fluxo sanguíneo na avaliação do 15º dia de pós-operatório. Neste mesmo período, Rahimzaded et al. (2012) não observaram presença vascular em falhas ósseas induzidas em osso rádio de ratos, sendo possível detecção de fluxo somente a partir do 30º dia.

Após 120 dias todos os animais apresentaram, no membro controle, aspecto ultrassonográfico de consolidação da falha, embora tenha sido possível identificação de vasos circundando a região após a consolidação. Este fato também foi descrito por Risselada et al. (2007), que observaram presença de vascularização, mesmo depois de identificada a consolidação da fratura.

Avaliação termográfica

A inclusão da termografia como método de avaliação deveu-se ao seu caráter não invasivo e ausência de qualquer tipo de radiação penetrante, sendo o método de diagnóstico por imagem menos nocivo com relação à emissão de radiação tanto para o paciente como para o operador (HOLST, 2000; HEAD; DYSON, 2001).

A avaliação termográfica foi realizada no próprio local onde os animais ficavam alojados, sendo que as bandagens eram removidas aproximadamente 30 minutos antes do exame, para equilibrar a temperatura do membro com o ambiente, sendo este manejo utilizado por Erber et al. (2012) para avaliar a resposta da implantação de *microchip* em potros. Redaelli et al. (2014) ressaltaram a importância da realização do exame em locais protegidos do sol, ausência de fluxo de ar e pouca movimentação dos animais com uso de contenção física no momento da avaliação, técnica esta utilizada neste projeto.

Para minimizar os efeitos ambientais, optou-se por não deslocar os animais do local onde estavam estabulados e preocupou-se com o período prévio ao exame, onde o animal permaneceu tranquilo e sem uso de

bandagens de proteção. Levet et al. (2009) utilizaram salas climatizadas para a realização de avaliação de feridas causadas pelo uso de talas de gesso em equinos, padronizando o local de avaliação e estabilizando a temperatura da pele. Ao contrário da metodologia utilizada nos trabalhos desenvolvidos por Levet et al. (2009) e Erber et al. (2012), na opinião da autora desta tese, os animais avaliados estavam em suas casas e eram trazidos para a avaliação, o que dificulta a aclimação e, por isso, foi necessária a padronização de sala com temperatura constante a fim de minimizar os efeitos externos nestes animais.

Para avaliação dos resultados termográficos optou-se por demarcar a área central do III Mtc e trabalhou-se com a temperatura média da região. Esta também foi a conduta adotada por Hoogmoed et al. (2000) quando estudaram o efeito de substâncias tóxicas em membro distal de equinos, utilizando a avaliação termográfica da região como forma de identificar alterações no fluxo sanguíneo da pele.

Encontrou-se diferença estatística na análise termográfica, demonstrando que no membro com polímero houve maior temperatura média no período de sete dias de pós-operatório, quando comparado com o membro controle. Estudos avaliando a biocompatibilidade da poliuretana de mamona já realizados em diferentes modelos experimentais. Costa et al. (1997) relataram que o biomaterial provocou resposta inflamatória moderada quando implantado em tecido subcutâneo de ratos, na avaliação histológica de 7 e 15 dias, e esta regrediu após este período.

Estudo realizado por Dontos (2005) que implantou fio de poliuretana a base de óleo de mamona em dorso de camundongos, observou, em 15 dias, ausência de resposta inflamatória, porém com vasodilatação regional em toda a área que circundava o material. Acredita-se que o aumento da temperatura de forma pontual, como ocorreu com os equinos desta tese, possa ser atribuído pela inflamação causada pela indução da falha, como também pelo quadro de vasodilação localizada, que como na pesquisa em ratos, não se perpetuou havendo normalização nas avaliações seguintes. Acredita-se ainda, que mesmo o material apresentando biocompatibilidade, certo grau de resposta inflamatória é esperado por se tratar da implantação de corpo estranho. Porém,

esperava-se que fosse uma resposta não intensa e temporária, o que ocorreu com os animais nesta pesquisa.

Baseado na análise termográfica individual (Apêndice E) foi possível identificar padrão individual para cada animal e, embora houvesse uma tendência semelhante em alguns momentos, não foi possível estabelecer causas específicas naqueles animais que não apresentaram resultados próximo da média em determinada avaliação. Pode-se afirmar que houve relação entre cada animal com o membro contralateral do estudo. Ambos responderam de forma semelhante no transcorrer do tempo. Este resultado reforça o princípio do uso do membro ou área contralateral do próprio animal como controle, quando se busca diferenças térmicas causadas por inflamação decorrente de alguma injúria local. Este critério de avaliação termográfica cutânea é padronizado internacionalmente onde se compara sempre as metades correspondentes do corpo humano (BRIOSCHI; MACEDO; MACEDO, 2003).

Avaliação macro e microscópica

Na análise macroscópica da biópsia do membro com polímero, observou-se que o biomaterial não foi absorvido em nenhum dos animais, permanecendo no formato original, porém, tornando-se menos resistente a manipulação após 120 dias da implantação, característica também observada por Bolson et al. (2005). Este é um critério que induz pesquisas futuras a respeito da resistência mecânica do material, após sua implantação.

O estudo histológico, como já definido por Hernandez et al. (2012), permitiu análise da arquitetura óssea, fornecendo dados para determinação qualitativa de células e componentes da matriz extracelular que circundavam o biomaterial. A microscopia foi utilizada para avaliar área de osso produzida no membro controle e compará-la com a quantidade de osso produzida na presença do biomaterial. Os dados histológicos suportam a tese de que o biomaterial sofreu processo de decomposição e permitiu a formação de novo osso em seu interior.

Houve menor quantidade de tecido ósseo neoformado no membro com polímero, com presença de grande quantidade de biomaterial no local da falha.

Esse fato também foi relatado por Carvalho et al. (1997), que implantaram grânulos derivados do óleo de mamona após exodontia de incisivos de ratos e Mateus (2013), que encontrou grande quantidade de material após preenchimento de falhas cilíndricas em asa ilíaca de coelhos com Composto Ósseo de Ricinus (C.O.R.) granulado, em estudo histológico, após 120 dias de avaliação.

O grupo controle foi caracterizado pela maior quantidade de tecido ósseo neoformado quando comparado ao grupo com polímero, o que difere dos resultados de Mateus (2013), onde o defeito com presença do polímero de mamona na forma granulada produziu maior quantidade de osso na área de ostectomia do que no membro controle. O perióstio participou ativamente do processo regenerativo em função de sua propriedade osteoindutiva (ALLEN; HOCK; BURR, 2004) e auxiliou a regeneração. No membro com polímero, não houve distribuição homogênea do tecido neoformado dentro da falha óssea, ficando este somente nas áreas que circundavam o polímero permanecendo grande parte, principalmente no centro do cilindro do biomaterial, de material intacto e sem presença de células.

A apresentação física do polímero em forma de bloco pré-moldado pode ter prejudicado o processo hemorrágico local que permite a formação do calo hemorrágico, fundamental para o processo regenerativo. Este aspecto foi levantado também por Da Cunha (2012), que encontrou limitações na neoformação óssea com o uso de membrana entre a falha óssea e o perióstio em coelhos. Levanta-se a possibilidade que o uso do biomaterial em outra apresentação, como a que sofre polimerização no foco da fratura, possa permitir ser entremeado por sangue e assim aumentar a quantidade de tecido ósseo neoformado.

No membro com polímero, aparentemente, não houve formação do coágulo pós-injúria que serve de matriz para a migração de fatores osteoindutivos. Esta limitação também foi descrita em pesquisas que avaliaram a expressão de proteínas que participam do estágio osteoindutivo do processo de regeneração óssea, a partir de defeitos criados em calvária de ratos (GUSKUMA, et al. 2013) e mandíbula de coelhos (ALAM et al., 2007).

Os materiais osteocondutores servem como substrato para a formação óssea, atuando como arcabouço para a formação de tecido mineralizado sem

induzir modificações celulares ou estimular diferenciação de osteoblastos. Os achados histológicos comprovam atividade osteocondutora do polímero de poliuretana de mamona. Este comportamento já havia sido estudado e comprovado em outras espécies (RIBEIRO, 2003; LEONEL et al., 2004; LAUREANO FILHO et al., 2007).

O polímero sofreu osteointegração direta, uma vez que foi possível identificar contato direto do biomaterial com tecido ósseo neoformado. Este resultado já foi observado e descrito em pesquisas realizadas em coelhos por Frascino (1998) e Saran (2006) e em equinos (RIBEIRO, 2003).

Não foi observada reação inflamatória crônica, como em estudo realizado por Ohara et al. (1995), nem sinais de toxicidade ou reação a corpo estranho no período avaliado, podendo-se atribuir boas propriedades de biocompatibilidade ao polímero de poliuretana de mamona. Biocompatibilidade, previsibilidade, facilidade de aplicação e ausência de toxicidade são algumas das características desejadas e citadas por Williams (1987), para que o biomaterial possa ser aplicado em situações clínicas que exigem uso de biomaterial. Este comportamento do polímero, em equinos, pode ser extrapolado para outras espécies, pois Celeste et al. (2010) encontraram reação inflamatória de moderada a intensa em experimento que implantou discos de poliuretana de mamona em tecido subcutâneo de ratos.

No membro controle foram identificadas áreas focais de matriz óssea com osteoclastos na região de matriz osteóide, indicando que o processo de regeneração estava ocorrendo conforme o esperado para situações sem tratamento (SCHINDELER et al., 2008; ROSENBERG, 2010).

Egan; Brennan; Pignolo (2012) concluíram que as vantagens das análises morfométricas residem na possibilidade de estas serem realizadas com uso de *software* de reconhecimento de imagens que possibilita abordagem mais acurada para avaliação da microestrutura óssea. O presente estudo valeu-se desta técnica para aferir a área de tecido ósseo neoformado e o grau de maturidade óssea visando mensurar estas variáveis e estabelecer correlações entre elas e, assim, estudar a reparação tecidual.

A associação entre análise histológica e estudo histomorfométrico permite a elaboração de parâmetros mensuráveis da interação do biomaterial implantado com o tecido ósseo. Albertin (2004) salientou a importância deste

tipo de análise quantitativa em estudos que objetivam avaliar e subsidiar a efetividade de nova modalidade terapêutica no acompanhamento da neoformação óssea. Baseando-se nestes conceitos buscou-se realizar nesta pesquisa este método de avaliação para permitir a análise de valores numéricos que expressassem o perfil da regeneração óssea após o implante do polímero de poliuretano de mamona.

Conclusões

9 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e nas condições em que o experimento foi conduzido, este estudo permitiu concluir que:

- Polímero a base de poliuretana de mamona acrescido de carbonato de cálcio demonstrou ser biocompatível para uso como substituto ósseo não demonstrando reação de corpo estranho e toxicidade em avaliações clínicas, macroscópicas e microscópicas.
- O exame ultrassonográfico permitiu o monitoramento do processo regenerativo e o *Power Doppler* identificou o processo de neovascularização envolvido na consolidação do membro controle.
- A avaliação termográfica permitiu a identificação de área de hipertermia em membro com polímero quando comparado ao membro controle.
- Polímero a base de poliuretana de mamona acrescido de carbonato de cálcio propiciou formação de matriz osteogênica demonstrada histologicamente pela interação do tecido ósseo neoformado com o biomaterial.
- Polímero a base de poliuretana de mamona acrescido de carbonato de cálcio demonstrou características osteocondutoras, porém foi barreira física que ocasionou menor formação óssea se comparado ao membro controle.
- Estudos clínicos com foco na resistência mecânica com o transcorrer do tempo de implantação precisam ser realizados, entretanto os resultados iniciais do polímero de mamona são promissores para uso em casos de fraturas com perda óssea em equinos.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABUKAWA, H.; PAPADAKI, M.; ABULIKEMU, M.; LEAF, J.; VACANTI, J. P.; KABAN, L. B.; TROULIS, M. J. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: a review of biomaterials for scaffolds and implant coatings. **Dental Clinics of North America**, v. 50, n. 2, p. 205-216, 2006.
- ADRIÃO, R. J. B. **Biomateriais e reações de hipersensibilidade – um problema ortopédico?** 2011. 56 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade da Beira Interior – Ciências da Saúde, Covilhã, 2011.
- AFONSO, A. S. **Interacção entre biomateriais e tecido ósseo**. 1998. 213 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Porto, 1998.
- ALAM, S.; UEKI, K.; MARUKAWA, K.; OHARA, T.; HASE, T.; TAKAZAKURA, D.; NAKAGAWA, K. Expression of bone morphogenetic protein 2 and fibroblast growth factor 2 during bone regeneration using different implant materials as an onlay bone graft in rabbit mandibles. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 103, n. 1, p. 16-26, 2007.
- ALBERTIN, L. M. Efeito do ultrassom sobre o reparo de falha óssea experimental; avaliação quantitativa e morfológica do parâmetro tempo de estimulação. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2004.
- ALLEN, M. R.; HOCK, J. M.; BURR, D. B. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. **Bone**, v. 35, n. 5, p. 1003-1012, 2004.
- ARA, C. A. Fijación cervical com polímero vegetal. **Revista de Neurocirurgia**. v. 2, n. 3, p. 103-107, 1999.
- ARANA, V., BRADASCHIA, V. Tecido nervoso. In: _____. **Biologia Celular e Tecidual para Odontologia**. 1. ed. São Paulo: Elsevier, 2012, cap. 11, p. 220-255.
- AUGUSTIN, G.; ANTABAK, A.; DAVILA, S. The periosteum Part 1: Anatomy, histology and molecular biology. **Injury**, v. 38, n. 10, p. 1115-1130, 2007.
- BAADSGAARD, K. Transplantation of pedicle bone grafts to fresh skeletal defects and defect pseudarthroses. An experimental study. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 41, n. 3, p. 261-271, 1970.
- BANWART, J. C. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. **Spine Journal**, v. 20, n. 9, p. 1055-1060, 1995.
- BASILE, R. C.; BASILE, M. T.; ALBERNAZ, R. M.; PEREIRA, M. C.; ARAÚJO, R.; FERRAZ, G. C.; QUEIROZ-NETO, A. Guia prático de exames termográficos em equinos. **Brasilian Journal of Equine Medicine**, n. 31, p. 24-28, 2010.

BETTI, L. V. BRAMANTE, C. M.; GRANJEIRO, J. M. TAGA, E. M.; CESTARI, T. M. TAGA, R. Repair of rabbit femur defects treated with bovine bone organic cancellous matrix in blocks or cortical matrix in micro granules. **The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 26, n. 6, p. 1167-1175, 2011.

BHATT, R. A.; ROZENTAL, T. D. Bone graft substitutes. **Hand Clinics**, v. 28, n. 4, p. 457-468, 2012.

BLANE, C. E.; HERZENBERG, J. E.; DiPIETRO, M. A. Radiographic imaging for Ilizarov limb lengthening in children. **Journal of Pediatric Radiology**, v. 21, n. 2, p. 117, 1991.

BOER, H. H. The history of bone grafts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 226, p. 292-298, 1988.

BOLSON, J.; SCHOSSLER, J. E.; ORNES, R. C.; MOTTIN, V.; ALBERTI, T. Análise clínica, radiológica, macroscópica e histológica do úmero de codornas domésticas (*Coturnix japonica*), submetido ao implante da poliuretana derivada do polímero de mamona (*Ricinus communis*). **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1123-1130, 2005.

BONEWALD, L. F. Mechanosensation and transduction in osteocytes. **Bonekey Osteovision**, v. 3, n. 10, p. 7-15, 2006.

BONINI, S. **Avaliação da resposta inflamatória à poliuretana derivada do óleo de mamona: estudo experimental em camundongos**. 1999. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.

BONINI, S.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; LARA, V. S. Resposta inflamatória à poliuretana derivada do óleo de mamona: estudo da migração e diferenciação de células no sítio inflamatório. **Revista Odonto Ciência**, v. 17, n. 35, p. 27-37, 2002a.

BONINI, S.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; CAMPANELI, A. P. Resposta inflamatória à poliuretana derivada do óleo de mamona: avaliação da citotoxicidade e ativação de macrófagos em cultura. **Revista Odonto Ciência**, v. 17, n. 37, p. 307-17, 2002b.

BOSS, J. H.; SHAJRAWI, I.; AUNULLAH, J.; MENDES, D. G. The relativity of biocompatibility. A critical of the concept of biocompatibility. **Israel Journal of Medical Science**, v. 31, n. 4, p. 203-209, 1995.

BOYAN, B. D.; HUMMERT, T. W.; DEAN D. D.; SCHWARTZ, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 137-146, 1996.

BRANDI, M. L. Microarchitecture, the key to bone quality. **Rheumatology**, v. 48, n. 4, p. 3-8, 2009. Supplement.

BRANDL, F.; SOMMER, F.; GOEPFERICH, A. Rational design of hydrogels for tissue engineering: impact of physical factors on cell behavior. **Biomaterials**, v. 28, n.2, p. 34–146, 2007.

BRIOSCHI, M. L.; MACEDO, J. F.; MACEDO, R. A. C. Termometria cutânea: novos conceitos. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 2, n. 2, p. 151-160, 2003.

BUCKWALTER, J. A.; GLIMCHER, M. J.; COOPER, R. R.; RECKER, R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. **Instructional Course Lecture**, v. 45, p. 371-386, 1996.

BUDRAS, K.; SACK, W. O.; RÖCK, S. Thoracic limb. In: BUDRAS, K.; SACK, W. O.; RÖCK, S. (Eds). **Anatomy of the Horse**. Hannover: Schlütersche, 2009, cap. 2, p. 4-14.

CAMPOS, S. D.; CAMPOS, E. A.; SILVEIRA, C. B.; BINI, R. A. Biomateriais à base de Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅ preparados com serragem e com glucose de milho: influência na porosidade e na cristalinidade. **Cerâmica**, v. 51, n. 319, p. 274-279, 2005.

CARNEIRO, E. **Análise microscópica descritiva do efeito do tamanho das partículas de matriz de osso medular bovino desmineralizado na reparação de defeito ósseo em fêmures de coelhos**. 2003. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia – Universidade de São Paulo, Bauru, 2003.

CARVALHO, T. L.; ARAÚJO, C. A.; TEÓFILO, J. M.; BRENTAGANI, L. G. Histologic and histometric evaluation of rat alveolar wound healing around polyurethane resin implants. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 26, n. 2, p. 149-52, 1997.

CARUSO, G.; LAGALLA, R.; DERCHI, L.; IOVANE, A.; SANFILIPPO, A. Monitoring of fracture calluses with color doppler sonography. **Journal of Clinical Ultrasound**, v. 28, n. 1, p. 20-27, 2000.

CAVALIERI, I.; SÁ-LIMA, J. R.; GOMES, M. F. Estudo do processo de reparação óssea entre os implantes de polímero de mamona, resina acrílica termicamente ativada e cimento ósseo em tíbias de coelhos. **BCI**, v. 8, n. 29, p. 64-70, 2001.

CELESTE, S. A.; RAHAL, S. C.; PEREIRA JR, O. C. M.; SEQUEIRA, J. L. MELO, S. M. Resposta tecidual a implantes de discos de poliuretano de mamona nas formas pré-moldada ou biomassa moldada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 12, p. 1089-1095, 2010.

CHAN, Y. L.; NGAN, A. H. W.; KING, N. M. Use of focused ion beam milling for investigating the mechanical properties of biological tissues: a study of human primary molars. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 2, n. 4, p. 375-383, 2009.

CHEN, K. Y.; SHYU, P. C.; DONG, G. C.; CHEN, Y. S.; KUO, W. W.; YAO, C. H. Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. **Biomaterials**, v. 30, n. 9, p. 1682-1688, 2009.

CHEN, Y. C.; LIN, Y.; WANG, S.; LIN, S.; SHUNG, K. K.; WU, C. C. Monitoring tissue inflammation and responses to drug treatments in early stages of mice bone fracture using 50 MHz ultrasound. **Ultrasonics**, v. 54, n.1, p. 177-186, 2014.

COHEN, J. M.; SOUTHWOOD, L. L.; ENGILES, J.; LEITCH, M.; NUNAMAKER, D. M. Effects of a novel hydrogel on equine bone healing: a pilot study. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 25, n. 3, p. 184-191, 2012.

CONSTANTINO, P. D.; CRAIG, D. F.; JONES, K.; CHOW, L. C., PETER, H.; SISSON, G. A. Hydroxyapatite cement. I. Basic chemistry and histologic properties. **Archives of Otolaryngology – Head and Neck Surgery**, v. 117, n. 4, p. 379-384, 1991.

COOK, A. D.; HRKACH, J. S.; GAO, N. N.; JOHNSON, I. M.; PAJVANI, U. B., CANNIZARO, S. M.; LANGER, R. Characterization and development of RGD-peptide- modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive resorbable biomaterial. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 35, n.4, p. 513-523, 1997.

COSTA, C. A. S.; MARCANTONIO, R. A. C.; HEBLING, J.; TEIXEIRA, H. M.; KURAMAE, M. Biocompatibilidade do polímero de poliuretana vegetal derivada do óleo de mamona em estudo comparativo com cimento de óxido de zinco e eugenol: avaliação histopatológica de implantes subcutâneos de ratos. **Odonto** 2000, v. 1, n. 1, p. 44-48, 1997.

CRAIG, J. G.; JACOBSON, J. A.; MOED, B. R. Ultrasound of fracture and bone healing. **Radiologic Clinics of North America**, v. 37, n. 4, p. 737-751, 1999.

DA CUNHA, O. **Interação biológica de membranas poliméricas bioativas em falhas ósseas induzidas em tíbias de coelhos**. 2012. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

DALAPICULA, S. S.; VIDIGAL JR, G. M.; CONZ, M. B; CARDOSO, E. S. Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas. Uma revisão crítica. **Implant News**, v. 3, n. 5, p. 487-491, 2006.

DAREA, E. V.; GRIFFITHA, M.; POITRASB, P.; KAUPPC, J. A.; WALDMANC, S. D.; CARLSSOND, D. J.; DERVINE, G.; MAYOUCXD, C.; HINCKEA, M. T. Genipin cross-linked fibrin hydrogels for in vitro human articular cartilage tissue-engineered regeneration. **Cells, Tissues, Organs**, v. 190, n. 6, p. 313-325, 2009.

DAVIES, J. E. Histodynamics of endosseous wound healing. In:_____. **Bone engineering**. Canada: EM2, 2000, pp. 1-11.

DAVIES, J. E. In vitro modeling of the bone/implant interface. **The Anatomical Record**. v. 245, n. 2, p. 426-445, 1996.

DEL CARLO, R. J.; KAWATA, D.; VITORIA, M. I. V.; OLIVEIRA, D. R., SILVA, A. S.; MARCHESI, D. R.; GALVÃO, S. R.; AZEVEDO, P.; MONTEIRO, B. S. Polímero derivado de mamona acrescido de cálcio, associado ou não à medula óssea autógena na reparação de falhas ósseas. **Ciência Rural**, v. 33, n. 6, p. 1081-1088, 2003.

DIAS, P. C. J.; GRANATO, L.; RAMALHO, L. T. O.; OLIVEIRA, J. A.; PRETEL, H. Avaliação histológica da biocompatibilidade do polímero de mamona no dorso nasal de macacos-pregos (*Cebus apella*). **Brasilian Journal of Otorrinolaryngology**, v. 75, n. 3, p. 350-356, 2009.

DONTOS, A. C. “Fio lifting biológico” (fio serrilhado de poliuretana do óleo de mamona) – avaliação de sua biocompatibilidade e eficácia no rejuvenescimento facial. 2005. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

DORIA, A. S.; CUNHA, F. G.; MODENA, N.; RODRIGUES, C. J.; GARCEZ, A. T.; GODOI JR., R.; NETO, R. B.; MELO, I. B.; BUCHPIGUEL, C.; MOLNAR, R. J.; GUARNIERO, R. Effect of intertrochanteric osteotomy on the proximal femur of rabbits: assessment with Power Doppler sonography and scintigraphy. **Clinics**, v. 62, n. 6, p. 741-748, 2007.

DORNBUSCH, P. T.; ARAÚJO, I. G. R.; TASQUETTI, U. Y.; PIMPÃO, C. T.; PRADO, A. M. B.; HUSSNI, C. A. Avaliação radiográfica da aplicação do polímero de mamona em falhas ósseas induzidas em equinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2010.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1501-1504, 2000.

DUNCAN, R. L.; TURNER, C. H. Mecanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. **Calcified Tissue International**, v. 57, n. 5, p. 344-358, 1995.

EDDY, A. L.; VAN HOOOGMOED, L. M.; SNYDER, J. R. The role of thermography in the management of equine lameness. **The Veterinary Journal**, v. 162, n. 3, p. 172-181, 2001.

EDMUNDS, H. L. The sangreal. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 90, n.1, p. 1-6, 1985.

EGAN, K. P.; BRENNAN, T. A.; PIGNOLO, R. Bone histomorphometry using free and commonly available software. **Histopathology**, v. 61, n. 6, p. 1168-1173, 2012.

EL-WARRAK, A. O.; OLMSTEAD, M.; APELT, D.; DEISS, F.; NOETZLI, H.; ZLINSKY, K.; HILBE, M.; BERTSCHAR-WOLFSBERGER, R.; JOHNSON, A. L.; AUER, J.; RECHENBERG, B. V. An animal model for interface tissue formation in cemented hip replacements. **Veterinary Surgery**, v. 33, p. 495–504, 2004.

ERBER, R.; WULF, M.; BECKER-BIRCK, M.; KAPS, S.; AURICH, J. E.; MÖSTL, E.; AURICH, C. Physiological and behavioral responses of young horses to hot iron branding and microchip implantation. **The Veterinary Journal**, v. 191, n. 2, p. 171-175, 2012.

FEDAK, P. W.; KASATKIN, A. Enhancing sternal closure using Kryptonite bone adhesive: technical report. **Surgical Innovation**, v. 18, n. 4, p. NP8-NP11, 2011.

FERGUSON, C.; ALPERN, E.; MICLAU, T.; HELMS, J. A. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? **Mechanisms of Development**, v. 87, n. 1-2, p. 57-66, 1999.

FLEMING, J. E.; CORNELL, C. N.; MUSCHLER, G. F. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. **The Orthopedic Clinics of North America**, v. 31, n. 3, p. 357-374, 2000.

FLORIN, M.; ARZDORF, M.; LINKE, B.; AUER, J. A. Assessment of stiffness and strength of 4 different implants available for equine fracture treatment: a study on a 20° oblique long-bone fracture model using a bone substitute. **Veterinary Surgery**, v. 34, n. 3, p. 231-238, 2005.

FRASCINO, I. F. **Implante de resina de poliuretana vegetal em cranioplastia: estudo experimental em coelhos**. 1998. 96 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1998.

FREITAS, I. G. F. **Ação do laser de HeNe na osteogênese**. 2001. 73 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica, Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

FRITTON, S. P.; KENNETH, J. M.; RUBIN, C. T. Quantifying the strain history of bone: spatial uniformity and self-similarity of low-magnitude strains. **Journal of Biomechanics**, v. 33, n. 3, p. 317-325, 2000.

FUKADA, E.; YASUDA, I. On the piezoelectric effect of bone. **Journal of the Physical Society of Japan**, v. 12, n. 10, p. 1158-1162, 1957.

GARCIA, S. D.; PERRI, S. H. V.; CHIERICE, G.; CARDOSO, D. Avaliação da toxicidade subaguda e multigeracional da ingestão de derivado do polímero de mamona em ratos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 219-225, 2009.

GARCIA JR, I. R. **Avaliação experimental de três diferentes tipos de implantes: polímero de mamona, polietileno de alta densidade – Medpor e matriz óssea bovina, no preenchimento de defeitos ósseos maxilares. Estudo histológico e histométrico em macacos**. 2000. 73 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Araçatuba, 2000.

GAMBLE, M. The hematoxylin and eosin. In: BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. (Eds.). **Theory and Practice of Histological Techniques**. 6. ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2008, cap. 9, p. 121-134.

GERMANI, M. H.; TANAKA, N. M.; STURION, D. J.; FERREIRA, M.; MEDEIROS JÚNIOR, L. C.; GERMANI, K. B. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero da mamona (*Ricinus communis*) implantada em orelha de cão. **Unimar Ciência**, v. 7, n. 1, p. 147-149, 1998.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. **Injury**, v. 36, n. 3, p. 20-27, 2005. Supplement.

GRANJEIRO, J. M. Hidroxiapatita para uso clínico: caracterização físico-química. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 40, p. 130-134, 1992.

GOODSHIP, A. E.; SMITH, R. K. W. Skeletal physiology: responses to exercise and training. In: HINCHCLIFF, K. W.; KANAPS, A.; GEOR, R. J. (Eds). **Equine Sports Medicine and Surgery**. Philadelphia: Saunders, 2004, cap. 7, p. 111-129.

GUSMÃO, C. V. B., BELANGERO, W. D. Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico? **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 44, n. 4, p. 299-305, 2009.

HALL, E. E.; MEFFERT, R. M.; HERMANN, J. S.; MELLONIQ, J. T.; COCHRAN, D. L. Comparison of bioactive glass to demineralized freeze-dried bone allograft in the treatment of intrabony defects around implants in the canine mandible. **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 5, p. 526-535, 1999.

HANKENSON, K. D.; DISHOWITZ, M.; GRAY, C.; SCHENKER, M. Angiogenesis in bone regeneration. **Injury**, v. 42, n.6, p. 556-561, 2011.

HEAD, M. J.; DYSON, S. Talking the temperature of equine thermography. **Veterinary Journal**, v. 162, n. 3, p. 166-167, 2001.

HEBROCK, S. J. The mity of the heel-first landing – part 1. 2011. Disponível em <http://www.enlightenedequine.com>. Acesso em 25/02/2014.

HENCH, L. Biomaterials. **Science**, v. 208, n. 4446, p. 826-831, 1980.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-generation biomedical materials. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1014-1017, 2002.

HERNANDES, L.; RAMOS, A. L.; MICHELETTI, K. R.; SANTI, A. P.; CUOGUI, O. A.; SALAZAR, M. Densitometry, radiography and histological assessment of collagen as methods to evaluate femoral bones in an experimental model of osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 23, n. 2, p. 467-473, 2012.

HOHMANN, E. L.; ELDE, R. P.; RYSAVY, J. A.; EINZIG, S.; GEBHARD, R. L. Innervations of periosteum and bone by sympathetic vasoactive intestinal peptide – containing nerve fibers. **Science**, v. 232, n. 4752, p. 868-871, 1986.

HOLST, C. G. **Common sense approach to thermal imaging**. Washington: SPIE Optical Engineering Press, 2000.

HOOGMOED, L.; SNYDER, J. R.; ALLEN, A. K.; WALDSMITH, J. D. Use of infrared thermography to detect performance-enhancing techniques in horses. **Equine Veterinary Education**, v. 12, n. 2, p. 102-107, 2000.

IGNÁCIO, H.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; CHIERICI, G. O. Uso da poliuretana derivada do óleo de mamona para preencher defeitos ósseos diafisários segmentares do rádio. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 32, n. 10, p. 815-822, 1997.

IGNÁCIO, H.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; CHIERICI, G. O. Use of compact and porous castor oil polyurethane in the filling of bone defects. Experimental study in dogs. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 37, n. 5, p. 187-194, 2002.

ISHIHARA, A.; ZEKAS, L. J.; LITSKY, A. S.; WEISBRODE, W. E.; BERTONE, A. L. Dermal fibroblast-mediated BMP₂ therapy to accelerate bone healing in an equine osteotomy model. **Journal of Orthopedic Research**, v. 28, n. 3, p. 403-411, 2010.

JACKLIN, B. D.; WRIGHT, I. M. Frequency distributions of 174 fractures of the distal condyles of the third metacarpal and metatarsal bones in 167 Thoroughbred racehorses (1999-2009). **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 6, p. 707-713, 2012.

JACQUES J. W.; FAGUNDES D. J.; FIGUEIREDO A. S.; INOUE C. M.; SCAPULATEMPO, R. P.; SASSIOTO M. C. P. The role of the ricin polyurethane as substitute of the bone autogenous graft in rabbits. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 31, n. 4, p. 236-241, 2004.

JALILI, K.; ABASSI, F.; OSKOEI, S. S.; ALINEJAD, Z. Relationships between The morphology, swelling and mechanical properties of poly(dimethyl siloxane)/poly (acrylic acid) interpenetrating networks. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 2, n. 5, p. 534-541, 2009.

JENSEN, S. S. Tissue reaction and material characteristics of four bones substitutes. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 11, n. 1, p. 55-56, 1996.

JUNG, Y.; KIM, S. S.; KIM, Y. H.; KIM, S. H.; KIM, B. S.; KIM, S., CHOI, C. Y.; KIM, S. H. A poly(lactic acid)/calcium metaphosphate composite for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 32, p. 6314-6322, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In:_____. **Histologia básica: texto/atlas**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008, cap. 8, p. 185-152.

KAWCAK, C. E.; TROTTER, G. W.; POWERS, B. E.; PARK, R.D.; TURNER, A. S. Comparison of bone healing by demineralized bone matrix and autogenous cancellous bone in horses. **Veterinary Surgery**, v. 29, n. 3, p. 218-226, 2000.

KHAN, S. N. Clinical applications of bone graft substitutes. **The Orthopedic Clinics of North America**, v. 31, n. 3, p. 389-398, 2000.

KHARMANDAYAN, P. **Observação sobre a superfície de interface entre osso e implantes de poliuretano com e sem carbonato de cálcio. Estudo experimental em coelhos**. 1997. 65 f. Tese (Doutorado em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental). São Paulo, Universidade Federal de São Paulo. 1997.

KLEIN-NULEND, J.; VAN DER PLAS, A.; SEMEINS, C. M.; AJUBI, N. E.; FRANGOS, J. A.; NIJWEIDE, P. J.; BURGER, E. H. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. **Faseb Journal**, v. 9, n. 5, p. 441-445, 1995.

KLEIN-NULEND, J.; BACABAC, R. G.; MULLENDER, M. G. Mechanobiology of bone tissue. **Pathologie Biologie**, v. 53, n. 10, p. 576-580, 2005.

KOMNENOU, A.; KARAYANNOPOULOU, Z. S.; POLIZOPOULOU, Z. S.; CONSTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 1, p. 35-38, 2005.

KONIG JR, B.; FORGER S. E.; MASCARO M. B.; BECK T. J. Bio-compatibility of the polyurethane resin of the castor bean inserted into the alveolar bone of the dog. **Annals of Anatomy**, v. 181, n. 6, p. 581-584, 1999.

KRANE, S. M.; INADA, M. Matrix metalloproteinases and bone. **Bone**, v. 43, n. 1, p. 7-18, 2008.

LACRETA JR, A. C. C.; REGONATO, E.; COSSI, L. B.; CRUVINEL, C. A. T.; CANOLA, J. C. Modelo experimental de falha óssea por meio de ostectomia do rádio em coelhos. **Biotemas**, v. 23, n. 3, p. 149-157, 2010.

LAUREANO FILHO, J. R.; CASTELO BRANCO, B. L.; ANDRADE, E. S. S.; BARBOSA, J. R. A. Comparação histológica entre osso desmineralizado e

polímero de mamona sobre a regeneração óssea. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 2, p. 186-192, 2007.

LEGEROS, R. Z.; CRAIG, R. G. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 8, n. 2, p. 583-596. Supplement. 1993.

LEONEL, E. C. F.; MANGILLI, P. D.; RAMALHO, L. T. O.; ANDRADE SOBRINHO, J. The importance of the internal porosity of the castor bean polymer in the bone neoformation: study in rats. **Ciência Odontológica Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 19-25, 2003.

LEONEL, E. C. F., PORCIÚNCULA, H. F., ANDRADE SOBRINHO, J., RAMALHO, L. T. O., MANGILLI, P. D., RAPOPORT, A. The action of the castor bean polymer during the bone neoformation. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 4, p. 342-349, 2004.

LEVET, T.; MARTENS, A.; DEVISSCHER, L.; DUCHATEAU, L.; BOGAERT, L.; VLAMINCK, L. Distal limb cast sores in horses: risk factors and early detection using thermography. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 1, p. 18-23, 2009.

LIRANI, A. P. R. **Estudo comparativo dos efeitos do ultrassom e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbia de rato**. 2004. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

LIU, X.; MA, P. X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n. 3, p. 477-486, 2004.

LOPES, M. J.; MARKEL, M. D. Bone biology and fracture healing. In: AUER, J. A.; STICK, J. A. (Eds.). **Equine Surgery**. 4 ed., St Louis: Elsevier Saunders, 2012, cap. 74, p. 1025-1039.

MALIZOS, K. N.; PAPATHEODOROU, L. K. The healing potential of the periosteum molecular aspects. **Injury**, v. 36, n. 3, p. 513-519. Supplement. 2005.

MARIA, P. O.; PADILHA FILHO, J. G.; CASTRO, M. B. Análise macroscópica e histológica do emprego da poliuretana derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*) aplicada na tíbia de cães em fase de crescimento. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 4, p. 332-336, 2003.

MARIA, P. P.; PADILHA FILHO, J. G.; CANOLA, J. C.; CASTRO, M. B. Poliuretana de mamona (*Ricinus communis*) para desvio da crista tibial no cão. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 167-79, 2004.

MARIOLANI, J. L. R.; BELANGERO, W. F.; ARRUDA, A. C. F. Respostas provocadas pelas interações biológicas e mecânicas entre material de implante e tecido receptor. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 2, p. 13, 1993.

McCLURE, S. R.; MILES, K.; VANSICKLE, D.; SOUTH, T. The effect of variable waveform low-intensity pulsed ultrasound in a fourth metacarpal osteotomy gap model in horses. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 36, n. 8, p. 1298-1305, 2010.

MARKS, J. R. S. C.; ODGREN, P. R. Structure and development of the skeleton. In: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. (Eds.). **Principles of Bone Biology**. 2 ed, San Diego: Academic Press, 2002, cap. 1, p. 3-15.

MARTIN, T. J.; GOOI, J. H.; SIMS, N. A. Molecular mechanisms in coupling of bone formation to resorption. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 19, n. 1, p. 73–88, 2009.

MASUDA, T.; YLEHEIKKILÄ, P. K.; FELTON, D. A.; COOPER, L. F. Generalizations regarding the process and phenomenon of osteointegration. Part I. *In vivo* studies. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 13, n. 1, p. 17-29, 1998.

MATEUS, C. P. **Avaliação do composto ósseo de ricinus (C.O.R.) granulado e hidroxiapatita (HAP-91) na osteointegração. Estudos: histológico, morfométrico e densitométrico**. 2013. 84 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

MAZZER, N. **Esterilidade do polímero de poliuretana e do potencial bactericida do polímero de mamona**. São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Física e de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1995. Apostila.

McDUFFEE, L. A.; PACK, L.; LORES, M.; WRIGHT, G. M., ESPARZA-GONZALES, B.; MASAOUD, E. Osteoprogenitor cell therapy in an equine fracture model. **Veterinary Surgery**, v. 41, n. 7, p. 773-783, 2012.

MENEZES, L. M.; FREITAS, M. P. M.; GONÇALVES, T. S. Biocompatibilidade dos materiais em ortodontia: mito ou realidade? **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 14, n. 2, p. 144-157, 2009.

MORALES, A.; BARROS, P. S. M.; BARBIERI-NETO, J.; CHIERICE, G.; CLARO-NETO, S.; MIGLIATI, E. R. Experimental use of a castor bean (*Ricinus communis* L.) oil derived polymer on lamellar, intralamellar and penetrating implants in rabbit's cornea. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 1, p. 31-36, 2005.

MUKHOPADHYAY, M.; SINHA, R.; PAL, M.; BHATTACHARYYA, S.; DAN, A.; ROY, M. M. Role of common biochemical markers for the assessment of fracture union. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 26, n. 3, p. 274-278, 2011.

NACER, R. S.; POPPI, R. R.; CARVALHO, P. T. C.; SILVA, B. A. K.; ODASHIRO, A. N.; SILVA, I. S.; DELBEN, J. R. J.; DELBEN, A. A. S. Castor oil polyurethane containing silica nanoparticles as filling material of bone defect in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 56-62, 2012.

NAKAHAMA, K. Cellular communications in bone homeostasis and repair. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 23, p. 4001-4009, 2010.

NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTAÑO, O.; PLANELL, J. A. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 5, n. 27, p. 1137-1158, 2008.

NÓBREGA, F. S. **Avaliação da interação biológica entre polímero de poliuretano de mamona acrescido de carbonato de cálcio e tecido ósseo de equinos**. 2014. 156 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

OHARA, G. H.; KOJIMA, K. E.; ROSSI, J. C.; TELLES, M.; SOARES, J. V. C.; SALOMÃO, C.; SANDA, M. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretano da mamona implantada intraóssea e intra-articular em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 62-8, 1995.

OLIVEIRA, L. S. A. F.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. B.; ROSA, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, p. 37-44, 2010. Suplemento.

ORSINI, J. A. A fresh look at the process of arriving at a clinical prognosis. Part 4: fractures. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 3, p. 129-138, 2012.

PAGE-McCAW, A.; EWALD A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 3, p. 221-233, 2007.

PAPE, H. C.; MARCUCIO, R.; HUMPHREY, C.; COLNOT, C.; KNOBE, M.; HARVEY, E. J. Trauma-induced inflammation and fracture healing. **Journal Orthopedic Trauma**, v. 24, n. 9, p. 522-525, 2010.

PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials an Introduction**. In: _____. 3. ed. Springer: New York, 2007, cap. 5-8, p. 100-223.

PARRIER, M.; LU, Y.; NEMKE, G.; KOBAYASHI, H.; PETERSON, A.; MARKEL, M. Acceleration of second and fourth metatarsal fracture healing with recombinant human bone morphogenetic protein-2/calcium phosphate cement in horses. **Veterinary Surgery**, v. 37, n. 7, p. 648-655, 2008.

PASCON, E. A.; SOUSA, C. J. A.; LANGELAND, K. Biocompatibilidade de materiais endodônticos. Respostas do tecido ósseo de cobaia à resina poliuretana derivada do óleo de mamona. **Revista ABO Nacional**, v. 8, n. 4, pt. 1, p. 238-50, 2000a.

PASCON, E. A.; SOUSA, C. J. A.; MARTINELLI, F.; LANGELAND, K. Biocompatibilidade de materiais endodônticos. Respostas do tecido ósseo de cobaia à resina poliuretana derivada do óleo de mamona. **Revista ABO Nacional**, v. 8, n. 5, pt. 2, p. 283-95, 2000b.

PEARCE, A.; RICHARDS, R. G.; MILZ, S.; SCHNEIDER, E.; PEARCE, S. G. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. **European Cells and Materials**, v. 13, p. 1-10, 2007.

PEREIRA, P. H. L. **Estudo das propriedades físico-químicas da poliuretana derivada do óleo de mamona com potencial na área médica**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PERRIER, M.; LU, Y.; NEMKE, B.; KOBAYASHI, H.; PETERSON, A.; MARKEL, M. Acceleration of second and fourth metatarsal fracture healing with recombinant human bone morphogenetic protein-2/calcium phosphate cement in horses. **Veterinary Surgery**, v. 37, n. 7, p. 648-655, 2008.

POPAK, M. P.; PADILHA-FILHO, J. G.; CANOLA, J. C.; CASTRO, M. B. Poliuretana de mamona (*Ricinus communis*) para desvio da crista tibial no cão. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 821-827, 2004.

POZZI, A.; RISSELADA, M.; WINTER, M. D. Assessment of fracture healing after minimally invasive plate osteosynthesis or open reduction and internal fixation of coexisting radius and ulna fractures in dogs via ultrasonography and radiography. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 241, n. 6, p. 744-753, 2012.

PRECHEUR, H. V. Bone graft materials. **Dental Clinics of North America**, v. 51, n. 3, p. 729-746, 2007.

PROUBASTA, I.; MUR, J. G.; PLANELL, J. A. Biocompatibilidad, materiales implantables, tipos de implante. In: PROUBASTA, I. (Ed.). **Fundamentos de Biomecânica y Biomateriales**, Madrid : Ediciones Ergon, 1997. p. 271-350.

PURICELLI, E.; BARALDI, C. E.; PONZONI, D.; PESCHKE, R. Estudo histológico do polímero poliuretano da mamona implantado no ângulo mandibular de ratos. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 40, n. 1, p. 37-40, 1999.

PURICELLI, E.; CORSETTI, A.; PONZONI, D.; MARTINS, G. L.; LEITE, M. G.; SANTOS, L. A. Characterization of bone repair in rat femur after treatment with calcium phosphate cement and autogenous bone graft. **Head & Face Medicine**, v. 6, p. 10, 2010.

RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103–25108, 2010.

RAHIMZADEH, R.; VESHKINI, A.; SHARIFI, D.; HESARAKI, S. Value of color Doppler ultrasonography and radiography for the assessment of the cancellous bone scaffold coated with nano-hidroxyapatite in repair of radial bone in rabbit. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 148-154, 2012.

RAJENDRAN, N.; SUNDARESAN, B. Efficacy of ultrasound and Color Power Doppler as a monitoring tool in the healing of endodontic periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 2, p. 181-186, 2006.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. (Eds.). **Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine**. 2 ed. London: Elsevier, 2004, cap. 2, pp. 37-124.

REDAELLI, V.; BERGERO, D.; ZUCCA, E.; FERRUCCI, F.; NANNI, L.; CROSTA, L.; LUZI, F. Use of thermography techniques in equines: principles and applications. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 3, p. 345-350, 2014.

REDEPENNING, J.; SCHLESSINGER, T.; BURNHAM, S.; LIPPIELLO, L.; MIYANO, J. Characterization of electrolytically prepared brushite and hydroxyapatite coatings on orthopedic alloys. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 30, n. 3, p. 287-297, 1996.

REZENDE, C. M. F.; SILVA, M. C.; LARANJEIRA, M. G.; BORGES, A. P. B. An experimental study of polyurethane of castor-oil plant (*Ricinus communis*) as a partial substitute of the common calcaneous tendon in rabbits (*Oryctogalus cuniculus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p. 695-700, 2001.

RIBEIRO M. G. **Avaliação clínica e histológica do implante de poliuretano de mamona (*Ricinus communis*) no espaço alveolar após exodontia do terceiro pré-molar inferior: estudo experimental em equinos**. 2003. 86 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

RING, E. F.; AMMER, K. Infrared thermal imaging in medicine. **Physiological Measurement**, v. 33, n. 3, p. R33-R46, 2012.

RISSELADA, M.; VAN BREE, H.; KRAMER, M.; DUCHATEAU, L.; VERLEYEN, P.; SAUNDERS, J. H. Ultrasonographic assessment of fracture healing after plate osteosynthesis. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 448, n. 4, p. 368-372, 2007.

ROSENBERG, A. E. Bones, joints, and soft-tissue tumors. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. (Eds.). **Pathologic Basis of Disease**. 8. ed. Philadelphia: Saunders, 2010, cap. 26, p. 1205-1256.

ROZEN, N.; LEWINSON, D.; BICK, T.; MERETYK, S.; SOUDRY, M. Role of bone regeneration and turnover modulators in control of fracture. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 17, n. 3, p. 197-213, 2007.

RUBIN, C. T.; LANYON, L. E. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. **The Journal of Bone and Joint Surgery**: Needhan, MA, v. 66, n. 3, p. 271-280, 1984.

SARAN, W. R. **Estudo experimental de implantes derivados da resina poliuretana de mamona (*Ricinus communis*), inseridos no canal medular da tibia de coelhos. Análise da interface osso e implante**. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

SCHEPERS, E.; CLERCQ, M.; DUCHEYNE, P.; KEMPENEERS, R. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. **Journal Oral Rehabilitation**, v. 18, n. 5, p. 439-452, 1991.

SCHINDELER, A.; MCDONALD, M. M.; BOKKO, P.; LITTLE, D. G. Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, n.5, p. 459-466, 2008.

SILVA, A. R. S.; PRADO, R. A. C.; PESPININI, S. L. M.; PIRES, S. A. M.; MAZZA, S. M. L. M. Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital. **Revista Odonto Ciência**, v. 22, n. 55, p. 77-81, 2007.

SOUTHWOOD, L. L.; KAWCAK, C. E.; McILWRAITH, D. D.; FRISBIE, D. D. Evaluation of an equine metacarpal IV fracture defect model. **Veterinary Surgery**, v. 35, n. 6, p. 1-28, 2006. Supplement.

SOUZA, A. M.; BRANDT, C. T.; LIMA, J. A. Biopolímero da mamona na reconstrução de falhas ósseas após ressecção de tumores no esqueleto apendicular. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 47, n. 2, p. 116-123, 2002.

SOUZA, A. M. M.; OKAMOTO, T. Implantes de polímero de mamona em cavidades cirúrgicas experimentais realizadas em tibia: estudo histológico em ratos. In: Jornada Odontológica de Bauru Prof. Dr. José Mandeli – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru. **Anais...**, 1995. p. 137-137.

SOUZA, L. A.; OLIVEIRA, B. J. N. A.; EURIDES, D.; GUIMARÃES, E. C.; SILVA, L. A. F.; ALVES, L. B.; ARRUDA, A. F. D. B.; DIAS, T. A. Perfil sérico da fosfatase alcalina após o reparo de defeitos osteocondrais com células mononucleares da medula óssea e proteína morfogenética óssea em coelhos. **Biotemas**, v. 24, n. 4, p. 103-109, 2011.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of The Royal Society, Interface / The Royal Society**, v. 6, n. 3, p. 311-324, 2009. Supplement.

TAYLOR, A. F.; SAUNDERS, M. M.; SHINGLE, D. L.; CIMBALA, J. M.; ZHOU, Z.; DONAHUE, H. J. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**. v. 292, n. 1, p. 545-552, 2007.

TEIXEIRA, H. M.; RAMALHO, L. T. O. Reação à resina vegetal de mamona durante o processo de reparo em defeitos ósseos induzidos no corpo da mandíbula. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 28, n. 1, p. 49-61, 1999.

TOMFORD, W. W. Bone allografts: past, present and future. **Cell Tissue Bank**, v. 1, n. 2, p. 105-109, 2000.

TUNLEY, B. V.; HENSON, M. D. Reliability and repeatability of thermographic examination and the normal thermographic image of the thoracolumbar region in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 4, p. 306-312, 2004.

THURMÜLLER, P.; TROULIS, M.; O'NEILL, M. J.; KABAN, L. B. Use of ultrasound to assess healing of a mandibular distraction wound. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 60, p. 1038-1044, 2002.

TURRER, C. L.; FERREIRA, F. P. M. Biomateriais em cirurgias craniomaxilofaciais: princípios básicos e aplicações. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 23, n. 3, p. 234-239, 2008.

VACCARO, A. R.; CHIBA, K.; HELLER, J. G.; PATEL, T. C.; THALGOTT, J. S.; TRUUMES, E.; FISCHGRUND, J. S.; CRAIG, M. R.; BERTA, S. C.; WANG, J.C. Bone grafting alternatives in spinal surgery. **Spine Journal**, v. 2, n. 3, p. 206-15, 2002.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 6, p. 415-422, 1999.

VILARINHO, R. H.; HETEM, S.; RAMALHO, L. T. O. Implante de resina de poliuretano vegetal na camara anterior do olho de camundongo: estudo histológico. **Odonto 2000**, v.1, p. 25-29, 1996.

WAN, D. C.; NACAMULI, R. P.; LONGAKER, M. T. Craniofacial bone tissue engineering. **Dental Clinics of North American**, v. 50, n. 2, p. 175-190, 2006.

WASELAU, M.; SAMII, V. F.; WEISBRODE, S. E.; LITSKY, A. S.; BERTONE, A. L. Effects of a magnesium adhesive cement on bone stability and healing following a metatarsal osteotomy in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 4, p. 370-378, 2007.

WATTS, N. B., Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 8, pt. 2, p. 1359-1368, 1999.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-5909, 2009

WILLIAMS, K. R.; BLARNEY, A. W. Tissue response of several polymeric materials implanted in the rat middle ear. **Biomaterials**, v. 8, n. 4, p. 254-258, 1987.

YOU, L., COWIN, S. C., SCHAFFLER, M. B. A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix. **Journal of Biomechanics**, v. 34, n. 11, p. 1375-1386, 2001.

Apêndices

APÊNDICE A

Tabelas de avaliação ultrassonográfica com escores atribuídos pelos Avaliadores 1 e 2 baseado na legenda:

- 0:** Completa passagem das ondas pela falha óssea (sem material ecogênico)
1: Passagem parcial das ondas pela falha óssea, com clara identificação das margens (menos de 50% de material ecogênico)
2: Passagem parcial das ondas pela falha óssea, com margens parcialmente obscuras (mais de 50% de material ecogênico)
3: Não há passagem de ondas pela falha (100% de material ecogênico)

Esta tabela foi baseada no estudo desenvolvido por Thurmüller et al. (2002).

Avaliador 1	
Equino 1	Score (0-3)
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	1
60 dias	1
90 dias	2
120 dias	3
Equino 2	Score (0-3)
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	1
60 dias	2
90 dias	2
120 dias	3
Equino 3	Score (0-3)
7 dias	0
15 dias	1
30 dias	2
60 dias	2
90 dias	2
120 dias	3
Equino 4	Score (0-3)
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	1
60 dias	2
90 dias	2
120 dias	3
Equino 5	Score (0-3)
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	1
60 dias	1
90 dias	3
120 dias	3
Equino 6	Score (0-3)
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	1
60 dias	2
90 dias	3
120 dias	3

Avaliador 2	
Equino 1	Score (0-3)
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	1
60 dias	2
90 dias	2
120 dias	3
Equino 2	Score (0-3)
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	1
60 dias	2
90 dias	2
120 dias	3
Equino 3	Score (0-3)
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	0
60 dias	1
90 dias	2
120 dias	3
Equino 4	Score (0-3)
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	1
60 dias	1
90 dias	2
120 dias	3
Equino 5	Score (0-3)
7 dias	0
15 dias	1
30 dias	1
60 dias	1
90 dias	2
120 dias	3
Equino 6	Score (0-3)
7 dias	0
15 dias	1
30 dias	1
60 dias	1
90 dias	2
120 dias	3

APÊNDICE B

Imagens ultrassonográficas utilizadas para avaliação da regeneração óssea do equino nos períodos de 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias.

Equino 1

Equino 2

Equino 3

Equino 4

Equino 5

Equino 6

APÊNDICE C

Tabelas de avaliação ultrassonográfica *Power Doppler* do membro controle com escores atribuídos pelos Avaliadores 1 e 2 baseado na legenda:

0: ausência de vascularização

+: presença de vascularização

++: presença de intensa vascularização

Esta tabela foi baseada no estudo desenvolvido por Risselada et al. (2007).

Avaliador 1	
Equino 1	Score
7 dias	0
15 dias	+
30 dias	++
60 dias	+
90 dias	+
120 dias	++
Equino 2	Score
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	++
60 dias	+
90 dias	+
120 dias	+
Equino 3	Score
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	+
60 dias	+
90 dias	+
120 dias	0
Equino 4	Score
7 dias	0
15 dias	+
30 dias	+
60 dias	+
90 dias	++
120 dias	+
Equino 5	Score
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	++
60 dias	++
90 dias	++
120 dias	+
Equino 6	Score
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	++
60 dias	++
90 dias	+
120 dias	+

Avaliador 2	
Equino 1	Score
7 dias	0
15 dias	++
30 dias	++
60 dias	+
90 dias	+
120 dias	++
Equino 2	Score
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	++
60 dias	+
90 dias	+
120 dias	++
Equino 3	Score
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	+
60 dias	+
90 dias	+
120 dias	+
Equino 4	Score
7 dias	0
15 dias	++
30 dias	+
60 dias	+
90 dias	++
120 dias	+
Equino 5	Score
7 dias	0
15 dias	+
30 dias	++
60 dias	+
90 dias	++
120 dias	+
Equino 6	Score
7 dias	0
15 dias	0
30 dias	++
60 dias	++
90 dias	+
120 dias	+

APÊNDICE D

Imagens ultrassonográficas *Power Doppler* utilizadas para avaliação da presença de neovascularização na região de osteotomia do membro controle do equino nos períodos de 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias.

Equino 1

Equino 2

Equino 3

Equino 4

Equino 5

Equino 6

APÊNDICE E

Representação gráfica da temperatura média obtida por análise termográfica comparando membro controle e membro polímero para cada animal do estudo durante período de 120 dias.

Equino 1

Equino 2

Equino 3

Equino 4

Equino 5

Equino 6