GEISSIANE DE MORAES MARCONDES

Avaliação da interação biológica entre compósito de quitosana, colágeno e
hidroxiapatita e tecido ósseo ovino

São Paulo

2014

GEISSIANE DE MORAES MARCONDES

**Avaliação da interação biológica entre compósito de quitosana, colágeno e
hidroxiapatita e tecido ósseo ovino**

Dissertação apresentada 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
Mestre 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.3043
FMVZ

Marcondes, Geissiane de Moraes

Avaliação da interação biológica entre compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita e tecido ósseo ovino / Geissiane de Moraes Marcondes. -- 2014.
175 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - 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. Ovino. 2. Biomaterial. 3. Ortopedia. 4. Biocompatibilidade. 5. Osteocondução. 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 compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita e tecido ósseo ovino", protocolado sob o nº 2688/2012, utilizando 6 (seis) ovinos, 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 13/3/2013.

We certify that the Research "Assessment of biological interaction between composite chitosan, collagen and hydroxyapatite and ovine bone tissue", protocol number 2688/2012, under the responsibility Prof. Dr. André Luis do Valle de Zoppa, was approved in the meeting of day 3/13/2013 and 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.

São Paulo, 1º de outubro de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de
Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de
Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MARCONDES, Geissiane de Moraes

Título: Avaliação da interação biológica entre compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita e tecido ósseo ovino

Dissertação apresentada 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha mãe Vilma e pai José (*in memoriam*), aos meus irmãos Rogério e Gislaine, aos meus sobrinhos e ao meu amor e grande companheiro Marcelo, que sempre me apoiaram, me dando motivação para vencer os obstáculos e realizar os meus sonhos. Obrigada por vocês existirem na minha vida, amo vocês!

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois por me acolher e acalmar em tantos momentos difíceis, não deixando que a fé se abalasse, me dando força e discernimento para seguir pelo melhor caminho.

Ao Prof. Dr. André Luís do Valle De Zoppa, meu orientador, por permitir meu ingresso no mestrado, sempre me instruindo nos momentos de dúvidas, problemas e muitas vezes me apoiando nos momentos de ansiedade. Sempre se mostrou disponível e atencioso mesmo antes do ingresso na pós-graduação, e durante todo o período do projeto, me dando exemplo de organização e equilíbrio, que levarei comigo para sempre. Obrigada pela oportunidade.

À Fernanda Silveira Nóbrega e Mariana Baroni Selim, não só integrantes do mesmo grupo de pesquisa, mas também pessoas nas quais me inspiro e com que muito aprendi. Obrigada pelos conselhos, que me ajudaram tanto na parte científica, como na parte psicológica, em vários momentos do projeto.

Aos outros integrantes do grupo de pesquisa, Cínthia Lhamas, Nicole Paretsis, Danielle Baccarelli, Luís Eduardo e Thamires Mizobe, que sem a colaboração de vocês, não seria possível a realização do projeto.

À Prof^a. Dra Luciana Corrêa pela sua importante ajuda desde o início da pesquisa até os últimos momentos, se mostrando sempre acessível e oferecendo ajuda, dando sugestões para adequação do projeto dentro da proposta inicial de estudo da histologia óssea na espécie ovina. Obrigada por colaborar com a pesquisa na etapa do estudo da microscopia óptica de luz, abrindo as portas do Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez por toda sua colaboração e ensinamentos relacionados ao estudo da microscopia eletrônica de varredura, por permitir a realização desta etapa dentro do Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de odontologia, da Universidade de São Paulo.

A Prof^a. Ana Maria de Guzzi Plepis e a Virginia Conceição Amaro Martins do Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, por ceder o biomaterial utilizado nesta pesquisa.

A Prof^a Dra.Silvia Renata Gaido Cortopassi, e seus orientados Bruno e Douglas que realizaram todos os procedimentos anestésicos para que fossem realizadas as cirurgias e colaboraram também para criação o protocolo de analgesia.

Ao Prof. Dr. Stefano Carlo Filippo Hagen e demais funcionários do Serviço de Diagnóstico por Imagem- do HOVET –FMVZ USP, Hugo, Reginaldo e Silvana, por colaborarem na interpretação dos resultados das avaliações ultrassonográficas e radiográficas.

À Marilene Machado Silva, Márcio Poletto Ferreira e Prof. Dr. Rodrigo Romero Corrêa por colaborarem nas avaliações e interpretações das imagens radiográficas e ultrassonográficas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo e do Auxílio à 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 Sra. Elza Maria Rosa Faquim.

Aos professores Carla Bargi Belli, Raquel Yvonne Arantes Baccarin, Wilson Roberto Fernandes, Luis Claudio Lopes Correia da Silva , Rodrigo Romero Corrêa, por permitirem a realização das cirurgias e alojamento dos animais do projeto durante vários meses no Serviço de Clínica Médica de Equinos e Cirurgia de Grandes Animais do HOVET – USP.

Ao Prof. Dr. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva e sua orientada Fernanda de Castro Stievani pela concessão e sugestões quanto à utilização da câmera térmica durante a pesquisa.

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

A toda equipe de residentes 2013 e 2014 do HOVET/USP (de Ruminantes e Equinos) por sempre colaborarem e ajudarem no manejo com os animais do projeto.

A Flavia Rosin e Elisangela Chinen pela colaboração e auxílio no processamento das amostras para avaliações histológicas.

Ao meu professor de violão Anselmo Piraino, que me apresentou o mundo da música, o qual a cada dia vem me apaixonando mais.

Às minhas fiéis amigas Carolina Rocha e Fernanda Mobaid, que além de colegas de profissão, que sempre me ajudaram ao longo da minha vida profissional, são verdadeiras irmãs, com as quais divido meus momentos de tristeza e alegria.

As minhas colegas de apartamento, Marcela Meireles, Cínthia Lhamas e Cynthia Vendruscolo que me ajudaram nesses dois anos, compreendendo meus momentos de ansiedade.

Ao meu namorado Marcelo Thomassian, que esteve sempre ao meu lado, desde o início do projeto, me acalmando, me ajudando muitas vezes nos fins de semana, no manejo com as ovelhas, respeitando e compreendendo meus momentos de ausência, que sempre tinha uma palavra de conforto, carinho e esperança nas horas difíceis, e que a cada dia me apoia para continuar seguindo a profissão que escolhi.

Aos meus futuros sogros Wilma e Armen Thomassian, que sempre me aconselham nos momentos de dúvida e com quais a cada dia aprendo mais.

A minha mãe e meus irmãos que sempre me apoiaram em todas as decisões profissionais e pessoais da minha vida, me protegendo e aconselhando, para que as melhores escolhas possam ser feitas.

Por fim agradeço as protagonistas dessa pesquisa, as seis ovelhas, que involuntariamente contribuíram para o desenvolvimento científico em prol da saúde e bem estar de outros animais, com as quais muito aprendi, tanto profissionalmente quanto pessoalmente e estarão para sempre guardadas na minha memória.

Epígrafe

“Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

MARCONDES, G. M. **Avaliação da interação biológica entre compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita e tecido ósseo ovino. [Assessment of biological interaction between chitosan, collagen, hydroxyapatite composite and ovine bone tissue]**. 2014. 175 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

As lesões em membros de grandes animais, com perda significativa de tecido ósseo é um desafio para os médicos veterinários. Isso por que muitas vezes somente técnicas de osteossíntese não são capazes de garantir resultados plenamente satisfatórios. Devido a isso, muitos pesquisadores vêm se dedicando ao desenvolvimento e estudo da biocompatibilidade de substitutos ósseos, entre eles os biomateriais, com propósito de auxiliar na reparação óssea. Os compósitos com constituintes naturais como quitosana, colágeno e hidroxiapatita são uma opção, por apresentarem estruturas em sua composição semelhantes ao tecido ósseo. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento biológico do ovino frente a implantação de compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita após implante em osso III/IV metacarpianos. Seis ovinos fêmeas da raça Santa Inês foram submetidos à ostectomias unicorticais de sete milímetros de diâmetro na região proximal da superfície dorso-medial do III/IV metacarpianos. Em seguida, de forma randômica, foi implantado o compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita em um membro torácico. No membro contralateral, foi reproduzida a mesma técnica, porém foi mantido como controle, não sendo preenchido com o compósito. Todos os animais foram submetidos à avaliação física, radiográfica, ultrassonográfica, termográfica e perfil hematológico e bioquímico previamente a cirurgia para avaliação dos padrões fisiológicos. No período pós-operatório os animais foram avaliados por meio de exame físico diário, durante os 60 dias de observação, exame radiográfico, exame ultrassonográfico, exame termográfico nos momentos sete, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias de pós-operatório. Com 60 dias de pós-operatório, realizou-se a biópsia óssea com trefina de 3,55 mm de diâmetro na área de interface entre biomaterial-osso (membro com compósito) e osso-osso (membro controle), para realização de avaliações histológicas de material calcificado, através de microscopia de luz e

eletrônica de varredura. Não foram observadas alterações no exame físico dos animais (frequência cardíaca, frequência respiratória ou temperatura retal), ou claudicação ao longo dos 60 dias, que pudessem estar relacionados ao procedimento cirúrgico ou a presença do implante. A avaliação termográfica demonstrou que as alterações de temperatura no membro com compósito e controle seguiram os mesmo padrões, retornando aos padrões fisiológicos ao fim do período de avaliação. As avaliações radiográficas e ultrassonográficas sugerem que o membro controle e com compósito se encontravam em fases semelhantes de preenchimento de falha. Na histomorfometria, através da microscopia de luz, observou-se maior porcentagem de tecido neoformado em membro controle, quando comparado ao membro com compósito. Além disso, foi possível observar tanto por microscopia de luz quanto por microscopia eletrônica de varredura, que o biomaterial apresentou comportamento osteocondutor e não foram observadas reações adversas ao implante, como formação de tecido cicatricial ou reações de corpo estranho. Com os resultados dessa pesquisa, é possível concluir que o compósito de quitosana, colágeno e hidroxipatita quando implantado em tecido ósseo ovino apresenta biocompatibilidade e perfil osteocondutor.

Palavras-chave: Ovino. Biomaterial. Ortopedia. Biocompatibilidade. Osteocondução.

ABSTRACT

MARCONDES, G. M. **Assessment of biological interaction between chitosan, collagen, hydroxyapatite composite and ovine bone tissue.** [Avaliação da interação biológica entre compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita e tecido ósseo ovino]. 2014. 175 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The lesions in limbs of large animals, with significant bone loss is a challenge for veterinarians. That's why frequently only osteosynthesis are not able to fully guarantee satisfactory results. Because of this, many researchers have dedicated the projects to develop and study the biocompatibility of bone substitutes, including biomaterials, in order to assist bone repair. The composites with natural constituents such as chitosan, collagen and hydroxyapatite may be an option, because they have similar structures with bone tissue. This study evaluated the biological behaviour of composite chitosan, collagen and hydroxyapatite following implantation in the ovine III / IV metacarpal bone. Six healthy female sheep Santa Inês were submitted to bilateral unicortical ostectomy (7 mm/ diameter) on the proximal aspect of the medial-dorsal surface of the III / IV metacarpal bone. One front limb was randomly selected for composite chitosan, collagen and hydroxyapatite implantation, while the contralateral limb was left untreated, not being filled. The animals were submitted to daily physical examination during 60-day follow-up period. Radiographic, ultrasonographic and thermographic reassessment were performed on postoperative days seven, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56. On postoperative day 60, the animals were reoperated and 3,55 mm biopsy fragment collected from the biomaterial bone or bone-new bone interface to histological evaluation by light and scanning electron microscopy. No changes in the physical examination (heart rate, respiratory rate or rectal temperature), or lameness over the 60 days, which could be related to the surgery or the presence of the implant were observed. Thermographic evaluation showed that temperature changed on the members with composite and control limb and they followed the same patterns, returning to physiological rate at the end of study. The radiographic and ultrasonographic evaluations have suggested that the control limb and limb with composite were in similar stages of bone healing. On the

morphology by light microscopy, we observed a higher percentage of the new bone formation at the control limb when compared with the composite limb. However it was observed at the light and electron scanning microscopy, which showed osteoconductive biomaterial behavior and no adverse reactions to the implant, as scar tissue or foreign body reactions. With the results of this research, it can be concluded that the composite of chitosan, collagen and hidroxiapatita when implanted in sheep bone tissue presents biocompatibility and osteoconductive characteristics.

Keywords: Sheep. Biomaterial. Orthopedy. Biocompatibility. Osteoconduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Compósito a base de quitosana, colágeno e hidroxiapatita utilizado na pesquisa – São Paulo – 2014	76
Figura 2 -	Instrumental utilizado para confecção de falha óssea em III/IV metacarpianos de ovino – São Paulo – 2014	77
Figura 3 -	Representação esquemática das etapas e procedimentos realizados na pesquisa – São Paulo – 2014	78
Figura 4 -	Sequência da ostectomia em III/IV metacarpianos de ovino – São Paulo.....	81
Figura 5 -	Continuação da sequência da ostectomia em III/IV metacarpianos de ovino – São Paulo	82
Figura 6 -	Sequência dos procedimentos para o preenchimento das falhas ósseas com biomaterial – São Paulo – 2014	83
Figura 7 -	Sequência de imagens de colheita de biópsia no III/IV metacarpianos de ovino – São Paulo – 2014.....	85
Figura 8 -	Fotografia do animal em baia no período pós-operatório de ostectomia em III/IV metacarpianos – São Paulo – 2014.....	87
Figura 9 -	Fotografia do equipamento utilizado para aquisição das imagens radiográficas – São Paulo – 2014.....	88
Figura 10 -	Fotografia do momento da realização do exame radiográfico – São Paulo – 2014.....	89
Figura 11 -	Fotografia apresentando o computador utilizado para visualização das imagens radiográficas – São Paulo – 2014.....	90
Figura 12 -	Fotografia do momento da realização do exame ultrassonográfico para avaliação do processo regenerativo após ostectomia em III/IV metacarpianos de ovino – São Paulo – 2014	91
Figura 13 -	Imagem dos sonogramas dos ossos III/IV metacarpianos de ovinos submetido à ostectomia bilateral – São Paulo – 2014	92
Figura 14 -	Fotografia do momento de realização da avaliação termográfica – São Paulo – 2014.....	93

Figura 15 - Interface do programa de análise de imagens FLIR Quick Report® durante avaliação termográfica dos membros anteriores dos ovinos submetidos à ostectomia de III/IV metacarpianos – São Paulo – 2014	94
Figura 16 - Interface do programa WCIF Image J 1.37 a® da imagem original de corte histológico de membro controle de ovino – São Paulo – 2014	96
Figura 17 - Interface do programa WCIF Image J 1.37 a® da imagem original de corte histológico de membro de ovino com compósito – São Paulo – 2014.....	97
Figura 18 - Interface do programa WCIF Image J 1.37 a® do processo de deconvolução da cor em lâmina histológica de membro controle de ovino, após a escolha do <i>plugin</i> Azan Mallory – São Paulo – 2014	98
Figura 19 - Interface do programa WCIF Image J 1.37 a® do processo de deconvolução da cor em lâmina histológica em membro de ovino com compósito, após escolha do <i>plugin</i> Azan Mallory – São Paulo – 2014.....	98
Figura 20 - Interface do programa WCIF Image J 1.37 a® utilizado para a quantificação da área de tecido neoformado em membro controle de ovino – São Paulo – 2014.....	99
Figura 21 - Interface do programa WCIF Image J 1.37 a® utilizado para a quantificação da área de tecido neoformado em membro de ovino com compósito – São Paulo – 2014	100
Figura 22 - Imagens radiográficas no membro com compósito e no membro controle aos 28 e 56 dias de pós-operatório – São Paulo – 2014	108
Figura 23 - Imagens ultrassonográficas com compósito e no membro controle aos 28 e 56 dias de pós-operatório – São Paulo – 2014	112
Figura 24 - Realização da biópsia óssea no membro com compósito – São Paulo – 2014	120
Figura 25 - Realização da biópsia óssea no membro controle – São Paulo – 2014	120
Figura 26 - Fotomicrografia de microscopia de luz do fragmento ósseo de ovino coletado durante confecção da falha óssea – São Paulo – 2014	122

Figura 27 - Fotomicrografia de microscopia de luz de fragmento ósseo de ovino coletado de biópsia no membro controle – São Paulo – 2014	123
Figura 28 - Fotomicrografia de microscopia de luz de fragmento ósseo de ovino coletado de biópsia do membro com compósito – São Paulo – 2014	124
Figura 29 - Fotomicrografia de microscopia de luz de fragmento ósseo ovino coletado de biópsia do membro com compósito, em maior aumento – São Paulo – 2014	125
Figura 30 - Fragmento ósseo coletado durante a confecção das falhas ósseas – São Paulo – 2014	126
Figura 31 - Fragmentos do compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita antes da implantação em tecido ósseo ovino – São Paulo – 2014	127
Figura 32 - Fragmento ósseo coletado durante a biópsia do membro controle – São Paulo – 2014	128
Figura 33 - Panorâmica do fragmento ósseo coletado durante a biópsia do membro com compósito – São Paulo – 2014	129
Figura 34 – Fragmento ósseo coletado durante a biópsia do membro com compósito – São Paulo – 2014	130
Gráfico 1 - Gráfico da evolução da temperatura média nos membros com compósito e controle de acordo com o período pós operatório – São Paulo – 2014	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tabela apresentando valores da frequência cardíaca (bpm) máxima e mínima dos animais, média, mediana e desvio padrão durante os 60 dias de avaliação – São Paulo – 2014	106
Tabela 2 -	Tabela apresentando valores da frequência respiratória (mpm) máxima e mínima dos animais, média, mediana e desvio padrão durante os 60 dias de avaliação – São Paulo – 2014	107
Tabela 3 -	Tabela apresentando valores da temperatura retal (° C) máxima e mínima dos animais, média, mediana e desvio padrão durante os 60 dias de avaliação – São Paulo – 2014	107
Tabela 4 -	Tabela da avaliação radiográfica realizada pelo avaliador 1 no membro controle – São Paulo – 2014	109
Tabela 5 -	Tabela da avaliação radiográfica realizada pelo avaliador 1 no membro com compósito – São Paulo – 2014.....	109
Tabela 6 -	Tabela da avaliação radiográfica realizada pelo avaliador 2 no membro controle – São Paulo – 2014	109
Tabela 7 -	Tabela da avaliação radiográfica realizada pelo avaliador 2 no membro com compósito – São Paulo – 2014.....	110
Tabela 8 -	Tabela da comparação da avaliação radiográfica entre os avaliadores no membro controle – São Paulo – 2014.....	110
Tabela 9 -	Tabela da comparação da avaliação radiográfica entre os avaliadores no membro com compósito – São Paulo – 2014.....	111
Tabela 10 -	Tabela da avaliação ultrassonográfica realizada pelo avaliador 1 no membro controle – São Paulo – 2014	113
Tabela 11 -	Tabela da avaliação ultrassonográfica realizada pelo avaliador 1 no membro com compósito – São Paulo – 2014.....	113
Tabela 12 -	Tabela da avaliação ultrassonográfica realizada pelo avaliador 2 no membro controle – São Paulo – 2014	114
Tabela 13 -	Tabela da avaliação ultrassonográfica realizada pelo avaliador 2 no membro com compósito – São Paulo – 2014.....	114
Tabela 14 -	Tabela da comparação da avaliação ultrassonográfica entre os avaliadores realizada no membro controle – São Paulo – 2014	115

Tabela 15 - Tabela da comparação da avaliação ultrassonográfica entre os avaliadores realizada no membro com compósito – São Paulo – 2014	116
Tabela 16 - Tabela da comparação ao longo do tempo da avaliação termográfica no membro com compósito – São Paulo – 2014	117
Tabela 17 - Tabela da comparação ao longo do tempo da avaliação termográfica no membro controle – São Paulo – 2014	117
Tabela 18 - Tabela da comparação da avaliação termográfica entre membro com compósito e controle em cada período de tempo – São Paulo – 2014	118
Tabela 19 - Tabela da comparação da fração de osso neoformado entre membro com compósito e controle – São Paulo – 2014	121

LISTA DE ANEXOS

Anexo A -	Protocolo de preparação do compósito utilizado no estudo.....	163
-----------	---	-----

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A -	Ficha de avaliação de escore de imagens radiográficas	170
Apêndice B -	Ficha de avaliação de escore de imagens ultrassonográficas.....	171
Apêndice C -	Protocolo de processamento das amostras destinadas a Microscopia de Luz.....	172
Apêndice D -	Protocolo de processamento das amostras destinadas a Microscopia Eletrônica de Varredura.....	174

LISTA DE ABREVIATURAS

III/IV Mtc	Ossos terceiro/quarto metacarpianos
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
bpm	Batimentos por minuto
cm	Centímetros
°C	Grau Celsius
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
FC	Frequência cardíaca
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
HA	Hidroxiapatita
HOVET/CGA	Hospital Veterinário/ Cirurgia de Grandes Animais
IQSC	Instituto de Química de São Carlos
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitro
mpm	Movimentos por minuto
MOL	Microscopia de luz
mg.kg-1	miligrama por kilo de peso
MR	Movimentos ruminais
Prof.	Professor
Profa.	Professora
s.i.d.	Uma vez ao dia
TPC	Tempo de perfusão capilar
TR	Temperatura retal
US	Ultrassonografia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DE LITERATURA	34
2.1	TECIDO ÓSSEO	34
2.1.1	Definição, composição e organização	34
2.1.2	Osteogênese	38
2.1.3	Modelamento e remodelamento	40
2.1.4	Propriedades do tecido ósseo	41
2.1.5	Regeneração óssea após fratura	43
2.2	BIOMATERIAIS	45
2.2.1	Bioengenharia tecidual e os substitutos ósseos	47
2.2.2	Quitosana	50
2.2.3	Colágeno	51
2.2.4	Hidroxiapatita	52
2.2.5	Compósito com quitosana, colágeno e hidroxiapatita	53
2.3	SUBSTITUTOS ÓSSEOS EM OVINOS	55
2.4	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO ÓSSEA	59
2.4.1	Avaliação radiográfica	59
2.4.2	Avaliação ultrassonográfica	60
2.4.3	Avaliação termográfica	60
2.4.4	Microscopia de luz (MOL) – Análise descritiva e histomorfometria	62
2.4.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	65
3	OBJETIVOS	69
3.1	OBJETIVO GERAL	69
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	69
4	HIPÓTESES	71
5	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	73
6	MATERIAL E MÉTODO	75
6.1	ANIMAIS	75
6.2	BIOMATERIAL E OUTROS MATERIAIS UTILIZADOS NA PESQUISA	75
6.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	77
6.4	PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E CIRÚRGICO	79
6.4.1	Procedimentos pré-operatório e anestésico	79
6.4.2	Procedimento cirúrgico	80
6.4.2.1	Ostectomia	80
6.4.2.2	Biópsia óssea	84
6.4.3	Procedimentos pós-operatórios	86
6.5	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO	87
6.5.1	Avaliação clínica	87

6.5.2	Avaliação radiográfica	88
6.5.3	Avaliação ultrassonográfica	90
6.5.4	Avaliação termográfica	92
6.5.5	Avaliação por microscopia de luz (MOL)	94
6.5.6	Avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	100
6.6	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	101
6.6.1	Dados de imagem	101
6.6.2	Dados histológicos	101
7	RESULTADOS	104
7.1	MANEJO DOS ANIMAIS	104
7.2	PROTOCOLO ANESTÉSICO E ANALGÉSICO	105
7.3	PROTOCOLO CIRÚRGICO	105
7.4	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO	106
7.4.1	Avaliação clínica	106
7.4.2	Avaliação radiográfica	107
7.4.3	Avaliação ultrassonográfica	111
7.4.4	Avaliação termográfica	116
7.4.5	Avaliação histológica	119
7.4.5.1	Avaliação macroscópica	119
7.4.5.2	Avaliação por Microscopia de Luz (MOL)	121
7.4.5.3	Avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	125
8	DISCUSSÃO	132
9	CONCLUSÕES	146
	REFERÊNCIAS	149
	ANEXO	163
	APÊNDICES	169

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As lesões com perda significativa de tecido ósseo têm papel de destaque na rotina clínico-cirúrgica, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, não sendo raro que ortopedistas se deparem com fraturas cominutivas de ossos longos ou não uniões de fraturas (FREITAS et al., 2008). Muitas vezes após o tratamento cirúrgico, os resultados não são satisfatórios e isso ocorre principalmente quando se trata de defeitos irregulares e extensos, nos quais o processo de remodelamento ósseo resulta na formação de um tecido cicatricial com características indesejáveis, quando comparado ao tecido original (REZENDE et al., 1998; FREITAS et al., 2008; VERTENTEN et al., 2010).

Com o objetivo de maximizar a reparação óssea em diversas situações e minimizar possíveis desvantagens e complicações com a utilização de enxertos ósseos autógenos, foi desenvolvida uma grande variedade de substitutos ósseos, dentre eles os biomateriais que devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos receptores (KAWACHI et al., 2000; FREITAS et al., 2008; PÉREZ-SÀNCHEZ et al., 2008; PÉREZ-SÀNCHEZ, 2010).

Biomaterial foi definido recentemente como substância que foi produzida para ser usada, seja isoladamente 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 novos tecidos e depende das características genéticas das células e do material de suporte onde ocorre sua implantação (WILLIAMS, 2009).

Apesar da existência de grande variedade de biomateriais, ainda há poucas informações a respeito de suas características, propriedades e interação entre o implante e o tecido receptor, tanto *in vitro* como *in vivo*, o que dificulta o desenvolvimento de um material adequado (BEDZIN'SKI et al., 2010; VAN LIESHOUT et al., 2011). Algumas características do biomaterial são responsáveis pela melhor interação com o tecido receptor, como plasticidade e resistência (SPIN NETO, 2008).

A produção de biomateriais está crescendo a cada ano e há muitas razões clínicas para o desenvolvimento destes, principalmente quando se trata de tecido

ósseo, onde se necessita obter preenchimento de defeitos ósseos extensos. Por esse motivo torna-se necessário o desenvolvimento de implantes que são submetidos a forças mecânicas extremas, com finalidade ortopédica (LOPES; MARKEL, 2012). Atualmente a engenharia de tecidos busca o desenvolvimento de um material que tenha composição, nano estrutura e resposta biológica semelhante ao tecido ósseo natural. E ainda deve apresentar características semelhantes ao osso: forma, tamanho, topografia, rugosidade, propriedades mecânicas e bioquímicas (KIKUCHI, 2001).

Os biomateriais podem ser metálicos, cerâmicos, polímeros (sintéticos e naturais) além de compósitos (BURG; PORTER; KELLAM, 2000; ITOH, 2002). As cerâmicas de fosfato de cálcio possuem grande semelhança química com a fase mineral do osso, já que este possui íons cálcio e fósforo como principais constituintes, apresentando características interessantes para o metabolismo ósseo. A hidroxiapatita, cerâmica biocompatível, possui potencial osteocondutor e bioatividade, permitindo adesão, proliferação, migração, e ativação de células ósseas, ocorrendo neoformação óssea em aposição direta ao biomaterial (MAEDA, 2013).

Polímeros de origem sintética também estão sendo utilizados na área de engenharia de tecidos. No entanto a grande desvantagem da utilização destes polímeros é desencadear respostas inflamatórias e falhar em promover sinais de reconhecimento celular. Estes problemas podem ser resolvidos pela utilização de polímeros extraídos de fontes naturais como colágeno e hidroxiapatita combinados, na forma de compósitos. Compósitos a base de hidroxiapatita e colágeno estão sendo desenvolvidos com intuito de melhorar as propriedades mecânicas e biológicas, não encontrados em outros biomateriais, pois mostram uma baixa irritabilidade tecidual, permitindo assim evolução reparadora do tecido ósseo (KIKUCHI, 2001; ITOH, 2002).

A quitosana, um polímero também natural, derivado da quitina, é um polissacarídeo encontrado em abundância na natureza e tem demonstrado ser uma alternativa como substituto ósseo, auxiliando na formação de tecido ósseo (SEOL et al., 2004; HUANG, 2005; WAN et al., 2006; JUNG, 2007; COUTINHO, 2008). A combinação de quitosana com hidroxiapatita ou outros derivados de fosfato de cálcio, tem liderado pesquisas nas áreas de ortopedia, odontologia e de substitutos ósseos nas últimas décadas, pois permite a maximização da capacidade

osteogênica *in vivo*, possibilitando o crescimento ósseo interno celular no compósito (THEIN-HAN; MISRA, 2009).

Alguns grupos de pesquisa no Brasil, nos últimos anos, têm se empenhado em estudar as propriedades biomecânicas dos biomateriais e dos ossos de animais domésticos de grande porte como, por exemplo, equinos, mimetizando *situações in vitro* de quando esses animais são submetidos a condições reais como defeitos ósseos, para concluir dessa forma, se quando utilizado um biomaterial como substituto ósseo, qual a interação dele com o tecido e qual sua colaboração para melhora da biomecânica se submetido a forças que se assemelham ao apoio dos equinos (SELIM, 2013; MOREIRA, 2014; NÓBREGA, 2014).

Outra espécie de grande porte, muito utilizada para o estudo da interação entre tecido ósseo e biomateriais, são os ovinos, principalmente em ortopedia humana, pelo peso e comportamento celular semelhante que apresentam (MARTINI et al., 2000; PEARCE et al., 2007; UEBERSAX et al., 2013; VON RECHENBERG et al., 2013).

É importante a avaliação da interação entre o tecido ósseo receptor e implante utilizado. Para isso existem várias técnicas de avaliação do tecido ósseo animal como, por exemplo, o exame radiográfico (RX), que possibilita a visualização da formação do calo ósseo e reabsorção; o exame ultrassonográfico (US) que permite a visualização do calo fibroso que muitas vezes não pode ser visualizado no exame radiográfico e pode ser identificado numa fase mais precoce do processo de consolidação (REZENDE et al., 1998; FREITAS et al., 2008; SILVA et al., 2009; POZZI; RISSELADA; WINTER, 2012).

Outra técnica não invasiva de avaliação da interação biológica entre tecido ósseo e implante, é a termografia. Este método é determinado pelo sensoramento remoto, se baseia na detecção de radiação térmica emitida por todos os corpos de temperatura não nula (HOLST, 2000; PUROHIT, 2008). A termografia vem sendo utilizada rotineiramente em equinos, para o diagnóstico de alterações que causam inflamações (EDDY; VAN HOOOGMOED; SNYDER, 2001; PUROHIT; TURNER; PASCOE, 2003). Teoricamente, este método pode retratar a inflamação de forma gráfica, acompanhando sua regressão e/ou progressão, além de permitir detecção precoce de sua recorrência. Considerando que um dos sinais cardeais do processo inflamatório é o aumento da temperatura no local da lesão, a termografia pode ter

um valor importante na identificação de lesões do sistema musculoesquelético (REDAELLI et al., 2014).

O estudo do tecido ósseo frente à utilização de um biomaterial, através de técnicas de avaliação microscópicas, como a microscopia de luz e a microscopia eletrônica de varredura, é importante para a avaliação objetiva de eventos histológicos e da dinâmica do processo de remodelamento ósseo, fornecendo dados qualitativos e quantitativos (HAJE; THOMAZINI; VOLPON, 2007; VIATEAU et al., 2007; VON RECHENBERG et al., 2013).

O objetivo deste estudo foi estudar a interação biológica entre tecido ósseo de III/IV metacarpianos de ovinos após implantação de compósitos a base de quitosana, colágeno e hidroxiapatita, utilizando para isso, métodos de avaliações clínicas, de imagem e histológicos de material calcificado.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo serão abordados alguns elementos importantes sobre tecido ósseo, biomateriais e métodos de avaliação da interação entre o tecido receptor e implante, referenciando pesquisas atuais e relevantes sobre o assunto.

2.1 TECIDO ÓSSEO

Neste capítulo serão abordados aspectos sobre anatomia, fisiologia e reparação no tecido ósseo.

2.1.1 Definição, composição e organização

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto, servindo de suporte para os tecidos moles e protegendo órgãos vitais, como o cérebro. Aloja e protege a medula óssea, formadora de células do sangue, proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis e constitui sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. Os ossos funcionam também como depósito de cálcio, fósforo e outros íons, armazenando-os ou liberando-os, de maneira controlada, para manter constante a concentração destes importantes íons nos líquidos corpóreos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado formado por células e matriz extracelular calcificada, a matriz óssea. A matriz óssea é dividida em duas porções: a fase mineral e a matriz orgânica. A fase mineral, ou inorgânica é constituída por fosfato de cálcio sob a forma de cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$) associados a outros íons como citrato, sódio, magnésio, flúor e cloreto. A matriz orgânica é constituída por 90% de colágeno (do tipo I-

principalmente, III e V) e 10% de componentes não colágenos (proteínas como osteopontina, sialoproteína óssea, osteonectina, osteocalcina, entre outras), os quais se associam a fibrilas colágenas, oferecendo à matriz as características que fazem com que esta se mineralize e mantenha a fase mineral confinada (ARANA; BRADASCHIA, 2012).

As células que estão presentes no tecido ósseo, dividem-se em dois grupos: osteoblastos e osteoclastos. O primeiro está relacionado com a formação e mineralização da matriz e o segundo com sua absorção. As células indiferenciadas de origem mesenquimal são induzidas a se diferenciarem em osteoblastos, que são células sintetizadoras e secretoras de elementos de matriz óssea orgânica. Alguns osteoblastos permanecem rodeados pela matriz óssea, se alojando em lacunas conectadas por finos canalículos, sendo denominados de osteócitos. Nos períodos de repouso, quando os osteoblastos da superfície óssea param de secretar matriz orgânica, estes se tornam achatados, recobrendo a última camada de matriz orgânica secretada (osteóide), chamadas então, de células de revestimento ósseo (ARANA; KATCHBURIAN, 2004).

Os osteoclastos, células grandes, multinucleadas originadas da fusão de precursores mononucleados advindos da medula óssea, são responsáveis pela reabsorção e remodelação do tecido ósseo, através da acidificação do tecido mineral ósseo causando sua dissolução e degradação de matriz óssea extracelular desmineralizada. Após a dissolução do mineral, o osteoclasto libera uma série de enzimas proteolíticas, como por exemplo, metaloproteinase e catepsina, entre outras, e posteriormente os componentes orgânicos da matriz que foram degradados são fagocitados. As células ósseas interagem entre si, sendo as atividades osteoblásticas e osteoclásticas interdependentes (ARANA, KATCHBURIAN, 2004; BARRÈRE et al., 2006; ARANA; BRADASCHIA, 2012).

A matriz óssea mineralizada é cobertas por duas “membranas”, não calcificadas de natureza conjuntiva; o perióstio e o endóstio, que possibilitam a relação entre tecido mineralizado e o restante do organismo. O perióstio recobre a superfície externa da maioria dos ossos, com exceção da cartilagem articular, sítios de inserção muscular e superfície de ossos sesamóides (ALLEN; HOCK; BURR, 2004). O mesmo é constituído por duas camadas, sendo uma camada superficial fibrosa espessa que contém fibras colágenas, fibroblastos, e poucas fibras elásticas; e outra camada, mais profunda, formada por células indiferenciadas e de

revestimento ósseo. No perióstio ativo, envolvido nos processos de reparação e remodelação, a camada de células indiferenciadas é bastante evidente, contendo diversas células em proliferação que, posteriormente, diferenciam-se em osteoblastos, fibroblastos, micro vasos e nervos simpáticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Essa camada mais profunda fornece células para a regeneração de fraturas e crescimento ósseo aposicional (HOHMANN et al., 1986). O potencial para formação óssea do perióstio é reativado por infecções, traumas e alguns casos de tumores, nos adultos (MALIZOS; PAPATHEODOROU, 2005). O perióstio contém pericitos endoteliais em abundância, devido sua alta vascularização. Os pericitos estão em contato físico com as 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 intramembranosa devido a sua abundância no perióstio (ALLEN; HOCK; BURR, 2004).

Revestindo superfícies internas do osso, isto é, as cavidades de osso esponjoso, canais de Havers e de Volkman do osso compacto e as cavidades medulares, encontra-se o endóstio. O endóstio é uma fina camada de tecido conjuntivo contínua e geralmente única, de osteoblastos e células de revestimento ósseo, com características semelhantes às do perióstio. No entanto, o endóstio apresenta maior atividade que o perióstio, e na maioria das vezes, as suas células de revestimento, estão exercendo função de formação óssea, estando portanto, diferenciadas em osteoblastos. Por várias vezes, essa continuidade da camada é interrompida por osteoclastos envolvidos na função de reabsorção (BANKS, 1991).

O endóstio e o perióstio asseguram não apenas a separação entre osso e as estruturas adjacentes, mas também a manutenção de um ambiente distinto em composição iônica, quando comparado ao restante do líquido extracelular e ao plasma sanguíneo (ARANA; KATCHBURIAN, 2004).

Os ossos são considerados órgãos porque são grupos de tecidos funcionalmente associados, cada osso tem formato e função únicos. Combinações específicas de tipos de tecidos mineralizado, cartilagem, perióstio, medula, vascularização, nervos, ligamentos e tendões desempenham um papel particular no suporte mecânico e metabolismo (ROBERTS; GARETTO, 2000).

Do ponto de vista macroscópico, a estrutura óssea é classificada de acordo com a densidade, como: osso compacto ou cortical, tecido denso que reveste a

superfície externa, e osso trabecular ou esponjoso, que reveste a cavidade medular (GARTNER; HIATT, 2007). Tal classificação é macroscópica e não histológica, pois tanto o tecido compacto, quanto o trabeculado possuem a mesma composição e estrutura histológica básica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O tecido ósseo esponjoso possui trabéculas ósseas ramificadas e espículas projetando-se da superfície interna do tecido ósseo compacto, para a cavidade medular. No tecido ósseo esponjoso há arranjos regulares de lamelas, que contém lacunas abrigando osteócitos, nutridos por difusão das cavidades medulares por entre as trabéculas; estas cavidades estão preenchidas por medula óssea (GARTNER; HIATT, 2007).

A medula óssea existe sob duas formas: a medula óssea vermelha, na qual se formam os elementos figurados do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas), e a medula óssea amarela, constituída principalmente por tecido adiposo unilocular e pouca quantidade de elementos figurados do sangue em formação (GARTNER; HIATT, 2007).

Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: imaturo ou primário; e maduro, secundário ou lamelar. Os dois tipos possuem os mesmos tipos de células e os mesmos constituintes da matriz. Tecido primário é o que aparece primeiro, tanto no desenvolvimento embrionário, quanto na reparação de fraturas, sendo temporário e substituído por tecido secundário (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Tecido imaturo é altamente celular, relativamente pouco mineralizado, que contém um grande número de osteócitos, distribuídos irregularmente no interior de trabéculas ósseas neoformadas. Caracteriza-se por ter alta velocidade de deposição e reabsorção óssea (30 a 50 $\mu\text{m}/\text{dia}$ ou mais) e por ter matriz de colágeno desorganizada sem a estrutura lamelar dos sistemas de Havers (GARTNER; HIATT, 2007; FREITAS, 2001).

O tecido ósseo primário é substituído gradativamente pelo tecido ósseo lamelar pela deposição gradual de estratos ou camadas de matriz. O tecido ósseo lamelar se caracteriza por ter formação lenta (0,6 $\mu\text{m}/\text{dia}$), alta resistência mecânica e fibras colágenas organizadas em lamelas, dispostas paralelamente entre si, em camadas concêntricas em torno de um canal central, denominados canal de Havers. Por esses canais passam vasos sanguíneos, nervos, sendo que cada conjunto desses forma um sistema de Havers. A comunicação entre os canais medulares de

Havers com a cavidade medular e com a porção externa do osso se dá por canais transversais ou oblíquos, os canais de Volkmann (FREITAS, 2001).

Os ossos são comumente divididos segundo sua forma e função em quatro classes: ossos curtos, longos, planos e irregulares. Cada osso longo é constituído de um corpo e duas extremidades. O corpo é conhecido como diáfise e as extremidades como epífises (KÖNIGH; LIEBICH, 2002).

As epífises dos ossos longos são formadas por osso esponjoso recoberto por fina camada de osso compacto. A diáfise é composta predominantemente por osso compacto, com pequena quantidade de osso esponjoso, na sua porção mais profunda, delimitando o canal medular. Os ossos curtos, por sua vez, possuem centro esponjoso, sendo recobertos em toda sua periferia por camada compacta. Os ossos planos apresentam duas camadas de osso compacto, as superfícies interna e externa, separadas por osso esponjoso que, neste caso, recebe o nome de diploe (MARKEL, 1996).

O tecido ósseo é altamente dependente de vascularização. Apesar do perióstio conter grande quantidade de vasos sanguíneos, poucos canais vasculares se originam através dele para o interior do osso compacto. A vascularização de cada osso longo normalmente ocorre através de um canal único pelo qual penetram arteríolas e saem vênulas. Estes vasos principais se ramificam na medula óssea, e a partir das cavidades medulares se origina a maioria dos finos capilares contidos nos canais vasculares. Por outro lado, as fibras nervosas presentes no osso compacto, se originam através do perióstio, alcançando o interior da cavidade medular por meio de ramificações. No entanto elas raramente estão presentes dentro dos canais de Havers (ARANA; BRADASCHIA, 2012).

2.1.2 Osteogênese

O processo pelo qual o tecido ósseo se desenvolve é chamado de osteogênese ou ossificação, e pode ocorrer a partir de uma região condensada de natureza conjuntiva, ou pela substituição de um molde cartilaginoso preexistente. Pelas suas características, esses dois processos foram denominados

respectivamente de ossificação intramembranosa e endocondral (ARANA; KATCHBURIAN, 2004).

A ossificação intramembranosa surge na membrana mesenquimal ricamente vascularizada, onde as células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos, os quais iniciam a síntese de matriz óssea orgânica, formando assim trabéculas de tecido ósseo. Conforme as trabéculas se formam nas vizinhanças, mais interconectadas elas vão se tornando. À medida que se unem, formam tecido ósseo esponjoso, cujas regiões periféricas são remodeladas para originar tecido ósseo compacto. As superfícies destas trabéculas são povoadas de osteoblastos e também podem estar presentes os osteoclastos. Através da interação entre osteoclastos e osteoblastos o tecido ósseo é remodelado. A região da membrana mesenquimal que não participa do processo de ossificação, permanece como componente tecidual mole do osso, isto é, periósteo e endósteo (GARTNER; HIATT, 2007).

A ossificação intramembranosa é um processo característico, porém não exclusivo, de formação do complexo crânio-facial. A partir dele são formados os ossos do crânio, mandíbula, maxila, osso nasal, palatino, esfenóide e clavícula. Contribui também para o crescimento dos ossos curtos e para o aumento da espessura dos ossos longos (ARANA; KATCHBURIAN, 2004).

A ossificação endocondral é responsável pela formação de ossos longos, bem como das vértebras e costelas, baseando-se na presença de um modelo de cartilagem hialina que é utilizado como molde, sobre o qual e no qual o osso é formado. Nesse tipo de ossificação, as células mesenquimais se proliferam, condensam e se diferenciam em condroblastos. Através do processo de condrogênese, é formado um molde de cartilagem hialina com o formato do futuro osso (KÖNIGH; LIEBICH, 2002; GARTNER; HIATT; NARCISO, 2007).

A partir da região mediana do molde cartilaginoso, células mesenquimais adjacentes ao pericôndrio se diferenciam em osteoblastos e passam a secretar matriz orgânica. Essa matriz secretada é mineralizada na sequência, formando um a espécie de cilindro ósseo externamente ao pericôndrio do molde cartilaginoso (KÖNIGH; LIEBICH, 2002).

Com a mineralização da matriz há morte de células, sendo que restam apenas os “alicerces” de matriz cartilaginosa calcificada. Células e vasos indiferenciados penetram na região interna e central do molde cartilaginoso,

enquanto que o osso primário formado ao redor sofre o processo de remodelação. As células que penetram no molde diferenciam-se em osteoblastos e secretam matriz óssea orgânica sobre os “alicerces” de cartilagem calcificada. Forma-se então, dessa maneira, tecido ósseo nos locais onde havia tecido cartilaginoso sem que ocorra a transformação de cartilagem em osso, como às vezes é erroneamente interpretado (ARANA; KATCHBURIAN, 2004).

A ossificação endocondral é responsável pelo crescimento dos ossos longos em comprimento. Nesses ossos, após a progressão do processo de ossificação endocondral, desde a região central, dirigindo-se para as extremidades, são estabelecidas duas regiões localizadas no limite entre a diáfise e as epífises, conhecidas como discos epifisários de cartilagem hialina, que se mantêm ativos até o término do crescimento do indivíduo (ARANA; KATCHBURIAN, 2004; GARTNER; HIATT; NARCISO, 2007).

2.1.3 Modelamento e remodelamento

O crescimento dos ossos consiste na formação de tecido ósseo novo, associado à reabsorção parcial de tecido já formado. Durante esse processo de crescimento e adaptação as mudanças de carga, o formato ou arquitetura do osso, podem sofrer alterações devido à atividade celular. Esta alteração é resultado de processos de reabsorção e formação óssea que ocorrem simultaneamente, mas em regiões diferentes. Este processo é chamado de modelamento e permite mudanças na forma tridimensional do osso (BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO; 2006; PÈREZ-SÀNCHEZ, 2010).

Remodelamento ósseo é outra característica do osso. Nesse processo ocorre a reabsorção de certa quantidade de tecido por osteoclastos, seguida da deposição de osso novo na cavidade formada. Esse processo ocorre constantemente durante a vida, a qualquer momento, e aproximadamente 10% da superfície óssea no esqueleto adulto é submetido a remodelamento ativo, enquanto que os 90% restante estão em quiescência. O ciclo de remodelamento dura aproximadamente seis meses, sendo que a maior parte há a formação de tecido. A cada ano, em média,

10% do esqueleto é renovado por remodelamento (BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO, 2006; BRANDI, 2009; PÉREZ-SÀNCHEZ, 2010).

Portanto, modelamento difere de remodelamento, pois 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).

Diversos fatores regulam a manutenção da massa óssea, que podem ser agrupados em bioquímicos, como por exemplo, fatores de crescimento e hormônios, e mecânicos. Dentre os fatores de crescimento podemos citar: IGF I e II (*Insulin-like growth factor* I e II), TGF β (fator de transformação de crescimento β), BMP (proteína morfogenética óssea), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), FGF (fator de crescimento fibroblástico) e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO, 2006; PÉREZ-SÀNCHEZ, 2010). Sabe-se que os estímulos mecânicos, como por exemplo, imobilização prolongada e situações de diminuições de gravidade provocam redução da massa óssea. O impacto sobre o tecido ósseo, ocasionado, por exemplo, pela prática de exercícios físicos, aumenta a massa óssea (GUSMÃO; BELANGERO, 2009).

2.1.4 Propriedades do tecido ósseo

Durante a sustentação e locomoção, os ossos suportam carga, sofrendo ações de complexos padrões de força, os quais geram deformações em sua estrutura (CARTER; SPRENGLER, 2002). Em resposta à deformação, a formação óssea se ajusta, por meio da atividade metabólica. Os ossos se submetem a processos adaptativos de remodelamento de acordo com as forças as quais é submetido (KÖNIGH; LIEBICH, 2002).

De acordo com Bouxsein (2003), a qualidade óssea pode ser definida como o conjunto de características que influencia a capacidade do osso de resistir a lesões. Ela é determinada pelas propriedades materiais e estruturais, as quais por sua vez, são influenciadas pelo processo de remodelamento ósseo. É importante ressaltar

que a capacidade do osso de resistir à força mecânica não depende somente da quantidade de tecido ósseo, mas sim de sua qualidade (MARTIN; CORREA, 2010).

As propriedades materiais dos ossos estão relacionadas à sua composição mineral e de colágeno, bem como a presença, quantidade, tamanho e localização de micro lesões. É importante lembrar que o tecido ósseo é composto por componentes celulares e matriz (mineral e orgânica-colágena) e isso influencia as propriedades materiais desse tipo de tecido. Em ossos normais, por exemplo, a fase mineral promove rigidez e resistência ao osso, ao passo que a matriz orgânica proporciona elasticidade e capacidade de absorção de energia. Portanto, o grau de mineralização da matriz exerce papel fundamental na qualidade óssea (COMPSTON, 2006).

As propriedades estruturais dos ossos estão relacionadas à geometria (tamanho e forma) e microarquitetura (arranjo trabecular e espessura/porosidade cortical) (FELSENBERG; BOONEN, 2005).

A geometria óssea afeta sua distribuição de massa, que por sua vez, interfere na habilidade do osso em resistir a forças de tensão e torção. Duas medidas, como o diâmetro externo e a espessura da camada cortical desempenham papel muito importante na determinação da resistência óssea (FELSENBERG; BOONEN, 2005; MARTIN; CORREA, 2010). Para a microarquitetura óssea, tem-se dois tipos de distribuição igualmente importantes: osso esponjoso e osso compacto. No osso esponjoso o parâmetro mais relevante é o seu tamanho, forma, conectividade e orientação de suas trabéculas, sendo que no osso compacto, o padrão mais relevante é a sua porosidade (COMPSTON, 2006).

As cargas cíclicas repetitivas recebidas pelos ossos resultam em danos por fadiga, os quais são expressos por micro lesões ou micro fissuras. Porém acredita-se que micro danos sejam gatilhos para o início da remodelação. Mas por outro lado, o acúmulo de micro lesões, pode resultar no aumento da mineralização secundária e supressão da remodelação, tornando os ossos mais susceptíveis as fraturas (MARTIN; CORREA, 2010).

2.1.5 Regeneração óssea após fratura

O tecido ósseo quando acometido por fraturas, possui habilidade única de reparação própria sem formação de cicatriz (LOPEZ; MARKEL, 2012). A regeneração óssea é um conjunto sincronizado de vários eventos biológicos que recebem sinalização extracelular e intracelular, seguindo sequência temporal definida. Durante o processo de regeneração, mecanismos moleculares que regulam o desenvolvimento embrionário do esqueleto são reativados (FERGUSON, 1999). Durante a regeneração de fraturas existe equilíbrio entre processo anabólico (formador de osso) e catabólico (reabsorção óssea) (MARTIN; GOIL; SIMS, 2009).

Os eventos envolvidos no processo de regeneração de fraturas 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, doença concomitante e/ou infecção, estabilidade da fratura, nutrição, fármacos, saúde do paciente e condições genéticas (SCHINDELER et al., 2008).

A consolidação de fraturas pode ser de dois tipos: primária ou direta, por remodelação interna; ou secundária ou indireta, por formação de calo. A consolidação primária ocorre somente quando há estabilidade absoluta da região acometida, e trata-se de um processo de remodelação óssea osteonal. A consolidação secundária ocorre quando há estabilidade relativa, sendo muito semelhante ao processo de osteogênese, podendo estar presentes a ossificação endocondral e intramembranosa. O processo de regeneração das fraturas está dividido em quatro estágios: inflamação, formação de calo fibroso, formação de calo rígido e remodelação (ITO; PERREN, 2009).

A fase inflamatória tem início imediatamente após a ocorrência da lesão e dura até que se inicie a formação do tecido fibroso, cartilagem ou osso (ITO; PERREN, 2009). Normalmente o pico inflamatório ocorre entre 7 a 21 dias após lesão (SCHINDELER et al., 2008). A fratura provoca interrupção vascular, formando hematoma, a partir dos vasos sanguíneos seccionados e exsudação local, além de distorção da arquitetura medular. Em seguida, fatores de degranulação plaquetária, macrófagos, granulócitos e monócitos infiltram-se no hematoma e entre os fragmentos e, combatem os agentes infecciosos, secretam citocinas e fatores de

crescimento que avançam a coagulação para trombo fibrinoso (ITO; PERREN, 2009; PAPE et al., 2010). Também ocorre a ativação de osteoclastos que se encarregam de remover o tecido ósseo desvitalizado da região (ITO; PERREN, 2009).

Imediatamente após a inflamação, inicia-se a formação do calo fibroso, caracterizada pela migração de células osteoprogenitoras a partir do periósteo com sua posterior diferenciação em osteoblastos. Osteoblastos promovem crescimento intramembranoso, secretando matriz óssea orgânica e dessa forma o hematoma vai sendo substituído pelo calo fibroso. A neovascularização da região ocorre também nessa fase, acompanhada da diferenciação de células mesenquimais em fibroblastos ou condrócitos, que também iniciam sua atividade secretora, contribuindo para a composição do calo (SCHINDELER et al., 2008; ITO; PERREN, 2009).

O estágio de formação do calo rígido começa quando as extremidades ósseas forem unidas pelo calo fibroso. A formação do calo rígido representa o período de osteogênese mais ativo, sendo caracterizado por níveis elevados de atividade dos osteoblastos e formação de matriz óssea mineralizada (SCHINDELER et al., 2008).

A medida que ocorre a ossificação intramembranosa, o tecido fibroso do interior do calo sofre ossificação endocondral, e o calo é gradualmente convertido em tecido ósseo primário com características de imaturidade. Inicialmente uma ponte óssea é formada externamente, ou dentro do canal medular, afastada da cortical original. Por ossificação endocondral, o tecido fibroso no traço da fratura é substituído por osso primário que se une a cortical original (ITO; PERREN, 2009). Com o aparecimento dos osteoclastos, o tecido ósseo imaturo é reabsorvido e gradualmente substituído por tecido ósseo maduro ou lamelar (SCHINDELER et al., 2008; ITO; PERREN, 2009).

A remodelação óssea é o estágio final de reparação da fratura. Esse processo envolve a conversão do calo ósseo irregular em tecido ósseo lamelar, sendo muito importante para recuperar a integridade mecânica do osso. Este estágio pode durar de meses a anos, e prossegue até que o osso retorne à sua morfologia original, sendo que o osteoclasto é a principal célula envolvida neste processo (SCHINDELER et al., 2008; ITO; PERREN, 2009). As proteinases degradam os componentes orgânicos, como o colágeno, enquanto que a matriz é desmineralizada pelo ambiente ácido. Apesar de o remodelamento ser impulsionado principalmente

pelos osteoclastos, é essencial que uma atividade anabólica paralela seja mantida pelos osteoblastos e além desses processos de catabolismo/anabolismo, a remodelação é modulada por fatores mecânicos (SCHINDELER et al., 2008).

A inflamação e outros processos que ocorrem na reparação de fraturas, ocorrem também na produção de um defeito ósseo, bem como preparação de um leito receptor para a inserção de um implante, implicando na promoção de um trauma local e consequentemente na promoção do processo inflamatório (PÈREZ-SÀNCHEZ, 2010).

A implantação cirúrgica de dispositivos produzidos com biomateriais, é por si só suficiente para gerar processo inflamatório, já que o trauma da incisão pode necrosar as células. As propriedades químicas e físicas dos biomateriais, assim como topografia e forma do biomaterial na interface com os tecidos influenciam no tipo, na intensidade e na duração da resposta inflamatória (WILLIAMS, 2009).

2.2 BIOMATERIAIS

Os biomateriais são definidos como todo material destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, reforçar, ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo. No entanto, atualmente a utilização de biomateriais abrange áreas como engenharia de tecidos e terapia celular, sendo que o termo biomaterial foi novamente definido como sendo “toda substância projetada para assumir a forma que, por si só ou como parte de um sistema complexo, é utilizada para direcionar através do controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o percurso de qualquer procedimento de diagnóstico ou terapêutico, no ser humano ou na Medicina Veterinária” (SENEL; McCLURE, 2004; PÈREZ-SÀNCHEZ, 2010).

O biomaterial utilizado na área médica e odontológica deve desempenhar a função a qual se destina e deve ser aceito pelo corpo do hospedeiro, isto é ser biofuncional e biocompatível. A biofuncionalidade está relacionada ao desempenho da função desejada através de propriedades específicas do material, como distribuição de tensão, transmissão de carga, guia para regeneração de tecidos,

preenchimento de cavidades, entre outras (DI MARTINO et al., 2005; LINDHE; KARRING; LANG, 2005).

A biocompatibilidade é a capacidade de um material exercer sua função com resposta adequada do hospedeiro em aplicação específica, ou seja, refere-se a capacidade de um material desempenhar sua função de maneira desejada, no que diz respeito a uma terapia médica, sem induzir quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis no destinatário ou beneficiário da terapia. No entanto, biomaterial biocompatível gera resposta tecidual celular ou tecidual mais adequada e benéfica, na situação específica em que foi aplicado, otimizando o desempenho clinicamente relevante desta terapia (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001; DALAPICULA et al., 2006).

Além da biofuncionalidade e da biocompatibilidade de um material, discute-se também se o mesmo apresenta osteointegração. Há algum tempo, o termo osteointegração era definido como o contato direto, detectado por microscopia óptica, entre osso e implante. Porém, os meios de análise da interação osso e implante evoluíram ao longo do tempo, permitindo maiores ampliações e maiores observações de detalhes, levando à revisão da utilização desse conceito, já que muitas vezes não existe contato direto entre biomaterial e osso, apenas contato físico. Dessa forma, o conceito de osteointegração foi baseado na definição histológica, sendo apenas parcialmente observada através de avaliação clínica e radiográfica. Portanto, a afirmação de osteointegração através apenas de avaliação do exame clínico e radiográfico é incorreta (AFONSO, 1998).

Os biomateriais são classificados normalmente de acordo com sua origem, comportamento biológico e mecanismo de ação. Quanto à sua origem, podemos classifica-los como: a) autógenos: obtidos a partir do tecido próprio do indivíduo; b) aloenxertos ou enxertos homólogos: contêm tecidos de outro indivíduo da mesma espécie; c) heterólogos ou xenólogos: compostos por tecidos de outras espécies como, por exemplo, a hidroxiapatita e o colágeno bovino; d) aloplásticos: dispositivos de origem sintética, como por exemplo, metálica, cerâmica ou polimérica, utilizados para implantação em tecido vivo (MORAES et al., 2004; DALAPICULA et al., 2006).

Quanto ao comportamento biológico e fisiológico baseado na resposta do hospedeiro, os biomateriais podem ser classificados como: a) bioinertes: não provocam reações no organismo receptor; b) biotolerados: são moderadamente aceitos pelo tecido receptor, sendo geralmente envolvidos por uma capsula fibrosa;

c) bioativos: estabelecem uma ligação direta com o tecido receptor, promovendo proliferação celular ; d) bioabsorvíveis: são lentamente degradados e gradualmente substituídos pelos tecidos onde são implantados (GUTIERRES et al., 2006).

Com relação ao mecanismo de ação dos biomateriais, considerando-se os substitutos ósseos, podemos classifica-los em osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores e osteopromotores (DALAPICULA et al., 2006).

2.2.1 Bioengenharia tecidual e os substitutos ósseos

O processo de regeneração de defeitos ósseos, ocasionados por traumas, neoplasias ou mesmo de origem congênita, pode muitas vezes não ocorrer de forma completa e total. São frequentes situações clínico-patológicas, nas quais a perda tecidual é excessiva, e a capacidade de regeneração óssea limitada. Como consequência, seu reparo pode resultar na formação de tecido conjuntivo cicatricial eventualmente com comprometimento funcional (MIGUEL et al., 2003).

Quando essa dificuldade de regeneração do tecido ósseo ocorre, esses defeitos são chamados críticos. Segundo Schmitz e Hollinger (1986), defeitos ósseos definidos como críticos são aqueles que apresentam determinadas características morfológicas de extensão e largura que impedem a regeneração óssea durante a vida do animal, a não ser que seja utilizado algum biomaterial com potencial para regeneração óssea. A abordagem empregada pela bioengenharia tecidual tem seu fundamento na possibilidade de restaurar e reconstruir a função de tecidos comprometidos estrutural e funcionalmente (POUND et al., 2007). Ela é uma área de atuação das ciências biomédicas, multidisciplinar e que utiliza de princípios da Engenharia, Química, Física, e Ciências Biomédicas, para o desenvolvimento de substitutos ósseos (SENEL; McCLURE, 2004).

A bioengenharia tecidual óssea tem seu fundamento baseado na necessidade de que os implantes ortopédicos sejam mecânica e biologicamente mais adequados, e na busca de biomateriais que possam ser utilizados na reconstrução de grandes defeitos ósseos. Procura-se materiais que possam servir como biomatriz, cuja finalidade é induzir a formação óssea de tecido circundante ou agir como transportador ou modelo para implantar células ósseas ou outros agentes, como

aquelas confeccionadas para possibilitar liberação de substâncias como fatores de crescimento (DI MARTINO; SITTINGER; RISBUD, 2005).

Dentro do grupo dos biomateriais relacionados com a regeneração óssea, podemos incluir os dispositivos de osteossíntese como fios metálicos, parafusos e placas e os materiais de preenchimento representados pelos enxertos e substitutos ósseos (LEONEL et al., 2004).

Diversos materiais têm sido utilizados como substitutos ósseos, porém poucos apresentam resultados satisfatórios, já que a maioria resulta, em maior ou menor grau, em resposta imunológica do hospedeiro (MORAES et al., 2004).

O enxerto autógeno é considerado padrão ouro para preenchimento de grandes perdas ósseas, porém apresenta algumas desvantagens, pois necessita da criação de uma segunda área cirúrgica, o que limita a disponibilidade, devido ao dano ocasionado às áreas doadoras. Outras desvantagens seriam maior período de convalescença, susceptibilidade à infecções nos sítios doadores e, ainda, reabsorção progressiva e constante (AMARAL, 2006; CARVALHO, 2008; SPIN NETO et al., 2008).

Devidos às desvantagens citadas com relação ao uso de enxertos autógenos, e considerando-se também a antigenicidade dos enxertos homogêneos e heterogêneos, uma grande variedade de materiais para preenchimento, denominados de aloplásticos ou substitutos ósseos sintéticos, foram desenvolvidos (LEONEL et al., 2004).

Os substitutos ósseos são divididos em orgânicos e inorgânicos, sendo que os orgânicos são representados pelos polímeros e os inorgânicos compreendem os metais e ligas metálicas, cerâmica e biovidros (LICHTE et al., 2011). Há um terceiro grupo de substitutos ósseos, os compósitos, que correspondem a uma combinação de diversos tipos de materiais com intuito de potencializar as propriedades físico-químicas e mecânicas (AMARAL, 2006).

Considerando a composição e o mecanismo de ação dos substitutos ósseos, os mesmos podem ser classificados em osteogênicos, osteocondutores, osteoindutores e osteopromotores (DALAPÍCULA et al., 2006).

Os substitutos ósseos osteogênicos promovem crescimento ósseo em função de células viáveis, com capacidade de se diferenciarem e produzirem tecido ósseo. Os osteocondutores servem como arcabouço, sustentando a estrutura por onde crescem os vasos sanguíneos, trazendo então, componentes necessários para a

formação óssea. Os osteoindutores têm capacidade de atrair células mesenquimais, que mais tarde se diferenciarão em osteoblastos e isso ocorre em virtude da presença de proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) entre seus componentes. Por fim, osteopromotores se caracterizam pelo uso de meios físicos que promovem isolamento anatômico do local, permitindo a proliferação e seleção de um grupo de células, osteoblastos principalmente, a partir do leito receptor, e simultaneamente, impedem a ação de fatores concorrentes inibitórios ao processo de regeneração (DALAPICULA et al., 2006).

A possibilidade de recuperação óssea têm despertado interesse de muitos pesquisadores, no mundo todo, com intuito de desenvolver materiais que possam desenvolver características biológicas aceitáveis para serem utilizados como substitutos de tecido ósseo (DA CUNHA, 2012).

No mercado atualmente existe grande variedade de materiais de enxerto, associada à evolução crescente no desenvolvimento e aperfeiçoamento de materiais para esse propósito. Os substitutos ósseos devem possuir algumas características para que sua função biológica seja executada com sucesso e o mesmo tempo deve ser utilizado em íntimo contato com o receptor. Esses materiais devem manter estabilidade mecânica e volume tecidual durante as fases iniciais da regeneração e, posteriormente serem absorvidos e substituídos progressivamente por novo tecido ósseo através da matriz osteóide, a qual sofrerá mineralização posteriormente (DALAPICULA et al., 2006).

Dentre as características desejáveis e importantes de um substituto ósseo, ressalta-se que o mesmo deve ser bioativo ou biocompatível, biodegradado à medida que o processo de regeneração ou reparação ocorre, permeável e poroso, para permitir difusão apropriada. Deve possuir também poros de tamanho adequado para o crescimento do tipo celular a que se destina, além de possuir adequada propriedade mecânica, em relação ao meio no qual será aplicado, e ainda oferecer superfície condutiva para a aderência celular (WILLIAMS; BLAYNEY, 1987; LICHTÉ et al., 2011).

É importante também que o substituto ósseo apresente resistência à infecção, permaneça estável por longo tempo, apresente produtos de degradação atóxicos e fácil eliminação pelo organismo, que não seja alergênico ou carcinogênico e apresente tolerância aos processos de esterilização (LICHTÉ et al., 2011).

2.2.2 Quitosana

A quitosana é um biopolímero hidrofílico, produzido a partir da quitina, um polissacarídeo importante na natureza, perdendo apenas para a celulose, em quantidade produzida anualmente (BORSCHIVER et al., 2008). A quitina, por sua vez, é um polissacarídeo constituído por uma sequência linear de açúcares monoméricos, possuindo assim, estrutura semelhante à das fibras de celulose (AZEVEDO, 2007).

A quitina é facilmente obtida a partir das cascas de crustáceos (caranguejos, camarões, lagostas e siris), podendo também ser encontrada em insetos, moluscos como a lula, e na parede celular de fungos, sendo degradada pela enzima quitinase. Partindo-se da matéria-prima bruta, após a lavagem abundante, banhos ácidos retiram todo o conteúdo mineral de cascas de insetos e banhos básicos promovem sua desproteinização, ocorrendo uma leve desacetilação, gerando dessa forma, a quitosana (SILVA, 2006; AZEVEDO, 2007; SPIN NETO et al., 2008; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009). Materiais obtidos a partir da quitina, com grau de desacetilação superior a 75% e solúveis em ácidos como o ácido acético e fórmico, são considerados quitosana (SPIN NETO et al., 2008).

A versatilidade de poder ser transformada em filmes, membranas, géis, pastas, tabletes, microesferas, pós, flocos ou soluções, permitem inúmeras aplicações comerciais, industriais, ambientais e biomédicas da quitosana. Atualmente a quitosana vem sendo utilizada na indústria de cosméticos, aditivos alimentícios, membranas semipermeáveis e no desenvolvimento de biomateriais para medicina e odontologia (AMARAL, 2006; SILVA, 2006; AZEVEDO, 2007; SPIN NETO et al., 2008; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

O uso da quitosana como biomaterial é baseado em propriedades como: a) biocompatibilidade e atoxicidade; b) biodegradabilidade, hidrólise enzimática por quitosanase e lisozima; c) bioadesividade; d) agente bacteriostático e antimicrobiano; e) hemostático; f) capacidade de formar barreiras; g) arcabouço para proliferação celular; h) capacidade de ser suporte para liberação de fármacos, BMP e células (SENEL; McCLURE, 2004; AMARAL, 2006; SPIN NETO et al., 2008; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

Geralmente a quitosana provoca mínima reação de corpo estranho, com pequena ou nenhuma formação de tecido fibroso ao seu redor, observada por avaliação histológica (AMARAL, 2006; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009). Em vários estudos, foi observada a formação de tecido de granulação típico, associado à angiogênese acelerada pela presença de implantes a base de quitosana. A natureza catiônica da quitosana é responsável por interações eletrostáticas com glicosaminoglicanas, proteoglicanas e outras moléculas de carga negativa presentes na matriz extracelular. Este tipo de interação é de grande interesse, pois um grande número de citocinas e fatores de crescimento estão ligados a essas moléculas, o que facilita a incorporação do implante e sua posterior substituição por tecido ósseo. Além disso, a quitosana também apresenta efeito estimulante sobre macrófagos e é quimiotática para neutrófilos (DI MARTINO; SITTINGER; RISBUD, 2005).

A associação da quitosana com mineral gera compósito com força e flexibilidade de polímero e resistência e dureza de mineral (SPIN NETO et al., 2008).

2.2.3 Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo, podendo ser encontrado em quase todo o organismo animal. As propriedades do tecido conjuntivo diferem devido as diferentes organizações das fibras de colágeno. Sua principal característica é formação de fibras insolúveis com alta força elástica. O colágeno é responsável pela modulação das forças externas e internas exercidas no organismo. Além de apresentar papel estrutural nos tecidos em desenvolvimento, fato altamente favorável na utilização como biomaterial (LEE, 2001; MOREIRA et al., 2004; AMARAL, 2006; AMARAL, 2013).

Como biomaterial, o colágeno possui características importantes: a) baixo índice de irritabilidade e alergenicidade; b) biodegradabilidade; c) biocompatibilidade; d) interação com plaquetas ativando o processo de coagulação do sangue – agente hemostático; e) habilidade em promover crescimento celular ; f) susceptível a modificações químicas (LEE, 2001; ITO, 2002; MOREIRA et al., 2004; AMARAL, 2006).

Em virtude dessas propriedades, o colágeno possui uma posição privilegiada como biomaterial em diversas aplicações: reconstrução de tecidos moles, revestimento de ferimentos de queimaduras e outras lesões e, como suporte para crescimento de nervos periféricos e agente hemostático. Biomateriais de colágeno podem ser usados de diversas formas como, pó, membranas, géis, esponjas, filmes, tubos, entre outros. A grande vantagem da utilização do colágeno, além de sua biocompatibilidade, é a possibilidade da alteração de suas propriedades superficiais por modificações químicas, resultando em matrizes colagênicas carregadas positiva ou negativamente. No entanto, arcabouços de colágeno puro não apresentam boas propriedades mecânicas devido a grande presença de espaços vazios, o que acaba atrapalhando a regeneração tecidual (AMARAL, 2006).

Modificações químicas nas matrizes colagênicas constituem alternativas de elevado potencial para melhorar ou modificar as propriedades do colágeno, sejam elas mecânicas, estruturais ou físico-químicas. Por esses fatores o colágeno vem sendo amplamente utilizado como matriz extracelular natural, ou seja, atuando como sitio de ancoragem e servindo como suporte tridimensional para crescimento de novo tecido (RODRIGUES et al., 2003; AMARAL, 2006; AMARAL, 2013).

2.2.4 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita faz parte de um grupo de minerais chamados de apatitas, sendo caracterizada pela baixa solubilidade em sistemas aquosos e bastante solúveis em ácidos halogenídricos, podendo ser de origem natural ou sintética (AMARAL, 2006; MAEDA, 2013). Classificada como cerâmica biocompatível, a hidroxiapatita é uma forma de fosfato de cálcio, altamente cristalina. O fosfato de cálcio presente na superfície da hidroxiapatita recruta células produtoras de osso, osteoblastos, que se proliferam e diferenciam-se produzindo matriz extracelular composta de fosfato de cálcio e colágenos biológicos (ITO, 2002; HAK, 2007; MAEDA, 2013).

A principal propriedade dessa cerâmica é sua semelhança com a fase mineral óssea. Devido a essa similaridade ela apresenta excelente biocompatibilidade e

osteocondução (REZENDE et al., 1998; HAK, 2007; AMARAL, 2013; MAEDA, 2013). A hidroxiapatita, densa, porosa, particulada e de revestimento tem sido um importante biomaterial de reparo e preenchimento de tecido ósseo, tendo sido reportada com sucesso em alguns casos clínicos (KIM, 2003; MAEDA, 2013).

A hidroxiapatita tem sido utilizada como importante carreador de indutores de crescimento ósseo. Em estudo com ratos utilizando hidroxiapatita (HA) associada ou não a proteína morfogenética óssea (BMP) foram confeccionados defeitos ósseos críticos em calvária. Os defeitos foram avaliados radiograficamente e histologicamente quatro semanas após a cirurgia. Foi observado que a associação de HA/BMP apresentou maior indução óssea, revelando o benefício do uso de carreador cerâmico para a BMP, com efeitos positivos sobre osteogênese em defeitos críticos (NOTODIHARDJO, 2012).

A regeneração óssea utilizando nano-hidroxiapatita em calvaria de ratos com defeito crítico, foi avaliada por microtomografia e histomorfometria após quatro e oito semanas, comparada ao grupo controle sem preenchimento. Foi observado que nos grupos com implante de nano-hidroxiapatita houve rápida regeneração do defeito ósseo, sugerindo futuro promissor para esse biomaterial quando aplicado como substituto ósseo (KWEON, 2011).

2.2.5 Compósito com quitosana, colágeno e hidroxiapatita

No intuito de aumentar as propriedades mecânicas e físico-químicas, pode-se combinar diferentes tipos de materiais, gerando materiais sintéticos híbridos ou compósitos (AFONSO, 1998; WAN et al., 2006). Os compósitos são sintetizados com o objetivo principal de criar um biomaterial que possua propriedades que os componentes isolados não possuem individualmente, e que sejam superiores às que adviriam das simples adição das propriedades de cada um dos componentes (AFONSO, 1998). Os compósitos tendem a possuir as vantagens das cerâmicas e dos polímeros, porém com melhores taxas de reabsorção após implantação e melhor resistência mecânica (WAN et al., 2006).

Alguns compósitos foram criados baseados no sistema de ligação entre matriz polimérica e uma fase mineral com intuito de substituição óssea. Esses compósitos são vantajosos, pois melhoram a capacidade osteogênica dos derivados de cálcio e da característica de ligação da matriz polimérica (SPIN NETO et al., 2008). Por exemplo, a combinação de quitosana com hidroxiapatita tem mostrado maximização da capacidade osteogênica *in vivo*, permitindo o crescimento interno no compósito com reabsorção acelerada da matriz. Portanto a quitosana agregada a derivados de fosfato de cálcio, tem liderado pesquisas principalmente nas áreas de ortopedia, periodontia e substituição óssea em geral (CARRARO et al., 2005; AMARAL, 2006).

Arcabouços para engenharia tecidual óssea necessitam de poros conectados para proliferação celular e transporte de nutrientes. Compósitos com constituições distintas podem apresentar porosidades diferentes. As precipitações de fosfato de cálcio sobre matrizes poliméricas como o colágeno e a quitosana, podem ser semelhantes aos tecidos naturais, o que pode favorecer a biocompatibilidade e crescimento celular interno (ITOH, 2002).

Materiais como hidroxiapatita e fosfato de cálcio foram adicionados às fibras colágenas para melhorar as características mecânicas e diminuir taxa de degradação do colágeno, melhorando dessa forma, sua ação como material para substituição óssea (MOREIRA et al., 2004). O uso de compósitos de colágeno e hidroxiapatita têm sido documentados na área de engenharia de tecidos e na medicina regenerativa, sendo empregados como arcabouços, proporcionando excelentes propriedades biológicas *in vivo* (RODRIGUES, 2003).

Estudo de Amaral (2006), utilizando compósitos em forma de mantas ósseas a base de quitosana, colágeno e hidroxiapatita, em testes de citotoxicidade e biocompatibilidade em ratos, concluiu que o biomaterial apresenta estímulo vasculogênico que favorece crescimento tecidual e osteocondução, devido a estímulos provenientes da hidroxiapatita natural associada aos outros componentes. Foi observado que este compósito não induz inflamação crônica, o que é um bom parâmetro de biocompatibilidade, e também demonstra que este biomaterial apresenta reabsorção facilitada em decorrência da matriz orgânica e da hidroxiapatita em pequenas partículas. Observou-se que este material tende a ser reabsorvido, sem a formação de fibrose importante, sendo que o tecido adjacente

sofre pequenas alterações e que as células teciduais aderem-se diretamente ao material (AMARAL, 2006).

2.3 SUBSTITUTOS ÓSSEOS EM OVINOS

Há muitos anos, ovinos vêm sendo utilizados como modelo experimental para estudos em ortopedia e seu uso com esse fim continua crescendo (MARTINI et al., 2001; NUSS et al., 2006,). Em ortopedia, utiliza-se esta espécie devido às similaridades com humanos, em relação ao tamanho, estrutura óssea, cartilaginosa e regeneração óssea. Apesar de os camundongos serem bem mais baratos, eles apresentam muitas diferenças em relação a morfologia óssea (NUSS et al., 2006). Os ovinos estão sendo utilizadas com sucesso em estudos que avaliam a biocompatibilidade de biomateriais como substitutos ósseos, tanto em ortopedia quanto em odontologia. Em estudos de ortopedia, os cães vêm sendo substituídos pelas ovelhas, pela melhor aceitabilidade dessa espécie por não ser considerado animal de companhia, além de que esse modelo animal facilita as avaliações de diferenças entre indivíduos e dentro do próprio indivíduo, melhorando a acurácia estatística (NUSS et al., 2006; BABIKER, 2013).

É necessário considerar que alguns fatores como dieta, sexo, idade e alterações hormonais podem modificar o metabolismo ósseo em ovinos, mas esses fatores podem ser facilmente controlados, quando se utiliza esse modelo animal em ortopedia (MARTINI et al., 2001; AUER et al., 2007).

Outro fator muito importante, discutido em trabalhos que avaliam a interação entre tecido ósseo e implante é a utilização de defeito crítico, no qual irá se utilizar o biomaterial para regeneração. Um defeito ósseo crítico, é o menor tamanho de uma ferida óssea, num osso em particular e numa espécie animal, que não irá regenerar espontaneamente durante o tempo de vida do animal e deve ser utilizado nos modelos experimentais que avaliam a atividade de um implante no tecido ósseo (VIATEAU et al., 2007; HAHN et al., 2011; REICHERT, 2011). O defeito crítico depende também do sexo, idade, local do esqueleto, presença ou ausência de sistemas de fixação (MARTINI et al., 2001).

Oito ovelhas adultas foram utilizadas num estudo de Liu et al. (2000), que avaliaram o uso de hidroxiapatita, em três formas de apresentação (blocos sintéticos, grânulos sintéticos e grânulos naturais de coral), em comparação ao polimetilmetacrilato para preenchimento de defeitos ósseos em mandíbula e crista ilíaca. Quatro ovelhas foram submetidas a eutanásia com dois meses de implantação e o restante foi submetida a eutanásia com seis meses de implantação para avaliações histológicas de material calcificado e histomorfometria. Foi observada que a hidroxiapatita natural de coral foi a que apresentou maior nível de biodegradação e osteointegração e que com seis meses a quantidade de osso formado foi maior que com dois meses para esse tipo de material quando aplicado em osso esponjoso, com a confecção de um defeito crítico (LIU et al., 2000).

Viateau et al. (2004) utilizaram 18 ovelhas para investigar a regeneração de defeitos ósseos críticos em diáfise de III/IV metatarsianos. As mesmas foram divididas em quatro grupos (1, 2, 3 e 4), com diferentes comprimentos de segmentos retirados do metatarso (6 mm, 13 mm, 25 mm, 25 mm). Todos os membros dos ovinos foram estabilizados com placa de compressão dinâmica e parafusos de 3,5 mm, sendo que as falhas não foram preenchidas nos grupos 1, 2 e 3 e foram preenchidas com enxerto autólogo corticoesponjoso no grupo 4. Todas as ovelhas permaneceram de gesso e foram realizadas avaliações radiográficas a cada 4 semanas, até o momento da eutanásia, 16 semanas após a procedimento cirúrgico. Após a eutanásia foi realizada histologia óssea de material calcificado e observou-se que nos grupos 1, 2 e 3 não houve preenchimento por nenhum tipo de tecido, nem cartilaginoso, nem ósseo, e no grupo 4 observou-se o canal medular praticamente obliterado por osso novo e formação de osso novo abundante. Concluiu-se que esse modelo de defeito ósseo crítico foi interessante, pelo osso metatarsiano ser reto sem nenhuma torção fisiológica, permitindo um bom posicionamento dos implantes, além que com os cuidados pós-operatórios realizados, a morbidade foi baixa, sendo esta técnica adequada para avaliar a capacidade de osteoindução e osteocondução dos biomateriais.

Em outro estudo, Nuss et al. (2006), avaliaram a biocompatibilidade de oito biomateriais em 70 ovelhas, sendo que as falhas eram circulares de 8 mm de diâmetro na região proximal da diáfise e distal de epífise de úmero e fêmur esquerdo e direito, num total de 560 defeitos, avaliados por histologia de material calcificado e histomorfometria em diferentes tempos (após 2, 4, 8, 16 e 24 semanas) da

implantação, sendo que para isso foram submetidas a eutanásia. Foi concluído que as avaliações histológicas de material calcificado foram úteis para averiguar a consolidação óssea e comportamento de materiais biodegradáveis e que períodos de avaliações mais precoces (4-8 semanas) são úteis para análise da biocompatibilidade, presença de reação de corpo estranho, eventos que só ocorrem precocemente. Já o tempo de avaliação de seis meses após o implante, foi útil para a quantificação da reabsorção do biomaterial e de tecido neoformado e consideram ainda que esse modelo foi seguro para ser usado em outros ossos, sendo de baixa morbidade para os animais (NUSS et al., 2006).

Num estudo de Viateau et al. (2007) foi produzido defeito crítico segmental de 25 mm em metatarso de 21 ovelhas, para comparação do comportamento ósseo frente a implantação de materiais. Os membros foram estabilizados com placa de compressão dinâmica de 3,5 mm e as falhas preenchidas com biomateriais foram comparadas. Os grupos foram divididos em 4 sendo que: 1 - falhas preenchidas com arcabouço de coral (hidroxiapatita); 2 - falhas preenchidas com arcabouço de coral (hidroxiapatita) e células tronco mesenquimais; 3 - falhas preenchidas com enxerto ósseo autólogo cortico-esponjoso e 4- controle (sem preenchimento). Foram realizadas avaliações radiográficas durante seis meses, e após esse período todas foram submetidas a eutanásia para avaliações histológicas de material calcificado e microtomografia computadorizada. Concluiu-se que houve maior formação de tecido ósseo no grupo preenchido com enxerto ósseo autólogo, sendo que em segundo lugar estava o grupo preenchido com arcabouço de coral e células tronco mesenquimais, sugerindo que o uso de biomateriais naturais juntamente com a terapia celular pode ser interessante e mais pesquisas nessa área deverão ser realizadas (VIATEAU et al., 2007).

Em estudo de avaliação da biodegradabilidade e formação de osso novo de quatro cimentos ósseos injetáveis em ovelhas, nas quais eram realizadas falhas ósseas circulares de 8 mm em epífise distal e metáfise proximal de úmero/ fêmur direito e esquerdo, Von Rechenberg et al. (2013) observaram que cada biomaterial possuía tempo de biodegradação, que foi observado por avaliação histológica de material calcificado em diferentes momentos (após 2, 4, e 6 meses) da implantação. Foi concluído que as diferentes velocidades na reabsorção e na formação de osso novo dos cimentos estão relacionadas com a vascularização do local. Sendo que, em locais com alta vascularização como a metáfise proximal do úmero, a velocidade

de reabsorção e a quantidade de osso novo formado foi maior (VON RECHENBERG et al., 2013).

Plecko et al. (2012) consideraram o tempo de avaliação de oito semanas após implantação de parafusos metálicos com diferentes coberturas, adequado para realização de estudos de osteointegração e biocompatibilidade, por análises histológicas do osso pélvico de ovelhas (PLECKO et al., 2012).

Em outro estudo, Uebersax et al. (2013), avaliaram a biocompatibilidade e osteocondução de arcabouços de fibra porosa de duas fontes de seda, produzidos em bases diferentes (água e solvente), quando aplicados em falhas circulares de osso esponjoso de tíbia, fêmur e úmero de ovinos. Oito semanas após a implantação, os três ovinos foram submetidos a eutanásia, para realização de análises histológicas de material calcificado e observou-se que todos os implantes mostraram boa biocompatibilidade evidente pela pouca infiltração de células inflamatórias, e ausência de capsula fibrosa. A quantidade de osso novo formado foi muito pequena em todos os arcabouços não sendo possível a realização da histomorfometria. Concluíram que a interconectividade dos poros, quando se analisa a biocompatibilidade de um biomaterial poroso como substituto ósseo é muito importante, pois quanto maior a interconectividade dos poros, maior a formação de osso novo (UEBERSAX et al., 2013).

Ao utilizar animais como ovinos em modelo experimental de consolidação óssea frente a implantação de biomateriais, Auer et al. (2007) observaram que vários cuidados devem ser tomados no período pré e pós operatórios. No período pré-operatório devem ser considerados determinados aspectos como casqueamento, cuidados com vermifugação e prevenção de outras doenças parasitárias, ambientação ao local, e às pessoas que irão manejá-las, para evitar estresse adicional. Outros cuidados devem ser tomados no período pós-operatório, como acompanhamento dos parâmetros vitais e outros cuidados de enfermagem como, por exemplo, medicação analgésica e antibiótica apropriadas para a espécie, além de um alojamento limpo e seguro, quanto a prevenção de acidentes ou refraturas e que não prejudique, ao mesmo tempo, o bem estar animal (AUER et al., 2007).

2.4 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Nos tópicos a seguir serão abordados os métodos de avaliação da regeneração óssea, como exame radiográfico, exame ultrassonográfico, exame termográfico, avaliação por MOL (microscopia de luz) e avaliação por MEV (microscopia eletrônica de varredura).

2.4.1 Avaliação radiográfica

O exame radiográfico é um método muito utilizado na prática clínica para avaliação do processo de consolidação óssea. A avaliação radiográfica de um biomaterial em falhas ósseas em vários intervalos, já foi demonstrada em estudos que possui grande confiabilidade, para acompanhamento da evolução da reparação óssea, quando comparada com resultados *post mortem* (REZENDE et al., 1998; FREITAS et al., 2008).

Observou-se que a análise quantitativa de radiopacidade nas imagens radiográficas tanto digitais como convencionais, servem de critério de padronização e reprodutibilidade para avaliação do processo de reparo ósseo e relações de interface biomaterial/osso, na pesquisa de materiais aloplásticos (substitutos ósseos compatíveis) (DORNBUSCH et al., 2010).

Para avaliação do preenchimento de falhas ósseas com substitutos ósseos ao longo do tempo, pode ser utilizada a classificação por escores de reparação óssea, sendo para isso realizados exames radiográficos seriados e com técnica radiográfica padronizada, em pelo menos duas posições (dorsopalmar e lateromedial), por exemplo, quando se tratar de membros locomotores. As imagens radiográficas devem ser analisadas por dois ou mais avaliadores independentes e “cegos” que classificam as mesmas de acordo com escores pré-estabelecidos (OAKES; LEE; LIEBERMAN, 2001; CARNEIRO et al., 2005; FREITAS et al., 2008; SILVA et al., 2009; DORNBUSCH et al., 2010).

2.4.2 Avaliação ultrassonográfica

O exame ultrassonográfico é um método útil na avaliação da consolidação óssea, pois permite a avaliação do calo fibroso, enquanto que o exame radiográfico não permite tal avaliação. Os casos de consolidação indireta de fraturas podem ser avaliados pela ultrassonografia, e esse tipo de regeneração depende do hematoma e do tecido de granulação do local, que irá gerar um calo fibroso, que na fase seguinte, será submetido a mineralização (RISSELADA et al., 2007). Pode-se dizer então que a ultrassonografia permite avaliação mais precoce do processo de reparação óssea, complementando a avaliação radiográfica (RISSELADA et al., 2005).

Outra aplicação do exame ultrassonográfico no processo de reparação óssea, é quando objetiva-se avaliar tecidos moles adjacentes ao local da fratura, já que essas estruturas são importantes para o desenvolvimento do calo fibroso, e o exame radiográfico é limitado nesse período (RISSELADA et al., 2007).

Tanto em estudos experimentais de fraturas de ossos longos de cães, como em falhas ósseas em mandíbulas de suínos, o exame ultrassonográfico mostrou-se uma ferramenta útil para avaliação do processo de regeneração óssea, que pode ser aplicada facilmente na prática clínica, por não ser um método invasivo (THURMÜLLER et al., 2002; RISSELADA et al., 2005).

No estudo com falhas em mandíbulas de suínos, Thurmüller et al. (2002) utilizaram para a avaliação da reparação óssea, uma escala semiquantitativa de quatro pontos de escores das imagens ultrassonográficas, baseada na presença (com graduação de intensidade) até ausência de passagem de ondas ultrassonográficas pelas falhas. Concluiu-se que esse tipo de exame, é viável por não ser um método invasivo, de rápida execução, na maioria das vezes sem necessidade de sedação, e sem exposição a radiação (THURMÜLLER et al., 2002).

2.4.3 Avaliação termográfica

A termografia é uma técnica não invasiva de diagnóstico por imagem, que envolve o registro de padrões cutâneos térmicos gerados pela emissão de calor da

superfície, sendo que esses padrões são transmitidos na forma de mapa de cores (LOUGHIN; MARINO, 2007). O termógrafo é o equipamento que realiza a leitura de ondas eletromagnéticas de frequências infravermelhas emitidas pela superfície do corpo, sendo o calor a energia que se transporta por esse tipo de onda, podendo ser avaliado por câmeras térmicas (PUROHIT; TURNER; PASCOE, 2003).

O calor superficial da pele está diretamente relacionado com a microcirculação dérmica e o metabolismo tecidual que geralmente é constante, sendo controlados pela porção simpática do sistema nervoso. A alteração na temperatura superficial é causada por mudanças na perfusão local, sendo que o suprimento sanguíneo e a vascularização são as bases da representação termográfica (REDAELLI, 2014).

O aumento de temperatura no local de uma lesão é um dos pontos cardeais do processo inflamatório, devido à isso, a termografia pode ser útil na identificação de processos inflamatórios no sistema musculoesquelético. Diversas técnicas são utilizadas para monitorar lesões ósseas e 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, 2011).

Os primeiros relatos da termografia sendo utilizada na medicina veterinária, datam da década de 60, para avaliar mudança de temperatura nos processos inflamatórios do sistema musculo esquelético de equinos de corrida. Há relatos de que é possível detectar o aumento da temperatura precoce de um tendão inflamado, 1 a 2 semanas antes do início da claudicação (PUROHIT, 2008). Com o passar dos anos, a termografia vem sendo cada vez mais utilizada como método de diagnóstico por imagem coadjuvante utilizado na prática clínica de grandes animais, também em lesões do sistema nervoso periférico e vascular, além de afecções do sistema genito-urinário e mamário, mas principalmente nos equinos, em lesões musculares e ósseas (PUROHIT; TURNER; PASCOE, 2003).

Estudos descrevem a importância da avaliação termográfica em afecções que acometem o osso III metacarpiano de equinos, uma vez que esse segmento ósseo não apresenta recobrimento muscular e esta técnica pode detectar alterações de temperatura antes mesmo da manifestação clínica (EDDY; VAN HOOOGMOED; SNYDER, 2001).

É importante salientar que para avaliação termográfica acurada, é necessário que se entenda as limitações do sistema de imagens infravermelhas, para que

interpretações adequadas sejam feitas. Fatores internos e externos têm efeito significativo na temperatura superficial da pele, como por exemplo, os fatores ambientais como luz do sol, corrente de vento, além de outros fatores como transporte dos animais, exercício, medicação tópica, bandagens, escaras, sedativos e grande cobertura por pelos. Todos esses fatores devem ser controlados para avaliação padronizada e fidedigna (PUROHIT, 2008).

O exame termográfico é uma ferramenta de diagnóstico por imagem útil, utilizada juntamente com outros métodos, para melhorar a eficácia da interpretação de achados do exame físico, acompanhar a evolução e avaliar a resposta à longo-prazo do tratamento (LOUGHIN; MARINO, 2007).

Não há relatos na literatura do uso da termografia como método de diagnóstico por imagem de avaliação de lesões ósseas em ovinos.

2.4.4 Microscopia de luz (MOL) – Análise descritiva e histomorfometria

Os métodos para avaliação da regeneração óssea, como por exemplo, o exame radiográfico, densitometria e ressonância magnética, são considerados métodos não invasivos, já que não requerem a morte ou injúria do animal. Porém a interpretação dos resultados obtidos a partir destes métodos está sujeita a erros, e seu êxito depende não só da qualidade das imagens, mas também da interferência de fatores físicos, tais como a técnica de aquisição e a sobreposição de tecidos (HERNANDES et al., 2012).

As análises histológicas são métodos invasivos e realizados em cortes histológicos, obtidos por meio de biópsia ou *ex-vivo*, possuindo a vantagem de permitir uma análise qualitativa e quantitativa sobre o remodelamento e estrutura óssea, já que envolvem a contagem de células (KULAK; DEMPSTER, 2010; HERNANDES et al., 2012).

O objetivo da microscopia de luz é a observação e análise micro estrutural de materiais sólidos. A imagem resultante é plana e sem profundidade, sendo a ferramenta mais utilizada para caracterização morfológica (NACER et al., 2012). O tecido ósseo frente a lesão responde de maneira que uma sequência lógica

histológica definida pode ser observada. Essa resposta do tecido ósseo consiste também de uma sequência ordenada e bem diferenciada de arranjos morfológicos, caracterizando a regeneração do tecido ósseo lesionado, se apresentando de forma bastante semelhante a sua estrutura inicial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A MOL, portanto, é uma importante ferramenta para avaliar objetivamente eventos histológicos, sendo útil para estudar a dinâmica do tecido ósseo, permitindo a obtenção de resultados nas pesquisas onde se deseja avaliar a interface tecido ósseo/material implantado, durante a neoformação óssea (HOLLINGER; BUCK; SCHMITZ, 1994; MATEUS, 2013).

O acompanhamento da regeneração óssea ao redor de implantes requer técnicas que permitam a avaliação dos tecidos vivos sem a necessidade de descalcificação. A técnica de corte e desgaste tem como objetivo a obtenção de amostras de osso não descalcificadas para a avaliação histológica qualitativa e histomorfométrica. Essa metodologia foi desenvolvida para análise de procedimentos de regeneração óssea de tecido da crista alveolar e a análise da aposição óssea sobre a superfície de diversos biomateriais, como por exemplo, os aloplásticos. Por se tratar de uma técnica que requer considerável quantidade de tempo (algumas semanas dependendo do tamanho da amostra), é mais comumente utilizada em estudos experimentais e no ensino (SANCHEZ et al., 2005).

Com o desenvolvimento dos meios de inclusão rígidos (resinas), de micrótomos e sistemas especiais de corte, tornou-se possível cortar o osso calcificado. O sistema necessita de equipamentos específicos para a realização de diferentes fases do processo. O processamento de osso calcificado é feito seguindo cinco fases fundamentais: fixação, inclusão, corte, desgaste e coloração. Para pequenas amostras, com menos de 5 mm de espessura, a fixação de 24 a 48 horas é suficiente, enquanto que para amostras maiores ou com grande quantidade de tecido ósseo compacto, são necessárias de 48 a 72 horas (SANCHEZ et al., 2005).

O material mais utilizado como meio de inclusão para a MOL são os materiais acrílicos como as resinas de glicolmetacrilato (GMA) e o metilmetacrilato. Antes da inclusão é necessário desidratar a amostra para eliminar completamente a água e gordura. Isto é feito pela incorporação de concentrações crescentes de álcool ou acetona, de acordo com a resina que será utilizada, de modo a permitir sua penetração adequada posteriormente. Para o corte das amostras, há diversos sistemas de microtomia disponíveis, embora nem todos eles sejam capazes de

cortar implantes metálicos. Os corantes são os mesmos utilizados para a impregnação de amostras calcificadas (SANCHEZ et al., 2005).

A histomorfometria óssea é uma avaliação histológica quantitativa de espécime ósseo para obter informações sobre a remodelação e estrutura óssea (LI; HUANG; XU, 2011). A histomorfometria se baseia na mensuração quantitativa da organização e estrutura microscópica, usando-a para fornecer informações sobre resposta celular, lesões teciduais e distúrbios metabólicos do osso, como por exemplo a osteoporose (KULAK; DEMPSTER, 2010). As medidas básicas utilizadas pela histomorfometria traduzem os índices primários das mudanças na estrutura e função do tecido, incluindo volume tecidual, volume ósseo e superfície de mineralização (EGGAN; BRENNAN, PIGNOLO, 2012).

É possível com a histomorfometria a avaliação quantitativa pela contagem de células, obtendo-se mensuração de duas dimensões, (largura, comprimento e perímetro da área). A partir destes valores, obtêm-se os parâmetros tridimensionais (espessura, área de superfície e volume) das estruturas histológicas em diferentes tecidos. Os parâmetros histomorfométricos são resultado da interrelação de uma série de cálculos e medidas feitas no tecido ósseo, permitindo uma definição quantitativa, das características estruturais e funcionais do osso em condições normais, patológicas ou experimentais. A partir dessa técnica é possível diferenciar o osso imaturo recém-formado a partir do osso remodelado maduro (SANCHEZ et al., 2005).

As amostras calcificadas permitem também a quantificação e diferenciação da matriz óssea mineralizada de osteóide. É possível avaliar a integridade de biomateriais e quantificar o crescimento ósseo na interface. Permite também a análise da estrutura de revestimento do implante e a capacidade de reabsorção do material osteocondutor, utilizado para regeneração óssea (SANCHEZ et al., 2005).

Atualmente as avaliações histomorfométricas são realizadas por meio de *softwares* de computador de reconhecimento de imagens específicos. Existem programas comercializados que permitem aumento da automação da análise histomorfométrica, com *software* distribuído gratuitamente pela internet, IMAGE J WCIF[®] desenvolvido pelo *National Institute of Health* (EGAN; BRENNAN; PIGNOLO, 2012).

A histomorfometria do osso neoformado, pode ser realizada, por exemplo, por intermédio da quantificação da área de trabéculas ósseas presentes na região

do defeito ósseo, através de técnica de subtração de imagem utilizando para isso deconvolução da cor. O método foi criado para cortes histológicos por Ruifrok e Johnston (2008) e disponibilizado sob a forma de *plugin* para o software o Image J[®] por Landini (2010). Nesse método há a separação matemática de cores do espectro RGB (*red, green, blue*) com combinações de até três cores diferentes, que possibilita a quantificação da porcentagem de osso neoformado.

2.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Atualmente, as biópsias ósseas são quase que exclusivamente estudadas por microscopia de luz (MOL), a partir de secções finas. A MEV permite visualização da estrutura tridimensional do osso diretamente, produzindo informações que, de outra forma, exigiria a construção meticulosa de cortes seriados (DEMPSTER; LINDSAY, 1985; SELIM, 2013).

O microscópio eletrônico de varredura é um instrumento frequentemente utilizado na avaliação da superfície de implantes cirúrgicos e biomateriais. A análise microscópica da superfície de implantes é necessária para buscar melhores condições de acabamento superficial e osteointegração. Além disso, a análise microscópica da superfície óssea pode revelar indícios de alterações provocadas por um meio físico ou químico sobre a mesma (HAJE; THOMAZINI; VOLPON, 2005).

Uma das características mais importantes da MEV é a grande profundidade de campo alcançada em todas as ampliações, o que permite que áreas abaixo e acima do plano focal apareçam sempre focadas. A profundidade do campo da MEV é 100 a 500 vezes maior do que o microscópio óptico de luz (SAHAR; HONG; KOHN, 2005). A tecnologia da MEV é baseada na emissão de um feixe de elétrons focado, diâmetro próximo de 1 nm, em toda a superfície da amostra para a formação de uma imagem topográfica (SCHWEITZER et al., 2008).

A análise por MEV requer toda a remoção de material orgânico, pois este recobre as superfícies formadoras de osso e de repouso, tornando-as indistinguíveis. As amostras ósseas destinadas à MEV são normalmente fixadas em soluções de formalina neutra tamponada, glutaraldeído em tampão de cacodilato. Os

protocolos de fixação não são tão rigorosos como àqueles para a preservação de células, pois existe pouca deterioração das superfícies mineralizadas (MARKS JR; CIELINSKI; SUNDQUIST, 1996).

Após a fixação, os espécimes são lavados com água destilada e tratados com solução de hipoclorito de sódio industrial (NaOCl) durante 2 a 12 horas, dependendo da densidade do revestimento orgânico. Em seguida as amostras são lavadas copiosamente em água destilada para remover os resíduos de células e matriz biológica, desidratadas numa série gradual de álcool e secas ao ar. Posteriormente são posicionadas em suportes (*stubs*) e revestidos por materiais condutores (em geral, ouro) para serem então observadas no microscópio eletrônico de varredura (MARKS JR.; CIELINSKI; SUNDQUIST, 1996).

Vários estudos têm utilizado a MEV para avaliar a estrutura óssea após a implantação de biomateriais. Em um estudo envolvendo a implantação de um biomaterial a base de hidroxiapatita na tíbia de coelhos, Chang et al. (2000) utilizaram a MEV para a avaliação da resposta do tecido ósseo frente a três diferentes configurações de porosidade do material. Os autores concluíram que o padrão estrutural do osso neoformado estava intimamente relacionado à conformação do implante, mais especificamente no que diz respeito a sua porosidade.

Um outro estudo utilizou a MEV para avaliar a interface entre o osso de ovelhas e biomaterial originado da madrepérola da concha de ostra marinha (a base de carbonato de cálcio). O biomaterial foi implantado na epífise do fêmur das ovelhas, e após três ou 10 meses, as mesmas foram eutanasiadas para avaliação através de MEV. Não foi observada, nos dois períodos, reação de corpo estranho frente ao biomaterial, que também demonstrou possuir durabilidade e propriedades mecânicas que foram desejáveis para a sua aplicação. Concluiu-se também, que o material apresentou biocompatibilidade e estimulou a osteogênese no receptor (ATLAN et al., 1999).

Matsuda et al. (1995) compararam através da MEV, a resposta do tecido ósseo de calvária de ratos com dois implantes distintos: um derivado de osso natural sinterizado e um composto sintético a base de hidroxiapatita. Foram estudados amostras de diversos momentos pós-operatórios (1, 2, 3 e 5 semanas), as quais demonstraram que na presença do osso natural ocorre uma incorporação gradativa do material, o qual ao final do experimento funde-se completamente ao osso

neoformado. No entanto, na presença do substituto sintético a base de hidroxiapatita, apesar de ocorrer a formação de osso novo na superfície do implante, não observou-se a fusão entre os dois. Ocorreu menor invasão dos poros do material por tecido ósseo. Ou seja, este implante demonstrou menor osteocondutividade que o anterior.

Objetivos

3 OBJETIVOS

Neste capítulo serão abordados o objetivo geral e os objetivos específicos.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a interação biológica entre compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita, e o tecido receptor, após ostectomias unicorticais em ossos III/IV metacarpianos de ovinos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliação de ovinos como modelo experimental para estudos em ortopedia veterinária.

Avaliação radiográfica para acompanhamento da regeneração óssea após ostectomia em III/IV metacarpianos de ovinos, sem preenchimento da falha e no membro contralateral onde foi implantado o compósito.

Avaliação ultrassonográfica para acompanhamento do preenchimento ósseo no local da falha em membro com compósito e no membro controle.

Avaliação da inflamação, através de exame termográfico, tanto no membro em que foi utilizado o compósito, para verificar possíveis reações ao biomaterial, como também no membro controle.

Avaliação histológica, através da microscopia de luz e da microscopia eletrônica de varredura da relação entre tecido ósseo neoformado no membro controle e no membro com compósito, com o tecido receptor dos ovinos.

Hipóteses

4 HIPÓTESES

O compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita será biocompatível com a espécie ovina, não causando reação de corpo estranho e auxiliando no processo regenerativo.

Os exames de imagem auxiliarão no acompanhamento do processo regenerativo, tanto nas fases mais precoces como nas fases mais avançadas, no membro com compósito e no membro controle.

Limitações do estudo

5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A adaptação de animais acostumados ao manejo extensivo, ao ambiente intensivo do Hospital Veterinário foi uma importante limitação relacionada ao manejo durante o período do estudo.

Não foi possível a colheita da biópsia em diferentes momentos do processo de regeneração óssea, em virtude da opção de não submeter os animais a eutanásia, frente à morbidade ao qual os mesmos foram submetidos.

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 2688/2012.

6.1 ANIMAIS

Foram utilizadas seis ovinos (fêmeas não prenhes), adultas (média de três anos de idade) híbridas, da raça Santa Inês. Durante período de adaptação de 30 dias e no transcorrer da pesquisa os animais foram mantidos em regime de estabulação, recebendo água e feno de gramíneas *ad libitum*, além de ração peletizada¹ comercial para dieta de manutenção, calculada com base no peso vivo. Logo na chegada ao Hospital Veterinário da FMVZ-USP (Serviço de Cirurgia de Grandes Animais), todos foram identificados por meio de brincos e vacinados contra clostridioses² (primeira dose e reforço após 30 dias). Foram realizados exames laboratoriais (hemograma completo, perfil renal, perfil hepático e coproparasitológico), e os animais foram vermifugados de acordo com peso vivo com moxidectina³ e suplementados com sal mineral⁴.

6.2 BIOMATERIAL E OUTROS MATERIAIS UTILIZADOS NA PESQUISA

Para o preenchimento da falha óssea foi utilizado o compósito a base de quitosana, colágeno e hidroxiapatita (Figura 1) desenvolvido pela Professora Ana

¹ Ovicorte - Guabi – Pará de Minas - Brasil

² Sintoxan Polivalente T - Merial Saúde Animal- Paulínia- Brasil

³ Cydectin Injetável Ovinos - Fort Dodge – Campinas- Brasil

⁴ Guabiphós – Guabi – Pará de Minas - Brasil

Maria de Guzzi Plepis e sua equipe, do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo. O protocolo de produção e caracterização físico-química do compósito utilizado na pesquisa encontra-se no anexo A.

A confecção das falhas ósseas e coleta de material para a biópsia foi possível através da utilização de serra trefina circular de 5 mm de diâmetro interno⁵ e de 3,55 mm de diâmetro interno⁶, respectivamente. As serras trefinas foram acopladas a perfuradora elétrica⁷ modelo TRS, todas ilustradas na figura 2.

Figura 1 - Compósito a base de quitosana, colágeno e hidroxiapatita – São Paulo - 2014

Legenda: Fotografia do biomaterial em formato cilíndrico de 7 mm de diâmetro e 10 mm de comprimento, embalado e esterilizado em óxido de etileno, pronto para uso.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

⁵ Ortop, Betim- Brasil

⁶ INP, São Paulo - Brasil

⁷ Synthes, Zurique, Suíça

Figura 2 – Instrumental utilizado para confecção da falha óssea em III/IV metacarpianos de ovino – São Paulo – 2014

Legenda: Em (A) perfuradora elétrica onde acoplava-se trefina de 5 mm (B) para realização das osteotomias. Em (C) observa-se a trefina de 3,55 mm utilizada para colheita das biópsias.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

6.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram avaliados seis ovinos fêmeas após confecção de osteotomias na face dorso-medial, do terço proximal das diáfises dos ossos III/IV metacarpianos. Foi confeccionada falha circular unicortical, em ambos os membros, com auxílio de serra trefina de 5 mm de diâmetro interno, que criou falha de 7 mm no osso. A falha de um dos membros foi preenchida com compósito a base de quitosana, colágeno e hidroxiapatita e a do membro contralateral foi mantida sem preenchimento, como controle. A determinação de qual membro (direito ou esquerdo) seria mantido com ou sem preenchimento foi determinada randomicamente. Para determinação do local exato da falha em cada membro de cada ovino, exames radiográficos digitais no período trans-operatório foram realizados nas projeções dorsopalmar e látero-medial.

Os animais foram avaliados no período pós-operatório através de exames físicos diários e exame radiográfico, exame ultrassonográfico, termografia no momento pré-cirúrgico e aos sete, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias de pós-operatório. Após 60 dias da confecção das falhas, colheram-se biópsias na região da falha, com a qual se realizou avaliação histológica através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. A biópsia óssea foi realizada utilizando serra trefina circular de 3,55 mm de diâmetro interno, que gera uma falha no osso de 4,55 mm de diâmetro, também transpondo toda a camada cortical-cis na região de interface entre tecido ósseo/compósito, ou tecido ósseo/tecido neoformado. Foram coletados dois fragmentos de biópsia de cada membro, alinhados e localizados no eixo longitudinal das falhas em relação aos membros. A figura 3 contém todos os procedimentos e avaliações realizadas durante a pesquisa.

Figura 3 – Representação esquemática das etapas e procedimentos realizados na pesquisa – São Paulo - 2014

Legenda: Membro torácico de ovino, no qual foi realizada osteotomia de 7 mm em III/IV metacarpiano, tanto em membro controle, como em membro com compósito. Durante o período de 60 dias, realizaram-se avaliações clínicas e de imagem nos dois grupos. No 60º dia, realizou-se a biópsia óssea, e os fragmentos submetidos às avaliações histológicas (MEV e MOL).

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

6.4 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E CIRÚRGICO

A seguir estão descritos os protocolos pré-operatório, anestésico e cirúrgico que foram utilizados nos seis animais deste trabalho.

6.4.1 Procedimentos pré-operatório e anestésico

Os animais foram mantidos em jejum alimentar de 48 horas e hídrico de 12 horas, realizou-se tricotomia do membro desde o terço médio do rádio até o limite distal da articulação metacarpo-falangeana. Realizou-se anestesia geral inalatória seguindo protocolo do Serviço de Anestesiologia do HOVET-USP sendo: medicação pré-anestésica com cloridrato de xilazina⁸ (0,05 mg.kg⁻¹, i.v.), indução anestésica com propofol⁹ (6 mg.kg⁻¹, i.v.) e manutenção da anestesia com isoflurano¹⁰ vaporizado em oxigênio 100%. No período trans-operatório foi instalado cateter epidural na região lombossacra para administração de analgésico opióide, sendo utilizado o sulfato de morfina¹¹ (0,1 mg.kg⁻¹) diluído em 10 ml de solução fisiológica. O cateter foi mantido por 48 horas no período pós-operatório.

Os animais foram monitorados durante todo o procedimento, sendo avaliados os parâmetros: frequência cardíaca e respiratória, pressão arterial invasiva, capnografia (pressão parcial de CO₂), oximetria de pulso (saturação de hemoglobina) e concentração do agente anestésico.

⁸ Rompum – Bayer Saúde Animal – São Paulo- Brasil.

⁹ Propovan – Cristália – Itapira – Brasil.

¹⁰ Isoforine – Cristália – Itapira – Brasil.

¹¹ Dimorf Solução Injetável – Cristália – Itapira – Brasil.

6.4.2 Procedimento cirúrgico

Serão descritos a seguir os procedimentos de ostectomia e biópsia óssea.

6.4.2.1 Ostectomia

Com o animal anestesiado e posicionado em decúbito lateral direito foi realizada a antissepsia de toda a extensão da região dos ossos III/IV metacarpianos (previamente tricotomizados) utilizando digluconato de clorexidina degermante¹² a 2% e digluconato de clorexidina alcoólica a 0,5%¹³. Os cascos foram protegidos com bandagem elástica estéril para evitar contaminação da região cirúrgica.

Após o posicionamento dos campos cirúrgicos iniciou-se o procedimento. Para localização exata da incisão para acesso aos ossos III/IV metacarpianos, palpou-se a articulação carpo metacarpiana, e quatro centímetros distal a essa articulação, introduziu-se uma agulha percutânea no ponto médio dorsal do terço proximal dos metacarpianos. Realizava-se o exame radiográfico para determinar se a agulha estaria no ponto exato onde seria localizada a ostectomia, para que a incisão fosse realizada em formato de semicírculo, externamente à localização da agulha (Figura 4).

¹² RioQuímica, São José do Rio Preto, Brasil.

¹³ RioQuímica, São José do Rio Preto, Brasil.

Figura 4 – Sequência do preparo para ostectomia em III/IV metacarpianos de ovinos – São Paulo - 2014

Legenda: **A-** Animal em decúbito lateral direito, com cascos protegidos com bandagem estéril. **B-** Agulha percutânea no ponto médio dorsal do terço proximal do osso III/IV metacarpianos. **C-** Posicionamento para exame radiográfico no período trans-operatório para determinar local exato da falha óssea a ser confeccionada. **D-** Incisão de pele em semicírculo.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Depois de realizada a incisão de pele em semicírculo de quatro centímetros de diâmetro, distante aproximadamente dois centímetros da articulação carpo metacarpiana, o tendão do músculo extensor digital lateral, tendão lateral do músculo extensor digital comum e tendão medial do musculo extensor digital comum foram afastados lateralmente. O tecido subcutâneo na face dorsomedial do membro foi divulsionado até visualização do periósteo, sendo este também incisado em formato de semicírculo, expondo as diáfises dos ossos III/IV metacarpianos. Com a exposição das superfícies ósseas, realizou-se ostectomia unicortical, sob irrigação

constante (solução a base de 1,0 g de sulfato de amicacina¹⁴ diluído em 1 litro de Solução de NaCl 0,9%¹⁵), com auxílio de serra trefina de cinco milímetros de diâmetro interno, acoplada a perfuradora posicionada perpendicular ao eixo longitudinal dos III/IV metacarpianos. Em ato contínuo retirou-se fragmento ósseo de cinco milímetros de diâmetro e comprimento variável, sendo o limite a completa transposição da cortical-cis de cada animal (Figura 5). Após a confecção de cada falha, realizou-se novo exame radiográfico, para confirmação da exata localização da mesma.

Figura 5 – Sequência da realização ostectomia em III/IV metacarpianos de ovino - São Paulo- 2014

Legenda: **A-** Afastamento lateral dos tendões extensores em bloco. **B-** Perfuração da cortical óssea com trefina de 5 mm de diâmetro interno **C-** Marcação da cortical óssea durante a perfuração. **D-** Aspecto da superfície óssea após completa transposição da cortical-cis, com exposição da cavidade medular.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

¹⁴ Neofarma, Anápolis, Brasil.

¹⁵ Isofarma, Eusébio, Brasil.

Após retirada do fragmento efetuou-se o preenchimento da falha com o compósito. O biomaterial apresentava-se na forma de cilindro medindo sete milímetros de diâmetro e dez milímetros de altura, e para a implantação do mesmo era necessário somente ajustá-lo na falha, para um maior contato com o osso. Findado o procedimento, reposicionaram-se os tendões e aproximou-se o periósteo e tecido subcutâneo em bloco com fio poligrecapone¹⁶ 25 nº 2-0 no padrão contínuo simples. A pele foi suturada com fio mononylon¹⁷ nº 2-0 em padrão contínuo simples (Figura 6), seguida de limpeza da ferida cirúrgica com solução fisiológica e confecção de bandagem compressiva.

Figura 6 – Sequência dos procedimentos para o preenchimento das falhas ósseas com biomaterial – São Paulo - 2014

Legenda: **A-** Fragmento obtido após a perfuração do osso III/IV metacarpiano (seta preta) e cilindro de biomaterial (seta amarela). **B-** Aspecto final após implantação do biomaterial, com compósito preenchendo toda a falha (seta amarela); **C-**Aspecto final após síntese da pele.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

¹⁶ Caprofil- Ethicon- São Paulo, Brasil.

¹⁷ Mononylon – Ethicon- São Paulo, Brasil.

Após procedimento em um dos membros torácicos, foi seguido mesmo protocolo no membro contralateral, sendo este mantido sem preenchimento com biomaterial. Os fragmentos ósseos colhidos durante a confecção das falhas eram seccionados ao meio, armazenados em tubo com fixador a base de paraformaldeído a 20%. Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos, foram encaminhados para processamento para realização das análises histológicas por microscopia de luz e por microscopia eletrônica de varredura, para estudo do padrão morfológico do tecido ósseo dos ovinos e com o intuito de servir como modelo comparativo para as biópsias coletadas posteriormente.

6.4.2.2 Biópsia óssea

As biópsias foram realizadas 60 dias após a ostectomia. Durante realização das biópsias ósseas foi seguida a mesma sequência de procedimentos pré-cirúrgicos, anestésicos e de acesso cirúrgico empregados na realização da ostectomia.

Após a localização da região da ostectomia inicial, procedeu-se a realização da biópsia na região de interface entre tecido ósseo pré-existente/tecido ósseo neoformado no membro controle e tecido ósseo pré-existente/compósito no membro onde houve a implantação deste. A colheita do material foi realizada com auxílio de serra trefina de 3,55 mm de diâmetro interno, acoplada a perfuradora posicionada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso III/IV metacarpianos, sob irrigação contínua (solução de 1,0 g. de sulfato de amicacina diluído em 1 litro de solução de NaCl 0,9%). Foram então retirados dois fragmentos de 3,55 mm de diâmetro e comprimento variável, sendo o limite a transposição completa da cortical-*cis* de cada animal (Figura 7).

Figura 7 – Sequência de imagens de colheita de biópsia óssea no III/IV metacarpiano de ovino – São Paulo - 2014

Legenda: **A**-Aspecto do osso III/IV metacarpianos de ovino após 60 dias da ostectomia. **B**- Colheita de biópsia com trefina de 3,55 mm. **C**- Aspecto final após a colheita dos dois fragmentos de biópsia. **D**- Fragmento ósseo colhido com trefina de biópsia.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

A região de eleição para a obtenção dos fragmentos seguiu o eixo longitudinal das falhas em relação aos membros, sendo retirados dois fragmentos alinhados, um proximal e outro distal, em relação a articulação carpo-metacarpiana. Os fragmentos foram armazenados em solução fixadora de paraformaldeído a 20% para posteriores estudos histológicos por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura.

Após a retirada dos fragmentos, realizou-se exame radiográfico para visualização da região onde foram realizadas biópsias e então se procedeu a sutura de periósteo, subcutâneo e pele, como realizado anteriormente e limpeza da ferida cirúrgica com posterior confecção de bandagem compressiva. Após o procedimento em um membro torácico, foi seguido o mesmo protocolo no membro contralateral.

6.4.3 Procedimentos pós-operatórios

Os animais receberam sulfato de morfina¹⁸ (0,1 mg.kg⁻¹, diluída em 10 ml de solução fisiológica, via cateter epidural¹⁹, s.i.d., por 2 dias), fenilbutazona²⁰ (4 mg.kg⁻¹, i.v, s.i.d., por 3 dias) e terapia antimicrobiana com sulfadoxina com trimetoprima²¹ (30 mg.kg⁻¹, i.m., 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 a retirada dos pontos com 14 dias de pós-operatório. Durante todo o período de 60 dias de avaliações, os animais foram mantidos com bandagem elástica para proteção da região dos ossos metacarpianos (Figura 8). Após as biópsias, os animais receberam o mesmo protocolo pós-operatório já descrito. Porém, após a biópsia, optou-se pelo uso de talas (colocadas na face palmar do membro anterior), e utilizando-se essa imobilização desde a recuperação anestésica até 30 dias de pós-operatório.

¹⁸ Dimorf Solução Injetável- Cristália- Itapira, Brasil.

¹⁹ BD- Curitiba, Brasil.

²⁰ Equipalazone Injetável – Marcolab – Duque de Caxias, Brasil.

²¹ Borgal – Intervet do Brasil – Cotia, Brasil

Figura 8 – Fotografia do animal em baia no período pós operatório de ostectomia em III/IV metacarpianos – São Paulo - 2014

Legenda: Animal com bandagens elásticas para proteção da ferida cirúrgica na região dos III/IV metacarpianos e curativo na região lombo-sacra para proteção do cateter epidural.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014)

6.5 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

Neste item serão descritos os métodos de avaliação realizados durante o projeto de pesquisa.

6.5.1 Avaliação clínica

O exame físico completo foi realizado diariamente onde foi aferido: frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal (TR), coloração das mucosas, tempo de preenchimento capilar (TPC) e movimentação ruminal (MR) Foi

realizada avaliação da ferida cirúrgica, quanto à integridade da sutura, presença de secreção, além dos sinais de reação inflamatória: calor, rubor, dor, edema. Realizou-se também a observação da deambulação após o procedimento cirúrgico, onde se registrou 0 (zero) claudicação ausente e 1 (um) claudicação presente.

6.5.2 Avaliação radiográfica

Os animais foram radiografados para o monitoramento do processo de consolidação da falha óssea, em presença do compósito, para sua posterior comparação com membro controle. O primeiro exame foi realizado no período pré-operatório (D0). As avaliações subsequentes ocorreram em 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º, 49º e 56º dia de pós-operatório. As imagens radiográficas foram obtidas com emissor de raios-X portátil Modelo TR90²², e painel digital modelo Mark IIG²³ (Figura 9).

Figura 9 – Fotografia do equipamento utilizado para aquisição das imagens radiográficas – São Paulo - 2014

Legenda: **A**- Emissor de raios-X . **B**-Painel digital.
Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

²² Min X Ray – Northbrook - EUA

²³ Sound Eklin, Carlsbad- EUA

Foram registradas duas projeções radiográficas dos III/IV metacarpianos de ambos os membros torácicos, dorsopalmar e lateromedial. Durante os exames os animais foram mantidos em posição quadrupedal e contidos com auxílio de cabresto de corda (Figura 10).

Figura 10 – Fotografia do momento da realização do exame radiográfico - São Paulo - 2014

Legenda: **A-** Projeção lateromedial. **B-** Projeção dorso-palmar.

Fonte: (MARCONDES, G.M., 2014).

Para a projeção dorsopalmar posicionou-se o painel digital próximo à face palmar dos ossos III/IV metacarpianos. Com o emissor à 40 cm da face dorsal do membro torácico e o feixe de raios colimado sobre a região de interesse, foram emitidas as ondas de raios-X. A técnica padronizada foi de 74 kV de tensão e 0,6 mAs de tempo de exposição.

Durante a projeção lateromedial, o painel digital foi posicionado próximo à face medial dos ossos III/IV metacarpianos e o aparelho de raios-X direcionado para face lateral do membro torácico, sendo a distância do emissor e a técnica radiográfica as mesmas descritas anteriormente. Simultaneamente com as realizações dos exames, as imagens foram visualizadas e salvas em computador²⁴ (Figura 11).

²⁴ Think Pad - Lenovo- Carolina do Norte- EUA

Figura 11 – Fotografia apresentando o computador utilizado para visualização das imagens radiográficas – São Paulo - 2014

Legenda: Imagem radiográfica do membro anterior, para a observação do processo de consolidação da falha óssea em III/IV metacarpianos de ovino.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

As imagens foram analisadas por dois avaliadores “cegos”, que preencheram ficha de avaliação de escore de preenchimento da falha óssea, baseada na porcentagem de preenchimento ao longo do tempo, para que fosse possível a realização de análise estatística (Apêndice A).

6.5.3 Avaliação ultrassonográfica

Inicialmente realizou-se exame ultrassonográfico da superfície dorsal dos ossos III/IV metacarpianos esquerdo e direito para avaliar a integridade dos mesmos no período pré-operatório (D0), utilizando equipamento modelo MyLab 30VET Gold²⁵. Foi utilizado transdutor multifrequencial linear de 18 MHz e três centímetros de profundidade, sendo que os outros períodos de avaliação foram realizados em sete, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias após as cirurgias. Para a realização dos

²⁵ Esaote – Gênova- Itália

exames os animais foram mantidos sentados, com auxílio de dois colaboradores, para facilitar a contenção e acesso aos membros (Figura 12).

Figura 12 – Fotografia do momento da realização do exame ultrassonográfico para avaliação do processo regenerativo após ostectomia em III/IV metacarpianos de ovino – São Paulo - 2014

Legenda: Ovino posicionado sentado com auxílio de dois colaboradores que permitiu a contenção segura, e adequado acesso aos membros torácicos, possibilitando aquisição da imagem ultrassonográfica.

Fonte: (MARCONDES, G.M, 2014).

Após a realização dos exames ultrassonográficos as imagens foram salvas em computador (Figura 13) e posteriormente analisadas por dois avaliadores “cegos” que completaram uma ficha de avaliação de escore de preenchimento da falha óssea, baseado na passagem de onda através da região da ostectomia, para realização de análises estatísticas (Apêndice B).

Figura 13 – Imagens dos sonogramas dos ossos III/IV metacarpianos de ovino submetido à ostectomia bilateral – São Paulo - 2014

Legenda: **A** – Seta amarela indica a região de ostectomia sem preenchimento (membro controle no D7). **B**- Seta vermelha indica a região de ostectomia preenchida com biomaterial no D7.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

6.5.4 Avaliação termográfica

Foi utilizada a câmera térmica de aquisição de imagens infravermelhas portátil modelo T62101²⁶, com sensibilidade térmica de 0,05° C, paleta *Rainbow High Contrast* e calibração automática. Trinta minutos antes da aquisição das imagens os animais foram mantidos sem os curativos, para regulação com a temperatura ambiente. Foi padronizada a distância de um metro dos membros do animal, para realização do escaneamento e aquisição da imagem.

O exame foi realizado na própria baia na qual o animal se encontrava alojado, sempre no mesmo período do dia, sem a presença de sol, ou correntes de vento, para minimizar possíveis efeitos ambientais (Figura 14).

²⁶ FLIR- Boston- EUA

Figura 14 – Fotografia do momento da realização da avaliação termográfica – São Paulo - 2014

Legenda: **A** – Ovino contido para a aquisição da imagem termográfica. **B** – Fotografia do equipamento de termografia com destaque para a imagem no monitor de membros anteriores de ovinos submetidos a ostectomia de III/IV metacarpianos.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Nenhum animal recebeu sedativo para a contenção, sendo que todos foram contidos fisicamente sempre da mesma forma, utilizando-se cabresto de corda. Os animais foram analisados antes de serem submetidos ao procedimento cirúrgico, para exame controle e posteriormente sete, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 dias após as cirurgias.

Para avaliação dos resultados foram utilizados os valores encontrados durante a aquisição das imagens infravermelhas da região metacarpiana. A imagem da área do terço proximal de cada III/IV metacarpianos foi delimitada e obteve-se a área para mensuração. Esta área foi avaliada pelo programa de imagens²⁷ incluso no sistema da câmera infravermelha, sendo registrada a temperatura média da região (Figura 15).

²⁷ FLIR Quick Report®, Boston, EUA.

Figura 15 – Interface do programa de análise de imagens FLIR QuickReport[®] durante avaliação termográfica dos membros anteriores dos ovinos submetidos a osteotomia de III/IV metacarpianos - São Paulo - 2014

Legenda: **A** – membro controle . **B** – membro com compósito. Retângulo verde preenchido em vermelho com as temperaturas médias de cada membro.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

6.5.5 Avaliação por microscopia de luz (MOL)

A avaliação através da MOL foi realizada sob orientação da Profa. Dra. Luciana Corrêa, no Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Campus São Paulo.

Para análise descritiva e morfométrica em microscopia de luz, preparou-se lâminas e realizou-se a técnica de coloração de *Stevenel's Blue*. As amostras foram mantidas calcificadas e processadas seguindo o protocolo de fixação, desidratação, diafanização e inclusão em resina de metilmetacrilato, microtomia, desgaste, montagem das lâminas e coloração (Apêndice C). O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Biologia dos Tecidos Mineralizados do Departamento de Anatomia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Campus São Paulo.

Foi realizada histomorfometria da região de tecido neoformado, tanto nas lâminas dos membros com compósito, quanto nas lâminas dos membros controle, através da quantificação da área de trabéculas ósseas presentes na região do defeito ósseo.

Para tanto, foi utilizada a técnica de subtração de imagem RGB (red, green, blue) utilizando o método de deconvolução da imagem. A técnica de subtração de imagem foi escolhida, pois o padrão de formação óssea nos membros com compósito apresentava-se fragmentado, na qual a delimitação entre tecido ósseo neoformado e tecido ósseo pré existente era irregular, além da presença de resquícios de biomaterial sobrepostos com tecido ósseo neoformado. Dessa forma optou-se por padronizar para a mensuração, tanto no membro controle, como no membro com compósito, somente o tecido ósseo neoformado.

Campos histológicos no aumento de 100x foram digitalizados utilizando microscópio óptico de luz²⁸ e sistema de digitalização composto por câmera²⁹ e *software* de aquisição e morfometria³⁰. A intensidade de luz foi padronizada em todas as digitalizações. As imagens digitalizadas foram mantidas com formato RGB, resolução de 2048 x 1536 pixels e extensão jpg (Figuras 16 e 17). Em seguida, foram submetidas ao processo de deconvolução da cor utilizando *plugin* (*Colour deconvolution*) em outro *software*³¹. O método foi criado para cortes histológicos por Ruifrok e Johnston (2008) e disponibilizado sob a forma de *plugin* para o ImageJ por Landini (2010). Consiste na separação matemática de cores do espectro RGB (*red*, *green*, *blue*) em imagens com combinações de até 3 cores diferentes (Figuras 18 e 19). As lâminas digitalizadas estavam coradas pela técnica de *Stevenel's Blue*, na qual a matriz óssea adquire coloração azulada. Foi utilizado então o *plugin* Azan Mallory, o qual permitia a separação dos tons de azul dos demais tons presentes. Em seguida a área desse tom de azul foi quantificada pela seleção da cor (Figuras 20 e 21), obtendo-se o dado em porcentagem.

Para cada defeito, foram quantificadas de 4 a 6 lâminas. Ao final foi obtida uma média. Tal mensuração possibilitou avaliar quantitativamente a resposta do tecido ósseo ovino frente a implantação do compósito. Os valores obtidos foram registrados em tabela e submetidos a cálculo com o auxílio do *software* Microsoft

²⁸ Leica, modelo DM2500, Alemanha

²⁹ Leica, modelo DFC 295, Alemanha

³⁰ Leica, Modelo LAS®, Alemanha

³¹ WCIF ImageJ 1.37 a®, National Institute of Health, EUA

Office Excel 2010®. As lâminas coradas com *Stevenel's Blue* foram analisadas e descritas qualitativamente por profissional patologista.

Figura 16 – Interface do programa WCIF Image J 1.37 a® da imagem original de corte histológico de membro controle de ovino – São Paulo - 2014

Legenda: Observa-se a imagem do campo original, aumento de 100 x, da lâmina corada com *Stevenel's Blue*, a ser utilizado para realizar a mensuração da porcentagem de osso neoformado em membro controle.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Figura 17 – Interface do programa WCIF Image J 1.37 a[®] da imagem original de corte histológico de membro de ovino com compósito – São Paulo - 2014

Legenda: Observa-se a imagem do campo original, aumento de 100 x, da lâmina corada com *Stevenel's Blue*, a ser utilizado para realizar a mensuração da porcentagem de osso neoformado em membro de ovino com compósito.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014)

Figura 18 - Interface do programa WCIF Image J 1.37 a[®] do processo de deconvolução da cor em lâmina histológica de membro controle de ovino, após a escolha do *plugin* Azan Mallory – São Paulo- 2014

Legenda: Observa-se o corte histológico de membro controle de ovino, após a escolha do *plugin* Azzan Mallory, que gera imagens com espectro RGB de cores (*red, green, blue*) para a separação dos tons de azul.

Fonte: (MARCONDES, G. M, 2014).

Figura 19 - Interface do programa WCIF Image J 1.37 a[®] do processo de deconvolução da cor em lâmina histológica de membro de ovino com compósito, após a escolha do *plugin* Azan Mallory – São Paulo - 2014

Legenda: Observa-se o corte histológico de ovino com compósito, após a escolha do *plugin* Azzan Mallory, que gera imagens com espectro RGB de cores (*red, green, blue*) para a separação dos tons de azul.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Figura 20 – Interface do programa WCIF Image J 1.37 a[®] utilizado para quantificação da área de tecido neoformado em membro controle de ovino – São Paulo - 2014

Legenda: Em **A** vê-se a escala de cor escolhida para o processo de quantificação de tecido ósseo neoformado, em membro controle de ovino. Em **B** é possível graduar as áreas em vermelho, pelo rolamento da barra (seta preta). Após escolha dos melhores tons que indica o trabeculado ósseo, obtêm-se a porcentagem de tecido ósseo neoformado (retângulo vermelho). As áreas em branco representam a matriz de tecido conjuntivo presentes na medula óssea.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Figura 21 – Interface do programa WCIF Image J 1.37 a[®] utilizado para quantificação da área de tecido neoformado em membro de ovino com compósito – São Paulo – 2014

Legenda: Em **A** vê-se a escala de cor escolhida para o processo de quantificação de tecido ósseo neoformado, em membro de ovino com compósito. Em **B** é possível graduar as áreas em vermelho, pelo rolamento da barra (seta preta em A). Após escolha dos melhores tons que indicavam o trabeculado ósseo, obtêve-se porcentagem de tecido ósseo neoformado, (retângulo vermelho), que nesse caso é composto por tecido ósseo recém formado e biomaterial. As áreas em branco representam a matriz de tecido conjuntivo presente na medula óssea.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

6.5.6 Avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação por MEV foi realizada sob orientação do Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez, do Departamento de Biologia Oral, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Campus São Paulo.

Os fragmentos ósseos colhidos durante a confecção das falhas ósseas e das biópsias foram processados e visualizados no microscópio eletrônico de varredura

LEO 430³², operando com aceleração de voltagem 15 kV. O protocolo de processamento das amostras consistiu em fixação, lavagem, remoção de material orgânico, lavagem, desidratação, secagem, montagem dos *stubs* e metalização (Apêndice D). Cada amostra foi observada o microscópio eletrônico de varredura e descrita qualitativamente considerando-se sua morfologia.

6.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

A seguir são descritas técnicas de análises estatísticas utilizadas na pesquisa.

6.6.1 Dados de imagem

Foram digitados os dados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS v. 18.0 para análise estatística. As variáveis quantitativas foram descritas pela média, mediana, desvio padrão, o mínimo e o máximo. Para a comparação das variáveis ao longo do tempo foi utilizado o teste de Friedman.

Foram utilizados testes de comparações múltiplas para localizar as diferenças. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar os membros com compósito e controle nos diferentes tempos e para comparar as variáveis entre dois tempos. Foi considerado um nível de significância de 5%.

6.6.2 Dados histológicos

Os dados foram digitados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS v. 18.0 para análise estatística. As variáveis quantitativas

³² CAE®, Redwood City, EUA.

foram descritas pela média, mediana, desvio padrão, o mínimo e o máximo. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar os membros com compósito e controle nos diferentes tempos e para comparar as variáveis entre dois tempos. Foi considerado um nível de significância de 5%.

Resultados

7 RESULTADOS

Serão apresentados a seguir os resultados obtidos durante a pesquisa.

7.1 MANEJO DOS ANIMAIS

Os animais que participaram da pesquisa eram provenientes de criatórios com manejo extensivo. O intervalo entre a chegada dos animais e o procedimento cirúrgico foi de trinta dias, sendo fundamental para adaptação ao novo alojamento, contato direto com pessoas e manipulação diária. Durante esse período foi possível a introdução de dieta balanceada a base de concentrado e feno, além de outros cuidados como casqueamento, imunização, administração de antiparasitários. No primeiro dia pós operatório, duas ovelhas fraturaram os metacarpos e precisaram ser substituídas por outras duas ovelhas híginas, que foram então submetidas ao mesmo procedimento, para manutenção do n proposto inicialmente ($n=6$). A primeira ovelha fraturou o terço proximal dos dois metacarpos, após dar um salto para fugir, quando ia ser manipulada para realização da medicação e exame físico. Foi realizada a osteossíntese com pinos transcorticais e imobilização com gesso. A outra ovelha fraturou também o terço proximal do metacarpo esquerdo, quando estava sendo contida, para ser colocada em decúbito lateral, devido a necessidade da troca do cateter da jugular, pelo qual eram realizadas as medicações. Nessa ovelha foi realizada somente a imobilização com gesso. Essas ovelhas fraturadas foram monitoradas diariamente por exames físicos, receberam medicações analgésicas e controle radiográfico para avaliação da consolidação da fratura, apresentando boa evolução do quadro. Após os acidentes, todas as ovelhas foram alojadas em baias menores, para restringir a movimentação e houve mudança também nos cochos de água e ração e na forma de contenção, o que além de prevenir futuras fraturas, possibilitou que se realizassem os exames físicos e de imagem com tranquilidade e segurança.

7.2 PROTOCOLO ANESTÉSICO E ANALGÉSICO

Os fármacos utilizados tanto no momento da cirurgia como para a analgesia, apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que não houve intercorrências durante os procedimentos cirúrgicos. No período pós-operatório os animais não demonstraram sinais de desconforto. Os cateteres epidurais para a administração da morfina mantiveram-se viáveis durante as 48 horas em todos os animais, não sendo necessário o uso de resgate analgésico.

7.3 PROTOCOLO CIRÚRGICO

Neste estudo foram escolhidos os ossos III/IV metacarpianos, o que possibilitou que as avaliações macroscópicas e de imagem fossem realizadas facilmente. A técnica cirúrgica permitiu bom acesso a área para realização da ostectomia, que ao ser realizada com auxílio da trefina de 5 mm, permitiu padronização do tamanho da falha. A incisão em formato de semicírculo e a sutura fora da área da falha possibilitou que os exames de imagem fossem realizados de forma eficiente, sem ser prejudicados pela presença dos fios. Durante a realização da biópsia, foi possível a identificação macroscópica da interface entre osso neoformado/osso pré-existente, o que facilitou a colheita dos fragmentos ósseos para realização das avaliações histológicas. As biópsias foram colhidas com a utilização de trefinas de 3,55 mm, que padronizou o tamanho dos fragmentos retirados. Os exames radiográficos realizados no período trans-operatório para determinação do local da falha óssea também foram de suma importância para a padronização da técnica cirúrgica.

7.4 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

A seguir serão apresentados os resultados das avaliações clínicas, de imagem e histológicas.

7.4.1 Avaliação clínica

Os parâmetros físicos de todos os animais foram aferidos diariamente, o que permitiu o acompanhamento durante todo o período de avaliação. A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que durante o período de 60 dias de pós-operatórios, todos apresentaram os parâmetros dentro dos valores de normalidade para espécie (Tabelas 1, 2 e 3). Não foram observadas alterações de apetite, postura, comportamento nem claudicação em nenhum dos membros operados até os 60 dias de pós-operatório. A cicatrização da ferida cirúrgica foi realizada por primeira intenção e os pontos de pele foram removidos com 14 dias de pós-operatório, sem presença de infecção ou deiscência.

Tabela 1 - Tabela apresentando valores da frequência cardíaca (bpm) máxima e mínima dos animais, média, mediana e desvio padrão durante os 60 dias de avaliação - São Paulo - 2014

Frequência cardíaca	D30	D60	P*
Média	71,58	70,83	0,600
Mediana	66,97	66,16	
Desvio padrão	14,27	12,45	
Mínimo	60,47	62,94	
Máximo	99,27	95,87	

Referência de normalidade: 70-100 bpm
Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014)

Tabela 2 - Tabela apresentando valores da frequência respiratória (mpm) máxima e mínima dos animais, média, mediana e desvio padrão durante os 60 dias de avaliação – São Paulo - 2014

Frequência respiratória	D30	D60	P*
Média	25,01	23,90	0,173
Mediana	25,47	23,97	
Desvio padrão	2,65	2,04	
Mínimo	21,43	20,48	
Máximo	28,10	26,87	
Referência de normalidade: 12-30 mpm Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).			

Tabela 3 - Tabela apresentando valores da temperatura retal (°C) máxima e mínima dos animais, média, mediana e desvio padrão durante os 60 dias de avaliação – São Paulo - 2014

Temperatura	D30	D60	P*
Média	37,98	38,06	0,249
Mediana	38,06	38,09	
Desvio padrão	0,32	0,38	
Mínimo	37,41	37,49	
Máximo	38,36	38,49	
Referência de normalidade: 38,5- 40° C. Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).			

7.4.2 Avaliação radiográfica

As avaliações radiográficas no intervalo de tempo e nas projeções em que foram realizadas permitiram acompanhamento de todo o processo de preenchimento da falha óssea, tanto no membro controle, quanto no membro com compósito. Em alguns momentos, como aos 28 e aos 56 dias de pós-operatório, as mudanças no preenchimento das falhas foram mais nítidas, quanto a radiopacidade (Figura 22).

Figura 22 – Imagens radiográficas no membro com compósito e no membro controle aos 28 e 56 dias pós operatórios – São Paulo - 2014

Legenda: **Membro com compósito:** **A** - Projeção dorsopalmar (D28). **B**- Projeção láteromedial (D28). **C**- Projeção dorsopalmar (D56). **D**- Projeção láteromedial (D56). **Membro controle:** **E**- Projeção dorsopalmar (D28). **F**- Projeção láteromedial (D28). **G**-Projeção dorsopalmar (D56). **H**- Projeção láteromedial (D56).

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014)

Na tabela 4 observa-se a comparação da avaliação radiográfica feita pelo avaliador 1 ao longo do tempo, para o membro controle. Após o ajuste para comparações múltiplas houve diferenças no limite da significância ao longo do tempo e esta diferença foi localizada entre os dias sete, 14, 21, 28 e o dia 56 ($P=0,050$).

Na tabela 5 observa-se a comparação da avaliação radiográfica feita pelo avaliador 1 ao longo do tempo, para o membro com compósito. Depois de ajuste para comparações múltiplas houve diferença estatisticamente significativa no limite da significância na distribuição do escore ao longo do tempo, e esta diferença foi localizada entre os dias sete e 49 e sete e 56, 14 e 49, 14 e 56, 21 e 49, 21 e 56 ($P=0,050$ para todas as comparações).

Tabela 4 - Tabela da avaliação radiográfica realizada pelo avaliador 1 no membro controle – São Paulo - 2014

Tempo	7 dias	14 dias	21dias	28 dias	35 dias	42 dias	49 dias	56 dias	P*
Mediana	1	1	1	1	1	2	2	2	
Mínimo	1	1	1	1	1	1	2	2	<0,001
Máximo	1	1	1	1	2	2	3	4	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Tabela 5.- Tabela da avaliação radiográfica realizada pelo avaliador 1 no membro com compósito – São Paulo - 2014

Tempo	7 dias	14 dias	21dias	28 dias	35 dias	42 dias	49 dias	56 dias	P*
Mediana	1	1	1	1	1	2	2	2	
Mínimo	1	1	1	1	1	1	2	2	<0,001
Máximo	1	1	1	2	2	3	4	4	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

A tabela 6 apresenta valores da avaliação radiográfica realizada pelo avaliador 2 no membro controle e observa-se que houve diferença estatisticamente significativa nos valores ao longo do tempo localizada entre os dias sete e 49 ($P=0,006$), sete e 56 ($P<0,001$), 14 e 49 ($P=0,006$), 14 e 56 ($P<0,001$), e 21 e 56 que ficaram no limite da significância ($P=0,050$).

A tabela 7 apresenta os valores de avaliação radiográfica realizada pelo avaliador 2 no membro com compósito e observa-se que houve diferença estatisticamente significativa nos valores ao longo do tempo localizada entre os dias 7 e 49 ($P=0,001$), 7 e 56 ($P<0,001$), 14 e 56 ($P=0,009$) e 14 e 49, que ficaram no limite da significância ($P=0,050$).

Tabela 6 - Tabela da avaliação radiográfica realizada pelo avaliador 2 no membro controle – São Paulo - 2014

Tempo	7 dias	14 dias	21dias	28 dias	35 dias	42 dias	49 dias	56 dias	P*
Mediana	1	1	2	2	2	3	3	4	
Mínimo	1	1	1	2	2	2	3	3	<0,001
Máximo	1	1	2	2	3	3	4	4	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Tabela 7.- Tabela da avaliação radiográfica realizada pelo avaliador 2 no membro com compósito – São Paulo - 2014

Tempo	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	42 dias	49 dias	56 dias	P*
Mediana	1	2	2	2	3	3	4	4	
Mínimo	1	1	2	2	2	2	3	4	<0,001
Máximo	1	2	2	3	4	4	4	4	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Na tabela 8 observa-se a comparação entre pontuações na avaliação radiográfica entre os avaliadores no membro controle. Há diferença estatisticamente significativa a partir do dia 21.

Na tabela 9 observa-se a comparação entre pontuações na avaliação radiográfica entre os avaliadores no membro com compósito. Há diferença estatisticamente significativa a partir do dia 14.

Tabela 8.- Tabela da comparação da avaliação radiográfica entre os avaliadores no membro controle – São Paulo - 2014

Dia	Avaliador	Mediana	Mínimo	Máximo	P*
7	1	1	1	1	1,000
	2	1	1	1	
14	1	1	1	1	1,000
	2	1	1	1	
21	1	1	1	1	0,046
	2	2	1	2	
28	1	1	1	1	0,014
	2	2	2	2	
35	1	1	1	2	0,025
	2	2	2	3	
42	1	2	1	2	0,020
	2	3	2	3	
49	1	2	2	3	0,020
	2	3	3	4	
56	1	2	2	4	0,038
	2	4	3	4	

* Valor P obtido pelo teste de Wilcoxon

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Tabela 9 - Tabela da comparação da avaliação radiográfica entre os avaliadores no membro com compósito – São Paulo - 2014

Dia	Avaliador	Mediana	Mínimo	Máximo	P*
7	1	1	1	1	1,000
	2	1	1	1	
14	1	1	1	1	0,046
	2	2	1	2	
21	1	1	1	1	0,014
	2	2	2	2	
28	1	1	1	2	0,038
	2	2	2	3	
35	1	1	1	2	0,024
	2	3	2	4	
42	1	2	1	3	0,038
	2	3	2	4	
49	1	2	2	4	0,034
	2	4	3	4	
56	1	2	2	4	0,034
	2	4	4	4	

* Valor P obtido pelo teste de Wilcoxon

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

7.4.3 Avaliação ultrassonográfica

Os exames ultrassonográficos realizados semanalmente permitiram o acompanhamento do processo de preenchimento da falha óssea no membro controle e também permitiram o monitoramento da área onde foi implantado o biomaterial no membro contralateral. Porém, em alguns momentos da avaliação, a diferença de ecogenicidade das imagens na região da falha óssea, tanto em membro controle quanto em membro com compósito, ficou mais evidente (Figura 23).

Figura 23 – Imagens ultrassonográficas com compósito e no membro controle aos 28 e 56 dias pós-operatórios – São Paulo - 2014

Legenda: **Membro com compósito:** **A** – Projeção longitudinal (D28). **B**- Projeção longitudinal (D56). **Membro controle:** **C**- Projeção longitudinal (D28). **D**-Projeção longitudinal (D56).

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

A tabela 10 mostra a comparação da avaliação ultrassonográfica realizada pelo avaliador 1 ao longo do tempo, para o membro controle. Houve diferença estatisticamente significativa na distribuição do escore ao longo do tempo e esta diferença foi localizada entre os dias sete e 42 ($P=0,027$), sete e 49 ($P=0,004$), e sete e 56 ($P=0,001$). Houve diferença também entre os dias 14 e 49 ($P=0,018$), e 14 e 56 ($P=0,006$). Entre os dias 21 e 56 houve diferença no limite da significância estatística ($P=0,050$).

Na tabela 11 observa-se comparação da avaliação ultrassonográfica realizada pelo avaliador 1 ao longo do tempo, para membro com compósito. Houve diferença estatisticamente significativa na distribuição do escore ao longo do tempo e esta diferença foi localizada entre os dias sete e 42 ($P=0,027$), sete e 49 ($P=0,002$), e

sete e 56 ($P=0,002$). Houve diferença também entre os dias 14 e 49 ($P=0,014$), e 14 e 56 ($P=0,014$).

Tabela 10 - Tabela da avaliação ultrassonográfica realizada pelo avaliador 1 no membro controle – São Paulo - 2014

Tempo	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	42 dias	49 dias	56 dias	P*
Mediana	0	0	1	1	1	2	2	2	<0,001
Mínimo	0	0	0	1	1	1	2	2	
Máximo	0	1	1	2	2	2	3	3	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Tabela 11 - Tabela da avaliação ultrassonográfica realizada pelo avaliador 1 no membro com compósito – São Paulo - 2014

Tempo	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	42 dias	49 dias	56 dias	P*
Mediana	1	1	2	2	2	3	3	3	<0,001
Mínimo	0	0	1	1	1	2	2	2	
Máximo	1	2	2	2	3	3	3	3	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman

Fonte: (MARCONDES, G.M., 2014).

A tabela 12 apresenta os valores de avaliação ultrassonográfica realizada pelo avaliador 2 e vemos que houve diferença estatisticamente significativa nos valores do escore ao longo do tempo, para o membro controle. As diferenças localizaram-se entre os dias sete e 49 ($P=0,004$) e os dias sete e 56 ($P<0,001$). Também houve diferença entre os dias 14 e 49 ($P=0,004$) e os dias 14 e 56 ($P<0,001$).

Na tabela 13 observa-se valores de avaliação ultrassonográfica realizada pelo avaliador 2 e vê-se diferença estatisticamente significativa nos valores do escore ao longo do tempo, para o membro com compósito. As diferenças localizaram-se entre os dias sete e 49 ($P=0,018$) e os dias sete e 56 ($P=0,004$). Também houve diferença entre os dias 14 e 49 ($P=0,018$), 14 e 56 ($P=0,004$) e 21 e 56 ($P=0,014$).

Tabela 12 – Tabela da avaliação ultrassonográfica realizada pelo avaliador 2 no membro controle – São Paulo - 2014

Tempo	7 dias	14 dias	21dias	28 dias	35 dias	42 dias	49 dias	56 dias	P*
Mediana	0	0	1	1	1	1	2	3	<0,001
Mínimo	0	0	0	1	1	1	2	2	
Máximo	0	0	1	1	2	3	3	3	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman

Fonte: (MARCONDES, G.M., 2014).

Tabela 13 - Tabela da avaliação ultrassonográfica realizada pelo avaliador 2 no membro com compósito – São Paulo - 2014

Tempo	7 dias	14 dias	21dias	28 dias	35 dias	42 dias	49 dias	56 dias	P*
Mediana	0	0	0	1	1	2	3	3	<0,001
Mínimo	0	0	0	0	0	1	1	2	
Máximo	0	0	1	2	2	3	3	3	

* Valor P obtido pelo teste de Friedman

Fonte : (MARCONDES, G. M., 2014).

A tabela 14 apresenta comparação entre as pontuações do escore de ultrassom realizada pelos dois avaliadores, e não se encontrou diferença estatisticamente significativa para nenhum dos momentos.

Na tabela 15 vê-se a comparação entre os avaliadores para o membro com compósito e observa-se que houve diferença estatisticamente significativa entre estes nos dias sete, 14 e 21.

Tabela 14 - Tabela da comparação da avaliação ultrassonográfica entre os avaliadores no membro controle – São Paulo - 2014

Dia	Avaliador	Mediana	Mínimo	Máximo	P*
7	1	0	0	0	1,000
	2	0	0	0	
14	1	0	0	1	0,157
	2	0	0	0	
21	1	1	0	1	0,317
	2	1	0	1	
28	1	1	1	2	0,317
	2	1	1	1	
35	1	1	1	2	1,000
	2	1	1	2	
42	1	2	1	2	0,317
	2	1	1	3	
49	1	2	2	3	1,000
	2	2	2	3	
56	1	2	2	3	0,157
	2	3	2	3	

* Valor P obtido pelo teste de Wilcoxon

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Tabela 15 - Tabela da comparação da avaliação ultrassonográfica entre os avaliadores no membro com compósito – São Paulo - 2014

Dia	Avaliador	Mediana	Mínimo	Máximo	P*
7	1	1	0	1	0,046
	2	0	0	0	
14	1	1	0	2	0,034
	2	0	0	0	
21	1	2	1	2	0,038
	2	0	0	1	
28	1	2	1	2	0,083
	2	1	0	2	
35	1	2	1	3	0,102
	2	1	0	2	
42	1	3	2	3	0,194
	2	2	1	3	
49	1	3	2	3	0,180
	2	3	1	3	
56	1	3	2	3	0,564
	2	3	2	3	

* Valor P obtido pelo teste de Wilcoxon
 Fonte: (MARCONDES, G.M., 2014).

7.4.4 Avaliação termográfica

A realização semanal dos exames termográficos permitiu acompanhamento da temperatura da superfície da região dos membros, onde a ostectomia foi realizada.

Na tabela 16 observa-se a comparação dos valores da termografia ao longo do tempo no membro com compósito. Houve diferença estatisticamente significativa na distribuição da avaliação térmica ao longo do tempo ($P=0,006$). Esta diferença localizou-se entre os tempos 21 e 56 ($P=0,032$).

Na tabela 17 foi realizada a comparação dos valores da termografia ao longo do tempo no membro controle. Houve diferença estatisticamente significativa na

distribuição da avaliação térmica ao longo do tempo ($P=0,003$). Esta diferença foi localizada entre os tempos 14 e 56 ($P=0,012$) e 21 e 56 ($P=0,039$).

Tabela 16 - Comparação ao longo do tempo da avaliação termográfica no membro com compósito – São Paulo - 2014

Compósito	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	P*
Média	31,55	31,87	34,17	34,93	33,10	31,60	30,88	32,60	30,83	0,006
Mediana	32,15	32,90	34,05	35,75	33,25	31,65	31,10	33,50	31,25	
Desvio padrão	2,24	4,12	0,73	2,11	1,87	2,59	2,30	1,65	2,26	
Mínimo	27,50	24,60	33,30	32,10	29,70	28,60	27,20	29,90	26,70	
Máximo	33,90	36,30	35,40	37,20	34,90	35,00	34,30	33,90	33,00	

*Valor P obtido pelo Teste de Friedman

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Tabela 17 – Comparação ao longo do tempo da avaliação no membro controle - São Paulo - 2014

Controle	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	P*
Média	31,38	30,87	34,58	34,80	32,52	31,57	31,92	32,80	30,73	0,003
Mediana	31,70	31,45	34,55	35,50	33,40	31,45	31,60	33,10	31,55	
Desvio padrão	1,52	4,38	0,52	1,49	2,32	2,27	1,08	0,85	2,30	
Mínimo	29,30	23,30	33,90	32,80	27,80	29,00	30,70	31,30	26,80	
Máximo	33,00	35,00	35,50	36,00	33,80	33,90	33,30	33,70	32,50	

*Valor P obtido pelo teste de Friedman

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Na tabela 18 vê-se a comparação em cada tempo entre os membros com compósito e controle, e observa-se que houve diferença estatisticamente significativa no dia 14 ($P=0,027$).

Tabela 18 – Tabela da comparação da avaliação termográfica entre o membro com compósito e controle em cada período de tempo – São Paulo - 2014

Dia	Grupo	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	P*
D0	Compósito	31,55	32,15	2,24	27,50	33,90	0,916
	Controle	31,38	31,70	1,52	29,30	33,00	
D7	Compósito	31,87	32,90	4,12	24,60	36,30	0,075
	Controle	30,87	31,45	4,38	23,30	35,00	
D14	Compósito	34,17	34,05	0,73	33,30	35,40	0,027
	Controle	34,58	34,55	0,52	33,90	35,50	
D21	Compósito	34,93	35,75	2,11	32,10	37,20	0,674
	Controle	34,80	35,50	1,49	32,80	36,00	
D28	Compósito	33,10	33,25	1,87	29,70	34,90	0,344
	Controle	32,52	33,40	2,32	27,80	33,80	
D35	Compósito	31,60	31,65	2,59	28,60	35,00	0,917
	Controle	31,57	31,45	2,27	29,00	33,90	
D42	Compósito	30,88	31,10	2,30	27,20	34,30	0,345
	Controle	31,92	31,60	1,08	30,70	33,30	
D49	Compósito	32,60	33,50	1,65	29,90	33,90	0,753
	Controle	32,80	33,10	0,85	31,30	33,70	
D56	Compósito	30,83	31,25	2,26	26,70	33,00	0,892
	Controle	30,73	31,55	2,30	26,80	32,50	

* Valor P obtido pelo teste de Wilcoxon.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Observa-se nas tabelas 16, 17 e 18 que houve aumento abrupto da temperatura no dia 14, apresentando leve aumento no dia 21, sendo que a partir desse período a temperatura começou a diminuir, chegando próximo aos valores do período pré-operatório, tanto no membro com compósito, como no membro controle. Esses dados podem ser visualizados mais facilmente no gráfico (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Gráfico da evolução da temperatura média nos membros com compósito e controle, de acordo com o período pós- operatório – São Paulo - 2014

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

7.4.5 Avaliação histológica

A seguir serão apresentados os resultados das avaliações histológicas macroscópicas, MOL e MEV.

7.4.5.1 Avaliação macroscópica

A amostra colhida do membro com compósito apresentava clara interface entre osso e biomaterial, sendo que o compósito apresentava-se com consistência macia e quebradiça e coloração cinza-amarronzada. Na porção medular da amostra, foi possível observar tecido com aspecto semelhante a osso. Da mesma forma foi possível observar em alguns animais periosteio hiperplásico aderido na superfície cortical do osso e no polímero (Figura 24).

A amostra colhida do membro controle apresentava aspecto e coloração semelhante ao osso pré-existente, sendo possível também observar o periósteo hiperplásico fortemente aderido à superfície cortical (Figura 25).

Figura 24 – Realização da biópsia óssea no membro com compósito – São Paulo - 2014

Legenda: Em **A**- Periósteo (seta verde) aderido no local da falha na presença do compósito. **B**- Fragmento ósseo retirado no membro com compósito
Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Figura 25 – Realização da biópsia óssea no membro controle – São Paulo - 2014

Legenda: Em **A**- Periósteo (seta azul) aderido no local da falha no membro. **B**- Fragmento ósseo retirado no membro controle.
Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

7.4.5.2 Avaliação por Microscopia de Luz (MOL)

A tabela 19 apresenta os resultados obtidos a partir da comparação da fração de osso neoformado entre os membros com compósito e controle durante a análise histomorfométrica por MOL. Pode-se observar que houve diferença estatística entre os valores.

Tabela 19 - Tabela da comparação da fração de osso neoformado entre membro com compósito e controle – São Paulo - 2014

	Compósito	Controle	P*
Média	63,50	80,00	0,028
Mediana	65,50	80,00	
Desvio padrão	7,58	8,10	
Mínimo	50,00	69,00	
Máximo	70,00	92,00	

*Valor de P obtido pelo teste de Wilcoxon
 Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

A análise descritiva das lâminas foi realizada no membro controle e no membro com compósito. A observação dos fragmentos obtidos no ato da indução das falhas permitiu registrar o padrão organizacional do tecido ósseo maduro na espécie ovina (Figura 26), e obter parâmetros para comparar os grupos, com compósito e controle.

Figura 26 – Fotomicrografia de microscopia de luz do fragmento ósseo ovino coletado durante a confecção da falha óssea – São Paulo - 2014

Legenda: Observação de tecido ósseo vascular, exibindo inúmeras lacunas (setas amarelas) e canais vasculares (setas pretas). (Coloração *Stevenel's Blue*, aumento original de 50 x).

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

No membro controle foi possível notar presença de tecido ósseo neoformado adjacente ao osso pré-existente, exibindo inúmeras lacunas e espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo. Em alguns locais do osso neoformado nota-se a presença de sistemas de Havers, constituindo osso compacto (Figura 27).

Figura 27 – Fotomicrografia de microscopia de luz de fragmento ósseo ovino coletado de biópsia do grupo controle – São Paulo - 2014

Legenda: Observação de tecido ósseo neoformado em membro controle (à esquerda da linha pontilhada amarela) em interface com tecido ósseo maduro pré-existente à direita (da linha pontilhada amarela). Sistemas de Havers representados por setas brancas. (Coloração *Stevenel's Blue*, aumento original de 50X).

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

A análise dos fragmentos ósseos no membro com compósito demonstrou a presença de trabéculas ósseas imaturas em meio a tecido conjuntivo frouxo celularizado com algumas trabéculas, exibindo conectividade com osso pré-existente. Por entre as trabéculas ósseas neoformadas observa-se material exógeno de coloração acastanhada, com formato circular homogêneo, sugestivo de remanescentes do compósito (Figura 28). Em maior aumento observa-se a ausência de infiltrado inflamatório e de células gigantes multinucleadas, indicando ausência de reação de corpo estranho (Figura 29).

Figura 28 – Fotomicrografia de microscopia de luz de fragmento ósseo ovino coletado de biópsia do membro com compósito – São Paulo - 2014

Legenda: Observação de tecido ósseo neoformado na presença do compósito (à esquerda da linha pontilhada amarela) em interface com tecido ósseo maduro pré-existente à direita (da linha pontilhada amarela). Material exógeno de coloração acastanhada, sugestivo de remanescentes do compósito (setas brancas). (Coloração *Stevenel's Blue*, aumento original de 50 x).

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

Figura 29 – Fotomicrografia de microscopia de luz de fragmento ósseo ovino coletado de biópsia do membro com compósito, em maior aumento – São Paulo - 2014

Legenda: Observação de tecido ósseo neoformado na presença do compósito, com ausência de reação de corpo estranho. (Coloração *Stevenel's Blue*, aumento original de 100 x).

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014).

7.4.5.3 Avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os fragmentos ósseos coletados durante a confecção das falhas foram analisados inicialmente, para registrar o padrão estrutural do tecido ósseo ovino. A partir desta análise, observou-se o padrão característico do tecido ósseo compacto, na sua forma madura. O osso maduro ou secundário apresenta grande quantidade de matriz mineralizada e organizada, sendo possível a visualização de canais vasculares e lacunas de osteócitos com os canálculos ósseos (Figura 30).

Figura 30 – Fragmento ósseo coletado durante a confecção das falhas ósseas – São Paulo - 2014

Legenda: **A**- Tecido ósseo compacto maduro ovino, com presença de canais vasculares (setas vermelhas) e lacunas de osteócitos (setas amarelas), aumento de 2500x; **B**- Maior aumento da imagem A, observação das lacunas de osteócitos (setas amarelas), e canaliculos ósseos tanto nas lacunas de osteócitos, como na matriz mineralizada (setas azuis), aumento de 5000x.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014)

Também foi observado ao MEV um fragmento do compósito para descrever suas características morfológicas originais e compará-las posteriormente após contato com o tecido ósseo dos ovinos. Trata-se de um material bastante poroso, onde as fibras de colágeno são facilmente observadas (Figura 31).

Figura 31 – Fragmentos do compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita, antes da implantação em tecido ósseo ovino – São Paulo - 2014

Legenda: **A-** Material poroso, aumento de 500x; **B-** Maior aumento da imagem A, observação das fibras de colágeno (setas azuis), aumento de 5000x.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014)

Ao visualizar os fragmentos de biópsia provenientes das falhas sem preenchimento com o compósito, constatou-se a presença de regiões de tecido neoformado em interface com regiões de osso pré-existente. O osso formado apresentava características de osso imaturo (Figura 32).

Figura 32 – Fragmento ósseo coletado durante a biópsia do membro controle – São Paulo - 2014

Legenda: Tecido ósseo compacto pré-existente à esquerda da linha vermelha. À direita da linha vermelha observa-se tecido osso primário neoformado, aumento de 350 x.
Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014)

A análise dos fragmentos da biópsia das falhas em membros preenchidos com compósito revelou a formação de pequenas áreas de tecido ósseo neoformado, as quais se situavam unidas com grandes áreas de tecido ósseo pré-existente e de compósito (Figura 33). Apesar de pequenas, as áreas de osso neoformado apresentaram o mesmo aspecto estrutural observado nos fragmentos de biópsia de falhas não preenchidas. Observou-se também que aspecto do compósito após sua implantação é semelhante à sua configuração original, apresentando sinais discretos

de fragmentação e evidências de tecido ósseo neoformado invadindo-o internamente (Figura 34).

Figura 33 – Panorâmica do fragmento ósseo coletado durante a biópsia do membro com compósito – São Paulo - 2014

Legenda: Tecido ósseo neoformado delimitado pela linha vermelha, em interface com compósito, (letra **B**), e com tecido ósseo pré-existente (letra **O**), aumento de 50x.
Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014)

Figura 34 – Fragmento ósseo coletado durante a biópsia do membro com compósito – São Paulo - 2014

Legenda: **A** - Tecido ósseo neoformado delimitado pela linha vermelha, em interface com compósito, acima e com tecido ósseo pré-existente, a direita, aumento de 300x; **B** – Tecido ósseo neoformado primário, sendo possível a observação de lacunas de osteócitos (setas amarelas), aumento de 1000x.

Fonte: (MARCONDES, G. M., 2014)

Discussão

8 DISCUSSÃO

Serão discutidos os resultados das avaliações clínicas, de imagem e histológicas do presente estudo, confrontando com a literatura atual.

Substitutos ósseos e o biomaterial escolhido

Na medicina veterinária, há um grande desafio, quando o ortopedista se depara com quadros de fraturas em grandes animais, com grande perda de tecido ósseo, que além de comprometer a estabilidade da osteossíntese, pode gerar um grande período de recuperação do animal, e retorno as atividades funcionais. Por esse motivo, nesse estudo buscou-se a utilização de compósito como substituto ósseo, que poderá servir como coadjuvantes aos tratamentos usuais, com intuito de potencializar o sucesso de técnicas de osteossíntese, para um resultado final positivo, seja para um animal de produção de alto valor zootécnico, ou para um equino de esporte (PARRIER et al., 2008; VON RECHENBERG et al., 2013; NÓBREGA et al., 2014).

Não há dados na literatura sobre o uso do compósito a base de quitosana, colágeno e hidroxiapatita em tecido ósseo, portanto no presente estudo, pela primeira vez, utiliza-se com essa finalidade. Esse compósito foi utilizado somente em tecido subcutâneo de ratos por Amaral (2006) e foi observada biocompatibilidade.

Algumas características do compósito do presente estudo justifica o interesse em ser usado como substituto ósseo, já que seus constituintes apresentam algumas características essenciais aos substitutos ósseos ideais (DALAPÍCULA et al., 2006; LICHTÉ et al., 2011). Pode-se citar, por exemplo, microestrutura porosa que possibilita a penetração de tecido em crescimento, além de os produtos de degradação gerados são atóxicos e de fácil eliminação pelo organismo. Outras características importantes são a flexibilidade de formulação, facilidade de manipulação, bom poder de adesão ao tecido receptor e atividade osteocondutora (LEONEL et al., 2003).

O compósito utilizado no presente estudo, na forma que se apresenta, em cilindros já estéreis e pronto para uso no momento da cirurgia, são de fácil manuseio e aplicação no local da ostectomia e essas características são desejáveis quando se trata de um substituto ósseo (DALAPÍCULA et al., 2006). Portanto, a escolha do compósito a base de quitosana, colágeno e hidroxiapatita foi baseada em todas as suas características físico químicas e de aplicabilidade, quando há necessidade de se adotar estratégias complementares para aumentar a taxa de sucesso no tratamento de falhas ósseas em grandes animais.

Espécie escolhida e metodologia aplicada

A espécie ovina foi escolhida no presente estudo, devido ao fato ser a espécie que mais vem sendo utilizada com sucesso em estudos relacionados à biocompatibilidade de biomateriais como substitutos ósseos (MARTINI et al., 2001; VIATEAU et al., 2004; NUSS et al., 2006; AUER et al., 2007; PLECKO et al., 2012; UEBERSAX et al., 2013; VON RECHENBERG et al., 2013). Os ovinos, principalmente fêmeas adultas são muito utilizadas em estudos na ortopedia por apresentarem peso, estrutura e biologia óssea semelhantes ao humano e por serem de fácil manejo, além de não serem animais de estimação, o que leva a uma melhor aceitação por parte da comunidade científica (MARTINI et al., 2001).

É importante a padronização de idade, sanidade e status reprodutivo quando se utiliza fêmeas em estudos de avaliação da interação biológica entre biomateriais e osso, visto que a idade precoce ou muito avançada e presença de doenças poderá influenciar diretamente o metabolismo mineral ósseo. Durante a gestação e a lactação os hormônios alteram também o metabolismo do cálcio e fósforo, que influenciariam diretamente no processo de reparo ósseo (MARTINI et al., 2001). Em virtude dessas características, no presente estudo padronizou-se o uso de fêmeas adultas, híginas e não prenhes. Foi realizado exames laboratoriais pré-operatórios para avaliar condições hematológicas, bioquímicas e parasitológicas. Cuidados com vacinação e vermifugação também foram tomados. Além disso, optou-se pela ambientação de um mês antes do procedimento cirúrgico, para que os animais se adaptassem a nova condição de manejo. Essas medidas são preconizadas por Auer

et al. (2007) que afirma que os animais devem estar acostumados ao ambiente antes do procedimento cirúrgico, para que as atividades de rotina pós-operatórias, com os mesmos, possam ser realizadas com maior facilidade.

O modelo de ostectomia utilizada para avaliar o processo de regeneração foi adaptação feita dos estudos de Nuss et al. (2006); Petrizzi et al. (2007); Uebersax et al. (2013) e Von Rechenberg et al. (2013) que utilizaram modelos de falhas ósseas circulares em metáfises e epífises de ossos como úmero, fêmur, tíbia e metacarpos, em que o tipo ósseo predominante é o osso esponjoso. Petrizzi et al. (2007) que utilizou falhas bicorticais de quatro milímetros em diáfise de metacarpo de ovinos, para avaliação do reparo ósseo, na administração concomitante de agentes opióides, considerou que ostectomia nessa dimensão produz um defeito ósseo crítico, que não cicatriza por completo, no período de oito semanas, no qual o experimento foi realizado. Consideraram ainda que esse modelo é seguro para avaliação do reparo ósseo, com baixa morbidade (PETRIZZI et al., 2007).

Optou-se no presente estudo por realizar uma falha circular unicortical de sete milímetros de diâmetro em diáfise dos ossos III/IV metacarpianos, produzindo um defeito crítico. O osso III/IV metacarpianos foi escolhido por ser um local vulnerável a fraturas em grandes animais, que sofre grande carga durante o processo regenerativo, em função da sua localização, função e falta de cobertura de tecidos moles (VIATEAU et al., 2004; LOPES; MARKEL, 2012).

A falha na região diafisária foi escolhida, pois sabe-se que nessa região, o III/IV metacarpianos são formados por osso cortical, que apresenta uma taxa de regeneração mais lenta quando comparada ao osso esponjoso (NUSS et al., 2006), além de não haver relatos na literatura da avaliação da biocompatibilidade de compósitos com tecido ovino na região do osso que o presente estudo utilizou. Por outro lado, a escassa cobertura por tecidos moles da região diafisária do osso estudado, facilitou o acesso cirúrgico, bem como as avaliações clínicas e de imagem realizadas nesse estudo, fato esse observado também em estudo com falhas ósseas circulares unicorticais em III metacarpianos de equinos, em que foi utilizada a poliuretana de mamona como substituto ósseo (NÓBREGA et al., 2014).

Viateau et al. (2004) acreditam que a utilização de ossos longos com formato reto como metatarso e metacarpo, como no presente estudo, é interessante para o estudo de reparo ósseo após falhas experimentais em diáfise, pois a técnica cirúrgica pode ser realizada com precisão, além de facilitar a realização de testes

biomecânicos futuros. A taxa de morbidade no estudo em que se utilizou o metatarso para realização da ostectomia foi semelhante a taxa de morbidade de estudos que utilizaram fêmur e tíbia (VIATEAU et al., 2004; VIATEAU et al., 2007).

O uso de cada animal como próprio controle permitiu reduzir as variáveis do processo de regeneração óssea, provocada pelas particularidades de cada indivíduo (REZENDE et al., 1998; BABIKER, 2013). Babiker (2013) preconiza o uso de cada animal como controle dele mesmo, pois observou em seu estudo semelhança no padrão de regeneração óssea no membro controle e no membro tratado, de um mesmo animal. A proposta de utilização individual utilizada no presente estudo, corrobora com achados de Babiker (2013) que afirma que experimentos podem ser padronizados, quando se utiliza o próprio animal como controle pois há redução de variáveis específicas e aumento da acurácia estatística.

A realização de exame radiográfico no período transoperatório foi de suma importância para padronização da técnica cirúrgica, fato esse que colabora para a recuperação pós-operatória dos animais, já que há uma menor manipulação no local da ostectomia. Auer et al. (2007) afirmam que a realização de cirurgias em modelos experimentais animais deve ser realizada por cirurgiões e anestesiistas veterinários, que tenham experiência em lidar com a espécie em questão, pois peculiaridades anatômicas e fisiológicas interferem diretamente na padronização e sucesso do procedimento cirúrgico, que estão relacionados diretamente com baixas taxas de complicações pós-operatórias.

Outro ponto importante do presente estudo, observando os critérios atuais de bem estar animal, tanto legais, quanto éticos, foi que os animais não foram submetidos à eutanásia. Foi possível através da biópsia, colher material suficiente para a realização de análises histológicas, diferentemente dos estudos realizados por Viateau et al. (2004); Nuss et al. (2006); Viateau et al. (2007); Uebersax et al. (2013) e Von Rechenberg et al. (2013), em que os animais foram submetidos a eutanásia para colheita de material para realização de avaliações histológicas.

Dentre os oito animais operados, dois apresentaram complicações no primeiro dia de pós-operatório, fato esse não relacionado ao procedimento cirúrgico em si, mas sim ao comportamento individual, pois apresentavam comportamento mais arreadio, fraturando os metacarpos, tendo que ser afastados da pesquisa. Von Rechenberg (2008) afirma que muitas vezes as complicações podem não estar relacionadas ao procedimento de ostectomia nos membros, mas sim ao

comportamento individual de alguns animais ao caminharem, se deitarem ou levantarem de forma brusca.

A taxa de complicações no presente estudo, de 25%, está próximo dos valores encontrados em pesquisas nas quais ovinos são utilizados como modelos experimentais para estudo da biocompatibilidade de biomateriais (VIATEAU et al., 2004; VON RECHENBERG, 2008; HAN et al., 2011). E diferentemente de pesquisa realizada por Nuss et al. (2006), onde os animais fraturados foram submetidos a eutanásia, no presente estudo os animais foram tratados, se recuperando bem. Aplicação de bandagens elásticas no pós-operatório das ostectomias, mudanças na estabulação e na forma de contenção dos animais, foram de suma importância, para que nenhum outro acidente acontecesse. A utilização de talas no período pós-operatório de biópsia foi importante também para prevenção da ocorrência de fraturas e outras complicações, fato esse preconizado por Auer et al. (2007) e Von Rechenberg (2008), que sugerem o uso de bandagens ou gessos para proteção dos membros e até mesmo o uso de suspensores, dependendo do tipo de defeito criado, sempre levando em consideração o bem estar animal.

Avaliação clínica

A avaliação clínica permitiu acompanhamento do estado geral do animal e a resposta dos mesmos frente a implantação do compósito. Devido ao fato do local onde foi realizada a ostectomia apresentar pouca cobertura por tecidos moles, não havendo necessidade de manipulação de tecido muscular, era esperado que não houvesse edema na região da ferida cirúrgica. Os animais não demonstraram dor à palpação no local da ostectomia, nem no pós-operatório imediato, sequer no pós-operatório da biópsia. Na avaliação da presença ou ausência de claudicação, durante todo o período de avaliação de 60 dias, não foi observada claudicação, nem mesmo permanência em decúbito por tempo maior que o habitual para a espécie. A avaliação de presença ou ausência de claudicação após ostectomia em ovinos também foi utilizada por Viateau et al. (2004); Petrizzi et al. (2007) e Plecko et al. (2012).

A realização de exames físicos diários foi utilizada para garantir que durante o período de avaliação do estudo, os animais não apresentassem alterações dos parâmetros físicos, sendo que todos estavam dentro dos padrões de normalidade para a espécie. Vários estudos consideram a avaliação clínica importante para acompanhamento do processo de reparo ósseo dos animais, sendo que muitas vezes alterações observadas na avaliação clínica também podem ser observadas em avaliações de imagem e histológicas (MARTINI et al., 2001; PETRIZZI et al., 2007).

O presente estudo objetivou prevenir, identificar e tratar a dor no período pós-operatório, com utilização de medicação anti-inflamatória e analgésico opióide, pensando na relação com o bem-estar animal e sua influencia nos resultados da pesquisa. O tratamento da dor em estudos de modelos experimentais de reparação óssea deve seguir alguns pré-requisitos apontados por Auer et al. (2007), que considera que é preciso o conhecimento de estratégias farmacológicas e não farmacológicas para o adequado tratamento da dor, e também deve haver a habilidade em identificar e avaliar a dor na espécie em questão e entre indivíduos. Outros pontos são apontados, como o inadequado tratamento da dor, que possui impacto direto na validade e no sucesso de pesquisas no aparelho locomotor, estando relacionados também à alta taxa de complicações e mortalidade (AUER et al., 2007; VON RECHENBERG, 2008).

Avaliações de imagens

O esquema proposto para acompanhamento radiográfico semanal permitiu avaliação periódica da evolução do processo de reparação óssea no membro controle e no membro com compósito, estabilidade do implante no leito receptor e identificação de possíveis ocorrências de reações de incompatibilidade ao compósito. Alguns autores afirmam que em estudos que investigam a reparação óssea frente a implantação de biomateriais, o exame radiográfico aliado aos achados histológicos, fornecem dados mais completos quanto a biocompatibilidade e osteocondução (MOREIRA et al., 2003; VIATEAU et al., 2004; CARNEIRO et al., 2005; VIATEAU et al., 2007; SILVA et al., 2009). Não foram observados no presente

estudo sinais radiográficos de deslocamento aparente dos implantes, reações de osteólise e/ou proliferação óssea acentuada das áreas adjacentes ao compósito. Isto indica que o mesmo apresentou radiograficamente biocompatibilidade com o tecido ósseo ovino.

A escolha da avaliação radiográfica por escore de preenchimento de falha óssea permite a avaliação estatística de método subjetivo e está de acordo com estudos que utilizaram o mesmo método (MOREIRA et al., 2003; FERREIRA, 2008; SILVA et al., 2009; DORNBUSCH et al., 2010). No presente estudo foi observado que tanto no membro controle, como no membro com compósito houve diferença estatística significativa ao longo dos dias, isso devido ao número de avaliações num curto período de tempo. A diferença estatística significativa entre os avaliadores ocorre pela subjetividade da técnica de avaliação radiográfica por escores, identificada também no estudo de Ferreira (2008), e que pode ser minimizada quando se utiliza métodos numéricos de avaliação de imagem para mensuração do processo de reparo de falhas ósseas como a microradiografia, a densitometria óssea e a microtomografia computadorizada (NUSS et al., 2006; VIATEAU et al., 2007; AMARAL, 2013; SELIM, 2013).

No estudo atual foi considerado, pelos dois avaliadores, que tanto o membro com compósito como o membro controle, na última avaliação, o escore de preenchimento da falha seria de >75% em algumas imagens, atingindo grau máximo, o que sugere que radiograficamente, estariam em fases semelhantes de preenchimento de falha óssea, corroborando com achados de Rezende et al. (1998) e Freitas et al. (2008), nos quais o membro tratado e o membro controle demonstraram radiograficamente estarem em fases semelhantes de preenchimento, na última avaliação realizada. No entanto, contrasta com achados de outros estudos que observaram maior velocidade de preenchimento da falha no membro controle (DORNBUSCH et al., 2010) ou de maior velocidade de preenchimento em membro tratado, ao final das avaliações (VIATEAU et al., 2004; VIATEAU et al., 2007).

O exame ultrassonográfico é um exame auxiliar para avaliação do processo de reparação óssea e permite visualização precoce do processo regenerativo (THURMULLER et al., 2002; RISSELADA et al., 2007; NÓBREGA, 2014). Por esse motivo foi utilizado no presente estudo o monitoramento do membro controle e no membro com compósito, para o detalhamento do processo regenerativo na espécie ovina, nessas duas situações. Assim como nas avaliações radiográficas, a diferença

estatística significativa ao longo do tempo se deve ao número de avaliações num curto período de tempo.

No membro controle não houve diferença estatística significativa entre os avaliadores, o que sugere que nesse membro os avaliadores apresentaram o mesmo perfil para avaliação do preenchimento da falha. Foi possível avaliação ultrassonográfica no membro com compósito ao longo do tempo, porém nas primeiras três avaliações a presença do polímero pode ter dificultado a visualização nítida do preenchimento da falha, pelos avaliadores, o que foi expresso pela diferença estatística significativa entre os avaliadores no início, nesse membro. Esses dados contrastam com achados do estudo de Nóbrega (2014), no qual não foi possível avaliar a falha em nenhum momento no membro com polímero, pois a presença do biomaterial ocasionava a formação de sombra acústica, e impossibilitava a avaliação desse membro.

Observou-se que os avaliadores consideraram que o preenchimento da falha atingia o grau máximo, tanto em membro controle, como em membro com compósito, não somente na última avaliação, mas em avaliações anteriores, o que sugere que a avaliação ultrassonográfica tenha detectado mais precocemente a fase final de preenchimento da falha, semelhante nos dois membros.

Durante as avaliações ultrassonográficas não foi possível detectar alterações em estruturas adjacentes ao local da falha, que pudessem estar relacionados a reação de incompatibilidade do compósito ao tecido ósseo ovino. Ressalta-se ainda, que método de avaliação ultrassonográfico foi de fácil execução, podendo ser incorporado á rotina clínico-cirúrgica de forma mais efetiva, sendo complementar a avaliação radiográfica, com o benefício de ser um método não invasivo e livre de radioatividade tanto para paciente, como para examinador (CHEN et al., 2014).

A escolha da termografia como método de avaliação por imagem justifica-se por não ser um método invasivo e não apresentar nenhuma característica nociva tanto para o paciente, quanto para o examinador (HOLST, 2000). Em equinos e cães, esse método de avaliação é utilizado com frequência, porém em ovinos não há relatos na literatura, da sua utilização na reparação de lesões ósseas em membros, portanto a discussão do presente projeto foi extrapolado de estudos em outras espécies.

A avaliação termográfica seguiu métodos preconizados por Purohit (2008), que recomenda que a captação das imagens deve ser realizada no próprio local

onde o animal fica alojado, sendo que as bandagens devem ser removidas pelo menos 30 minutos antes do exame, para equilibrar a temperatura do membro com o ambiente. Ressaltam também a importância da realização do exame em locais protegidos do sol, sem presença de correntes de vento e pouca movimentação dos animais, com uso de contenção física no momento do exame (PUROHIT; TURNER; PASCOE, 2003; PUROHIT, 2008; NÓBREGA, 2014; REDAELLI et al., 2014).

Na análise dos resultados do exame termográfico, optou-se por demarcar área central do III/IV metacarpianos e utilizou-se a temperatura média da região. Esta conduta foi adotada também por Hoogmoed et al. (2000), que avaliaram os efeitos de substâncias tóxicas em membros distais de equinos e Nóbrega (2014) que avaliou a temperatura média em membros com falhas ósseas em osso III metacarpiano de equino, com e sem o preenchimento com poliuretana de mamona.

No presente estudo observou-se ao longo do tempo diferença estatística significativa, tanto no membro controle e no membro com compósito, com pico de aumento de temperatura entre os dias 14^o e 21^o pós-operatórios, o que sugere que esse aumento esteja relacionado com o pico da fase inflamatória do processo de reparação óssea, relacionada a indução da falha (SCHINDELER et al., 2008).

A comparação da temperatura média entre membro controle e membro com compósito, apesar de apresentar diferença estatística significativa aos 14 dias de pós-operatório, com maior média de temperatura do membro controle, não apresenta relevância clínica, uma vez que a diferença entre as temperaturas entre os grupos é de décimos de graus °C. Pode-se afirmar portanto, que a variação da temperatura tanto em membro controle, como em membro com compósito, seguiu o mesmo padrão, sendo que o compósito não gerou qualquer reação de rejeição por parte do tecido ósseo ovino, que ocasionasse aumento de temperatura no local. Esses achados contrastam com achados de Nóbrega (2014), que observou aumento de temperatura mais intensa no 7^o dia de pós-operatório no membro com polímero de poliuretana de mamona, fato esse que acredita ocorrer por se tratar de uma implantação de corpo estranho, apesar do biomaterial apresentar biocompatibilidade observada em exames clínicos, de imagem e histológicos.

Avaliações macro e microscópicas

A discussão, quanto às avaliações macro e microscópicas da interação biológica do compósito no tecido ósseo ovino, serão baseadas na utilização do compósito em tecido subcutâneo de ratos por Amaral (2006), já que não há relatos de sua utilização em tecido ósseo; e do comportamento histológico de cada um dos componentes do compósito (quitosana, colágeno e hidroxiapatita) implantados isoladamente em tecido ósseo em várias espécies animais, comparados com outros biomateriais.

No presente estudo, optou-se por realizar a biópsia após 60 dias da implantação do compósito, para a coleta de fragmentos ósseos e realização de avaliações histológicas, tanto por MEV quanto por MOL, pois esse período é considerado como adequado, quando objetiva-se avaliar histologicamente a biocompatibilidade e a osteocondução de implantes porosos, no tecido ósseo ovino (LIU et al., 2000; GIAVARESI et al., 2003; NUSS et al., 2006; PETRIZZI et al., 2007; PLECKO et al., 2012; VON RECHENBERG et al., 2013). Plecko et al. (2012) afirma que a avaliação histológica no tempo de 60 dias após a implantação é ideal pois nesse período a cicatrização da ferida de pele está completa, mas as reações de corpo estranho no tecido ósseo podem facilmente ser observadas e a osteointegração alcança um alto nível nesse tempo.

Na análise macroscópica da biópsia no membro com compósito, observou-se que o biomaterial não foi absorvido por completo, podendo ser distinguido do osso pré existente e tornando-se menos resistente após a manipulação aos 60 dias, característica observada por Bolson et al. (2005) e Nóbrega (2014). Utilizando-se deste critério, pode-se afirmar que pesquisas futuras são necessárias para avaliar a resistência mecânica do material após sua implantação, que pode ser melhor estudada em ovinos após seis meses de implantação (NUSS et al., 2006; BABIKER, 2013).

Observou-se macroscopicamente, durante realização das biópsias presença de perióstio hiperplásico, invaginando-se para o interior das falhas, tanto no membro controle como no membro com compósito, o que sugere sua participação no processo de consolidação óssea, reforçando a teoria da ativação desta estrutura

após trauma, promovendo neoformação óssea (MALIZOS; PAPATHEODOROU, 2005; VIATEAU et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008).

Optou-se por realizar a histologia utilizando amostras de material ósseo calcificado, pois com essa técnica é possível quantificar a porcentagem de tecido neoformado através da histomorfometria, e avaliar qualitativamente a estrutura do tecido formado no processo de reparação na presença e na ausência do compósito através de MOL e MEV, bem como avaliar se houve reação de corpo estranho na presença do biomaterial (ATLAN et al., 1999; NUSS et al., 2006; VIATEAU; VON RECHENBERG et al., 2013).

A avaliação por MEV permitiu a observação da microestrutura óssea, revelando que a mesma foi preservada durante o processo de reparação na presença do compósito. Observou-se que a microestrutura do osso neoformado na presença do compósito assemelha-se muito à observada nas biópsias do membro controle e nos fragmentos de tecido obtidos durante a confecção das falhas ósseas. Além disso, não foi detectada formação de tecido cicatricial no membro com compósito, sendo observado apenas tecido ósseo imaturo. Tais observações são positivas e demonstram que o compósito não induziu reações de corpo estranho e que tende a ser substituído por tecido ósseo de qualidade equivalente a inicial, corroborando com achados de estudos que também observaram biocompatibilidade e osteocondução por MEV entre biomaterial a base de carbonato de cálcio e tecido ósseo ovino; hidroxiapatita e tecido ósseo de coelhos (ATLAN et al., 1999; CHANG et al., 2000).

Outro aspecto avaliado através da MEV foi a estrutura do biomaterial após a interação com o tecido ósseo. Observou-se sinais discretos de degradação do compósito, sendo que sua estrutura apresentava-se preservada após 60 dias de implantação. Este dado sugere que o biomaterial apresentou comportamento bioabsorvível na espécie ovina; contudo a velocidade de absorção é evidentemente menor do que a formação de tecido novo, fato observado também no estudo de avaliação da interação entre polímero de mamona e tecido ósseo equino (SELIM, 2013).

Através da MEV no presente estudo observou-se que o tecido ósseo neoformado na presença do compósito estava interligado com tecido ósseo pré-existente, sendo observada ainda, invasão dos poros do compósito por tecido ósseo neoformado, contrastando com achados de Matsuda et al. (1995), em relação ao

composto sintético a base de hidroxiapatita. A fusão entre tecido ósseo neoformado na presença do compósito, com o compósito e com o tecido ósseo pré-existente comprova o potencial osteocondutor do biomaterial do presente estudo.

Observou-se na histomorfometria por microscopia de luz que a porcentagem de tecido ósseo neoformado, em membro controle foi maior que em membro com compósito, com diferença estatística significativa entre os membros. Isso confirma novamente o fato do biomaterial não estar totalmente absorvido, o que pode colaborar para uma menor formação de tecido ósseo neoformado, corroborando com achados de outros estudos, no qual a neoformação óssea foi maior no grupo controle (MOREIRA et al., 2003; SPIN NETO, 2008; SELIM, 2013; NÓBREGA, 2014). Contrastam, no entanto, com achados de estudos, no qual por avaliação histológica, demonstrou-se maior porcentagem de osso neoformado nos grupos com tratamento (OAKES; LEE; LIEBERMAN, 2001; SILVA et al., 2009).

Na análise histológica descritiva por microscopia de luz observou-se que a estrutura e o tipo de tecido neoformado na presença do compósito foi semelhante ao formado em condições fisiológicas (controle), podendo ser nítida; a presença de tecido ósseo neoformado entremeado a resquícios do biomaterial, confirmando a atividade osteocondutora de componentes do compósito como a hidroxiapatita (REZENDE et al., 1998; LIU et al., 2000; MAEDA, 2013).

Os achados das avaliações por imagem do presente estudo, nos quais foram observados preenchimento da falha semelhante em membro com compósito e membro controle contrastam com os achados de histomorfometria, na qual houve maior porcentagem de tecido neoformado em membro controle, apesar da visualização nítida de tecido ósseo neoformado em membro com compósito, ainda que em menores proporções. Esses dados confirmam a hipótese de que muitas vezes os achados das avaliações de imagem, que estão mais acessíveis na rotina clínica, podem não refletir a real fase de preenchimento e reparo ósseo, contrastando com achados de histologia e biomecânica, que apesar de menos acessíveis, refletem exatamente o grau de neoformação óssea e a capacidade de resistência a forças aplicadas, corroborando com achados de Babiker (2013).

Observou-se também por microscopia de luz, ausência de infiltrado inflamatório ou células gigantes multinucleadas, sugerindo ausência de reação de corpo estranho, relacionadas as características de componentes naturais do

compósito, que comprovam sua biocompatibilidade (DI MARTINO; SITTINGER; RISBUD, 2005; THEIN-HAN; MISRA, 2009; BABIKER, 2013).

A ausência de reação de corpo estranho observado no presente estudo corrobora com achados Amaral (2006), que utilizou o mesmo compósito em subcutâneo de ratos e observou que o biomaterial induziu a presença de poucos linfócitos e granulomas, sugerindo baixa antigenicidade do material e também muitos vasos neoformados entremeados com o biomaterial, denotando um estímulo vasculogênico, importante e provavelmente relacionado aos seus componentes naturais que favoreceram o crescimento tecidual. Amaral (2006) observou também um pequeno número de fibroblastos, indicando que não houve a formação de fibrose importante e que as células teciduais se aderiram diretamente aos materiais, sendo o compósito, portanto, biocompatível com tecido subcutâneo dos ratos.

Os achados do presente estudo corroboram com achados de Wang et al. (2002) que observaram biocompatibilidade e osteocondução relacionado ao uso de *scaffolds* de quitosana em tíbia de coelhos, e Maeda (2013), que utilizou diversas composições de hidroxiapatita em tíbias de coelhos, observando biocompatibilidade do material com o tecido animal. Contrastam com achados de Spin Neto (2008) que não observou biocompatibilidade dos várias apresentações de quitosana com o tecido ósseo do rato, e sugere que seja devido a origem, pureza e porosidade do material utilizado.

Num estudo de Carneiro et al. (2005) foi observada reação de corpo estranho quando se implantou matriz óssea desmineralizada bovina em fêmur de coelhos e acredita-se que o fato de não ter ocorrido biocompatibilidade possa ser devido a incompleta descalcificação do material, na qual manteve o material antigênico, e reforça que esse biomaterial natural deve sofrer aprimoramento do controle de qualidade e na técnica de produção a fim de eliminar resquícios de componentes incompatíveis com tecido em questão. No presente estudo, pode-se considerar que os componentes naturais do compósito em questão foram extraídos e processados de forma adequada, de modo que fosse observada biocompatibilidade com o tecido ovino.

Conclusões

9 CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos e nas condições em que o experimento foi conduzido, pode-se concluir que:

- O delineamento experimental possibilitou a coleta de inúmeras informações relacionadas ao comportamento biológico do ovino frente à implantação do compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita;
- A utilização de ovinos, como modelo experimental, foi satisfatória, e todos se adaptaram ao manejo intensivo, tolerando bem os procedimentos cirúrgicos e período de avaliações pós-operatórias;
- A realização dos exames físicos diários nos permite afirmar que os animais durante todo o período de estudo, estiveram sob condições de saúde adequadas para seu bem estar, fato esse possível de ser comprovado pela análise dos parâmetros de frequência cardíaca, respiratória, e temperatura, que sempre se mantiveram dentro dos padrões fisiológicos de normalidade para a espécie;
- As avaliações radiográficas permitiram o acompanhamento do processo de consolidação óssea, em membro controle e membro com compósito, não sendo observados processos de osteólise, nem proliferação óssea exacerbada em nenhum dos grupos, e por isso pode-se considerar que não houve rejeição ao biomaterial implantado;
- A realização de exames radiográficos no período trans-operatório foi muito importante para a padronização da técnica cirúrgica aplicada;
- As avaliações ultrassonográficas possibilitaram avaliações mais precoces do processo de reparação óssea;
- A avaliação termográfica permitiu a avaliação de todo o processo de inflamação nos membros, na região onde se realizou ostectomia, e observou-se que não houve grandes diferenças de temperatura entre membro controle e membro com compósito;
- A avaliação histológica através da microscopia eletrônica de varredura permitiu concluir que a estrutura do tecido neoformado na presença do

compósito é semelhante ao tecido ósseo neoformado em membro controle, sendo que há invasão do compósito por tecido ósseo neoformado;

- A avaliação histológica através da microscopia de luz permitiu concluir que o compósito não produziu reação de corpo estranho, sendo considerado biocompatível com tecido ovino e permitiu neoformação óssea, sendo considerado osteocondutor, uma vez que foi identificada invasão de tecido ósseo em seu interior.

Referências

REFERÊNCIAS

- AFONSO, A. S. **Interação entre biomateriais e tecido ósseo**. 1998. 213 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Porto, 1998.
- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal**, v. 10, n. 2, p. 96 - 101, 2001.
- AMARAL, M. B. **Capacidade de regeneração óssea de biomateriais em defeito crítico de calvária** : análise histológica e microtomografia computadorizada. 2013. 110 f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- AMARAL, M. B. **Citotoxicidade *in vitro* e biocompatibilidade *in vivo* de compósitos a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 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.
- ARANA, V.; BRADASCHIA, V. Tecido ósseo. In:_____. **Biologia celular e tecidual para odontologia**: moléculas, células e tecidos. São Paulo: Elsevier, 2012. Cap. 11, p. 219-226.
- ARANA, V.; KATCHBURIAN, E. Tecido ósseo. In:_____. **Histologia e embriologia oral. Texto- atlas- correlações clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 3, p. 37-74.
- ATLAN, G.; DELATTRE, O.; BERLAND, S.; LE FAOU, A.; NABIAS, G ; COT, D.; LOPEZ, E. Interface between bone and nacre implants in sheep. **Biomaterials**, v. 20, p. 1017-1022, 1999.
- AUER, J. A.; GOODSHIP, A.; ARNOCZKY, S.; PEARCE, S.; PRICE, J.; CLAES, L.; VON RECHENBERG, B.; HOFMANN-AMTENBRINCK, M.; SCHNEIDER, E.; MÜLLER-TERPITZ, R.; THIELE, F.; RIPPE, K. P.; GRAINGER, D. W. Refining animal models in fracture reserach:seeking consensus in optimising both animal welfare ad scientific validity for appropriate biomedical use. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 8, n. 72, p. 1-13, 2007.

AZEVEDO, V. C. C. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BABIKER, H. Bone graft materials in fixation of orthopaedic implants in sheep. **Danish Medical Journal**, v. 60, n. 7, p. 1-19, 2013.

BANKS, W. J. Tecidos de sustentação- osso. In:_____. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1991. Cap. 9, p. 137-166.

BARRÈRE, F.; BLITTERSWIJK, C.; AVAN, C.; GROOT, K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 317-332, 2006.

BEDZIN'SKI, R.; KRZAK-ROS, J.; STEFAN'SKA, M.; MARUSZEWSK, K. Investigation of the bone tissue and implant surface interactions. **Strain**, v. 46, p. 518-525, 2010.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO-FILHO, G. Sistema músculo-esquelético. In:_____. **Bogliolo patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006. Cap 8, p. 476-521.

BOUXSEIN, M. L. Bone quality: where do we go from here? **Osteoporosis International**, v. 14, n. 5, p. 118-127, 2003.

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

BURG, J. J. K.; PORTER, S.; KELLAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering, **Biomaterials**, v. 21, p. 2347-2359, 2000.

CARNEIRO, E.; GARCIA, R. B.; OLIVEIRA, R. C.; MORAES, F. G.; MENEZES, R.; LETRA, H.; CANOVA, G. C.; CESTARI, T. M.; GRANJEIRO, J. M. Microscopic and radiographic analysis of the effect of particle size demineralized bovine cancellous bone matrix on the repair of the bone defects in femur of rabbits. **Journal of Applied Oral Science**, v. 13, n. 2, p.157-162, 2005.

CARTER, D. R.; SPENGLER, D. M. Biomechanics of fracture. In: SUMNER-SMITH, G. **Bone in clinical orthopedic**. 2. ed. Dübendorf: AO Publishing, 2002. p. 305-335.

CARVALHO, F. A. A. **Avaliação in vivo de matrizes tridimensionais de quitosana para a bioengenharia tecidual óssea**. 2008. 113 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.

CHANG, B. S.; LEE, C. K.; HONG, K. S.; YOUN, H. J.; RYU, H. S.; CHUNG, S. S.; PARK, K. W. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. **Biomaterials**, v. 21, p. 1291-1298, 2000.

COMPSTON, J. Bone quality: what is it and how is it measured? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 4, p. 579-585, 2006.

COUTINHO, D. F. The effects of chitosan on the *in vitro* biological performance of chitosan poly (butylenes succinates) blends. **Biomacromolecules**, v. 21, p. 100-128, 2008.

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.

DALAPÍCULA, S. S.; VIDIGAL JÚNIOR, 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.

DEMPSTER, D. W.; LINDSAY, R. A method for correlative light microscopy (LM) and scanning electron microscopy (SEM) of human iliac crest bone biopsies. **Bone**, v. 6, n. 5, p. 416, 1985.

DI MARTINO, A.; SITTINGER, C. M.; RISBUD, M. V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, v. 26, p. 5893-5990, 2005.

DORNBUSCH, P. T.; ARAÚJO, I. G. R.; TASQUETI, 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.

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.

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.

FELSENBERG, D.; BOONEN, S. The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. **Clinical Therapeutics**, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2005.

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.

FERREIRA, M. P. **Comparação do enxerto ósseo cortical autógeno e implante ósseo cortical alógeno liofilizado, congelado a – 70° C ou conservado no mel na substituição de segmento diafisário do fêmur de gatos domésticos**. 2008. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

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

FREITAS, S. H.; DÓRIA, R. G. S.; MENDONÇA, F. S.; EVENCIO NETO, J.; CAMARGO, L. M. Aspecto radiológico de heteroenxerto ósseo cortical fragmentado na reparação de falhas ósseas em coelhos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, n. 3, p. 107-110, 2008.

GARTNER, L.P.; HIATT, J. L.; NARCISO, M. S. Tecido ósseo. In: _____. **Atlas colorido de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. Cap. 3, p. 46-58.

GIAVARESI, G.; FINI, M.; CIGADA, A.; CHIESA, R.; RONDELLI, G.; MARTINI, C.; GIARDINO, R. Histomorphometric and microhardness assessment of sheep cortical bone surrounding titanium implants with different treatments. **Biomaterials**, v. 33, p. 1456-1562, 2003.

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.

GUTIERRES, M.; LOPES, M. A.; HUSSAIN, N. S.; CABRAL, A. T.; SANTOS, L. A. J. D. Substitutos ósseos: conceitos gerais e estado atual. **Arquivos de Medicina**, v. 19, n. 4, p. 153-162, 2006.

HAJE, D. P.; THOMAZINI, J. A.; VOLPON, J. B. Efeitos do processamento químico, da esterilização em óxido de etileno e da usinagem em parafusos de osso bovino: estudo com microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 42, n. 4, p. 120-124, 2007.

HAK, D. J. The use of a osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. **Journal of American Academy of Orthopedic Surgery**, v. 15, p. 525-536, 2007.

HAHN, J. A.; WITTE, T. S.; ARENS, D.; PEARCE, A.; PEARCE, S. Double-plating of ovine critical sized defects of the tibia: a low morbidity model enabling continuous in vivo monitoring of bone healing. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 12, n. 214, p. 1-6, 2011.

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.

HOLLINGER, J. O.; BUCK, D.; SCHMITZ, J. P. Quantitative light microscopy. A powerful tool to access bone. **Clinical Plastic Surgery**, v. 21, n. 3, p. 463-475, 1994.

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

HOOGLMOED, 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.

HUANG, Y. *In vitro* characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, p. 7616-7627, 2005.

ITO, K.; PERREN, S. M. Biologia e biomecânica da consolidação óssea. In: RÜEDI, T. P.; BUCKLEY, R. E.; MORAN, C. G. **Princípios AO do tratamento de fraturas**. Porto Alegre: Artmed, 2009. Cap. 1, p. 33-55.

ITOH, K. Y. Developments of an artificial vertebral body using a novel biomaterial hydroxyapatite/collagen composite. **Biomaterials**, v. 23, p. 3919-3926, 2002.

JUNG, U. W. Effects of chitosan membrane coated with polylactic and polyglycolic acid bone regeneration in rat calvarial defect. **Biomedical Materials**, v. 2, p. 102-105, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: _____. **Histologia básica: texto/atlas**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap. 8, p. 135-152.

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.

KIKUCHI, M. E. Selforganization mechanism in bone like hydroxyapatite/collagen nano composites *in vitro* and its biological reaction *in vivo*. **Biomaterials**, v. 22, p. 1905-1911, 2001.

KWEON, H. Y.; LEE, K. G.; CHAE, C. H.; BALAZI, C.; MIN, S. K.; KIM, J. Y.; CHOI, G. Y.; KIM, S. G. Developmente of nano-hydroxyapatite graft with silk fibroin sacffold as a new bone substitute. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 69, p. 1578-1586, 2011.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. Introdução. Sistema esquelético. Estudo dos ossos. In: _____. **Anatomia dos animais domésticos**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 4-14.

KULAK, C. A. M.; DEMPSTER, D. W. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 2, p. 87-98, 2010.

LANDINI, G. Color deconvolution using Image J® 2010. Disponível em: <<http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html>>. Acesso em: 23 jul. 2014.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LEONEL, E. C.; PORCIÚNCULA, H. F.; SOBRINHO, J. A.; RAMALHO, L. T. O.; MANGILLI, P. D.; RAPAPORT, A. Ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 4, p. 342-350, 2004.

LEONEL, E. C. F.; MANGILLI, P. D.; RAMALHO, L. T. O.; SOBRINHO, J. A. A importância da porosidade interna do polímero de mamona durante a neoformação óssea – Estudos em ratos. **Ciência Odontológica Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 19-25, 2003.

LI, J. C.; HUANG, B. L.; XU, Z. Q. Current situation and progress of bone histomorphometry studies in clinical bone diseases. **Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research**, v. 15, n. 35, p. 6607-6610, 2011.

LICHTE, P.; PAPE, H. C.; PUFE, T.; KOBBE, P.; FISCHER, H. Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. **International Journal of the Care of the Injure**, v. 42, n. 6, p. 569-573, 2011.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. Tecido ósseo e biomateriais. In:_____. **Tratado de periodontia e implantologia oral**. São Paulo: Guanabara Koogan. 2005. Cap. 3, p.34-47.

LIU, Y. L.; SCHOENAERS, J.; DE GROOT, K.; DE WIJN, J. R.; SCHEPERS, E. Bone healing in porous implants: a histological and histometrical comparative study on sheep. **Journal of Material Science: materials in medicine**, v. 11, p. 711-717, 2000.

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

LOUGHIN, C. A.; MARINO, D. J. Evaluation of thermographic imaging of the limbs of healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 1064-1069, 2007.

MAEDA, N. T. **Avaliação da neoformação óssea em tíbia de coelho utilizando cúpula de hidroxiapatita associada a diferentes biomateriais**. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2013.

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

MARKS, J. R.; CIELINSKI, M. J.; SUNDQUIST, K. T. Bone surface morphology reflects local skeletal metabolism. **Microscopy Research and Technique**, v. 33, p. 121-127, 1996.

MARTIN, R. M.; CORREA, P. H. S. Bone quality and osteoporosis therapy. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 2, p. 186-199, 2010.

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

MARTINI, L.; FINI, M.; GIAVARESI, G.; GIARDINO, R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. **Comparative Medicine**, v. 51, n. 4, p. 292-299, 2001.

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.

MATSUDA, M.; KITA, S.; TAKEKAWA, M.; OHTSUBO, S.; TSUYAMA, K. Scanning electron and light microscopic observations on the healing process after sintered bone implantation in rats. **Histology and Histopathology**, v. 10, p. 673-679, 1995.

MIGUEL, F. B. **Avaliação morfológica do comportamento de matrizes tridimensionais de colágeno aniônico na regeneração óssea em rato.** 2003. 151 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2003.

MOREIRA, A. S. B.; PASTORELLI, M. T.; DAMASCENO, L. H. F.; DEFINO, H. L. A. Estudo experimental da influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita na integração óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 240-250, 2003.

MOREIRA, P. L.; AN, Y. H.; SANTOS JUNIOR, A. R.; GENARI, S. C. *In vitro* analysis of anionic collagen scaffolds for bone repair. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 71, p. 229-237, 2004.

MOREIRA, R. C. **Avaliação da resistência mecânica à compressão axial da poliuretana de mamona e quitosana associada a cimento de fosfato de cálcio no preenchimento de falhas ósseas do terceiro metacarpiano de equinos.** 2014. 117 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

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 sílica nanopartocles as filling material of bone defect. In rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 56-62, 2012.

NOTODIHARDJO, F. Z.; KAKUDO, N.; SUZUKI, K.; KUSUMOTO, K. Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 40, p. 287-291, 2012.

NÓBREGA, F. S. **Avaliação da interação biológica entre o polímero de poliuretana 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.

NUSS, K. M. R.; AUER, J. A.; BOOS, A.; VON RECHENBERG, B. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bone. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 7, n. 67, p. 1-14, 2006.

OAKES, D.; LEE, C.; LIEBERMAN, J. An evaluation of the osteoinductive potential of human demineralized bone matrices in an attymic rat femoral defect model. In: ANNUAL MEETING OF ORTHOPEDIC RESEARCH SOCIETY, 47, 2001, San Francisco. **Anais...** [S.l: s.n], 2001, p. 25-28.

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.

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.

PÉREZ-SÁNCHEZ, M. J. Biomaterials for bone regeneration. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 15, n. 3, p. 517-522, 2010.

PÉREZ-SÁNCHEZ, M. J.; RAMÍREZ-GLINDON, E.; LLEDÓ-GIL, M.; CALVO-GUIRADO, J. L.; PÉREZ-SÁNCHEZ, C. Biomaterials for bone regeneration. **Materials Today**, v. 11, n. 5, p. 18-25, 2008.

PETRIZZI, L.; MARISCOLI, M.; VALBONETTI, L.; VARASANO, V.; LANGHOFF, J. D.; VON RECHENBERG, B. Preliminary study on the effect of parenteral naloxone,

alone and in association with calcium gluconate, on bone healing in an ovine “drill hole” model system. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 8, n. 43, p. 1-9, 2007.

PLECKO, M.; SIEVERT, C.; ANDERMATT, D.; FRIGG, R.; KRONEN, P.; KLEIN, K.; STÜBINGER, S.; NUSS, K.; BÜRKI, A.; FERGUSON, S.; STOECKLE, U.; VON RECHENBERG, B. Osseointegration and biocompatibility of different metal implants – a comparative experimental investigation in sheep. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 13, n. 32, p. 1-12, 2012.

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.

PUROHIT, R. C. Use of thermography in veterinary medicine. In: LEE, M. H. M.; COHEN, J. M. **Medicine and thermography**. La Vergne: Lightning Source. 2008. Cap. 13, p. 129-139.

PUROHIT, R. C.; TURNER, T. A.; PASCOE, D. D. Use of infrared imaging in veterinary medicine. In: DIADIKES, N. A.; BRONZINO, J. **Medical infrared imaging**. Philadelphia: Taylor & Francis Inc., 2003. Cap. 21, p. 1-7.

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.

REICHERT, J. M. Custom-made composite scaffolds for segmental defect. Repair in long bones. **International Orthopaedics**, v. 35, p. 1229-1236, 2011.

REZENDE, C. M. F.; BORGES, A. P. B.; BERNIS, W. O.; MELO, E. G.; NOBREGA NETO, P. I. Aspectos clínicos-cirúrgicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal de tíbia de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 5, p. 537-545, 1998.

RING, E. F.; AMMER, K. Infrared thermal imaging in medicine. **Physiological Measurement**, v. 33, n. 3, p. 33-46, 2012.

RISSELADA, M.; KRAMER, M.; DE ROOSTER, H.; TAEYMANS, O.; VERLEYEN, P.; VAN BREE, H. Ultrasonographic and radiographic assessment of uncomplicated

secondary fracture healing of long bones in dogs and cats. **Veterinary Surgery**, v. 34, p. 99-107, 2005.

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.

ROBERTS, W.; GARETTO, L. P. Fisiologia e metabolismo ósseos. In _____. **Implantes dentários contemporâneos**. São Paulo: Livraria Santos, 2000. Cap. 8, p. 225-237.

RODRIGUES, C. V. M.; SERRICELLA, P.; LINHARES, A. B. R.; GUERDES, R. M.; BOROJEVIC, R.; ROSSI, M. A. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, p. 4987-4997, 2003.

RUIFROK, A. C.; JOHNSTON, D. A. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. **CytoHistology**, v. 23, p. 291-199, 2008.

SAHAR, N. D.; HONG, S.; KOHN, D. H. Micro and nano structural analyses of damage in bone. **Micro**, v. 36, p. 617-629, 2005.

SÁNCHEZ, J. C.; TRAPERO, J. C.; LAFUENTE, J. C. G.; LÓPEZ, L. A. M.; MARTÍNEZ, A. B. Undecalcified bone samples: a description of the technique and its utility based on the literature. **Medicina y Patología Oral**, v. 10, p. 74-87, 2005.

SELIM, M. B. **Avaliação estrutural do osso terceiro metacarpiano equino frente à implantação de biopolímero a base de mamona**. 2014. 122 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

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.

SCHWEITZER, M. H.; AVCI, R.; COLLIER, T.; GOODWIN, M. B. Microscopic, chemical and molecular methods for examining fossil preservation. **Comptes Rendus Palevol**, v. 7, p. 159-184, 2008.

SEOL, Y. J. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 1037-1041, 2004.

SILVA, H. R. S. C. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SILVA, P. S. A.; DEL CARLO, R. J.; SERAKIDES, R.; MONTEIRO, B. S.; BALBINOT, P. Z.; ELEOTÉRIO, R. B.; PAEZ, O. L. A.; VILORIA, M. I. V. Plasma rico em plaquetas associado ou não ao osso esponjoso autógeno no reparo de falhas ósseas experimentais. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 129-134, 2009.

SPIN-NETO, R. **Desenvolvimento e aplicação de biomateriais a base de quitosana para reconstrução óssea: avaliação radiográfica e histológica**. 2008. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2008.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R. M.; MARCANTONIO, R. A. C.; MARCANTONIO-JÚNIOR, E. Biomateriais a base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da Unesp**, v. 37, n. 2, p. 155-161, 2008.

THEIN-HAN, W. W.; MISRA, R. D. K. Three-dimensional chitosan-nano hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomedical Materials and Devices**, v. 61, n. 9, p. 41-44, 2009.

UEBERSAX, L.; APFEL, T.; NUSS, K. M. R.; VOGT, R.; KIM, H. Y.; MEINEL, L.; KAPLAN, D. L.; AUER, J. A.; MERKEL, H. P.; VON RECHENBERG, B. Biocompatibility and osteoconduction of macroporous silk fibroin implants in cortical defects in sheep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, p. 107-118, 2013.

VAN LIESHOUT, E. M. M.; VAN KRALINGEN, G. H.; EL- MASSOUDI, Y.; WEINANS, H.; PATKA, P. Microstructure and biomechanical characteristics of bone substitutes for trauma and orthopaedic surgery. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 12, n. 34, p. 2-14, 2011.

VERTENTEN, G.; GASTHUYS, F.; CORNELISSEN, M.; SCHACHT, E.; VLAMINCK, L. Enhancing bone healing and regeneration: present and future perspectives in veterinary orthopaedics. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 23, n. 3, p. 153-162, 2010.

VIA TEAU, V.; GUILLEMIN, G.; BOUSSON, V.; OUDINA, K.; HANNOUCHE, D.; SEDEL, L.; LOGEART-AVRAMOGLU, D.; PETITE, H. Long-bone critical size defects treated with tissue-engineering grafts: a study on sheep. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 12, n. 7, p. 741-749, 2007.

VIATEAU, V.; GUILLEMIN, G.; YANG, C.; BENSÄID, W.; REVIRON, T.; OUDINA, K.; MEUNIER, A.; SEDEL, L.; PETITE. A technique for creating critical-size defects in the metatarsus of sheep for use in investigation of healing of long-bone defects. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 12, p. 1653-1657, 2004.

VON RECHENBERG, B. Experiences with sheep models in musculoskeletal research at the MSRU. **European Cells and Materials**, v. 16, n. 4, p. 31-33, 2008.

VON RECHENBERG, B.; GÉNOT, O. R.; NUSS, K.; GALUPPO, L.; FULMER, M.; JACOBSON, E.; KRONEN, P.; ZLINSZKY, K.; AUER, J. A. Evaluation of four biodegradable, injectable bone cements in an experimental drill hole model in sheep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, p. 130-138, 2013.

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

WAN, J. Y. Porous-conductive chitosan scaffolds for tissue engineering: in vitro and in vivo degradation. **Journal of Materials Science: materials medicals**, v. 16, p. 1017-1028, 2005.

WANG, X.; JIANBIAO, M. A.; YINONG, W.; BINGLIN, H. E. Bone repair in radii an tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. **Biomaterials**, v. 23, p. 4167-4177, 2002.

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

Anexos

ANEXO A

PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DO COMPÓSITO UTILIZADO NO ESTUDO

(Compósito cedido pela IQSC- USP)

Responsáveis: Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis e Virginia da Conceição Amaro Martins- Laboratório de Bioquímica

Preparação da Quitosana:

A quitosana foi obtida a partir de gládios de lula da espécie *Loligo* sp, cedidos por Miami Comércio e Exportação de Pescados Ltda (Cananéia – SP) e foi resultado de três etapas básicas de preparo. Primeiramente o gládio foi lavado, seco em estufa a 40°C, triturado e desmineralizado com solução de HCl 0,55 mol L⁻¹. Em seguida foi feita a desproteinização, através de um tratamento alcalino com uma solução de NaOH 0,3 mol L⁻¹, obtendo-se a β -quitina. Na etapa final, foi feita a desacetilação com NaOH 40%, obtendo-se a quitosana. O gel foi obtido por dissolução de quitosana 1% em ácido acético 1% [1].

Preparação do Colágeno

O colágeno foi extraído de tendão bovino que foi previamente lavado com solução de NaCl 0,9%, para remoção de sangue e contaminantes. O tendão limpo foi desfiado e tratado com uma solução alcalina [2] contendo hidróxidos, cloretos e sulfatos de K⁺, Na⁺ e Ca⁺⁺, por 96 h. Posteriormente, esta solução alcalina foi removida e foi adicionada uma solução aquosa dos mesmos cloretos e sulfatos de K⁺, Na⁺ e Ca⁺⁺. Os sais foram removidos por lavagens com H₃BO₃ 3%, água desionizada, EDTA 0,3% e novamente água desionizada. O colágeno foi extraído em uma solução de ácido acético pH 3,5, homogeneizado e em seguida desaerado. A concentração do gel foi de 1%, determinada por liofilização.

Preparação da Hidroxiapatita (HA)

A síntese da hidroxiapatita foi feita seguindo o método de JARCHO et al [3]. Preparou-se uma solução de Ca(NO₃)₂·4H₂O com pH entre 11,0 e 12,0 ajustado com

hidróxido de amônio concentrado (Solução I). Preparou-se a seguir uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ também com pH entre 11,0 e 12,0 (Solução II).

A solução de cálcio (Solução I) foi vigorosamente agitada e mantida sob fluxo constante de N_2 , sendo então adicionada, lentamente, a solução de fosfato (Solução II), produzindo uma suspensão com precipitado de forma gelatinosa, que permaneceu sob agitação durante 40 horas à temperatura ambiente, sempre sob fluxo constante de N_2 .

Após este tempo, deixou-se a suspensão foi decantada com posterior remoção do sobrenadante e o sólido resultante foi lavado com água deionizada várias vezes até que o pH do sobrenadante se tornasse constante. A suspensão de HÁ formada foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos a 20°C , filtrada e seca em estufa à 90°C durante um período de 24 horas. Após este período a HA foi triturada e separada em peneira obtendo-se partículas menores que 0,2 mm. O rendimento total do processo foi de 95%.

Preparação das matrizes

As matrizes foram feitas com solução de quitosana 1% e gel de colágeno 1,0% na proporção 1:3, respectivamente, homogeneizando-se por agitação mecânica. Após essa homogeneização adicionou-se hidroxiapatita na proporção 6:1, homogeneizando-se novamente. Cada cilindro foi obtido por 0,6 g do material formado e colocado em molde de teflon®, congelado e liofilizado. O material foi neutralizado em solução de NaHCO_3 , seguido de lavagens exaustivas com água desionizada, com posterior congelamento e liofilização.

Figura 1. Fotografia Digital do molde utilizado

Caracterização:

Os materiais foram caracterizados por:

Quitosana: grau de desacetilação por análise condutimétrica, análise termogravimétrica

Colágeno: Calorimetria exploratória diferencial, análise termogravimétrica.

HA: análise termogravimétrica, relação Ca/P por espectro de energia dispersiva de raio-x (EDX), Difração de raio-x.

Matriz: Microscopia eletrônica de varredura.

RESULTADOS

Os materiais foram caracterizados isoladamente após síntese ou obtenção. A quitosana foi caracterizada por condutimetria determinando-se o grau de desacetilação de 94% [1, 4].

A curva DSC do gel de colágeno liofilizado mostra a transição térmica referente à desnaturação (T_d) do colágeno. O valor de T_d obtido foi de 45°C indicando que a hélice tripla do colágeno permanece íntegra, uma vez que para colágeno desnaturado, ou seja, gelatina, não há transição térmica na faixa de temperatura estudada [5].

O padrão de difração de raio-X para HA após a secagem a 90°C (Figura 2) mostra os picos principais com valores de d 1,84, 2,72, 2,81 e 3,43 Å, que correspondem aos descritos para HA [HA, JCPDS 9-0432]. O alargamento dos picos são uma indicação de uma cerâmica com baixa cristalinidade. A análise por dispersão de raio-X (EDX) foi feita para se verificar a relação cálcio e fósforo (Ca/P) que foi determinada como sendo de 1,49, caracterizando uma HA deficiente em cálcio.

Figura 2. Espectro de difração de Raio-X de HA obtida.

As curvas TG (Figura 3) para os biopolímeros apresentaram três eventos aos quais são relacionados à perda de água, a decomposição e a carbonização. O primeiro entre 25 e 200 °C é relacionado ao conteúdo de água presente. O segundo na faixa de 200-400 °C é devido à degradação da estrutura polimérica e o terceiro estágio ocorre na faixa de 400-650 °C, relacionado à decomposição dos compostos e carbonização [2]. A HA não apresenta variações de perda de massa já que é estável até 1200°C [6].

Figura 3. Curvas termogravimétricas para colágeno liofilizado (—), quitosana (—) e hidroxiapatita (—).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostra as partículas de HA homogeneamente distribuídas na matriz composta pelos dois biopolímeros (colágeno e quitosana), como pode ser observado pela Figura 4.

Figura 4. Fotomicrografia por MEV para a matriz de colágeno/quitosana/HA, com aumentos de: **(A)** 500x e **(B)** 5000x.

REFERÊNCIAS

- [1] HORN, M.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G., **Carbohydr. Polym.**, v. 77, p. 239, 2009.

- [2] BATISTA, T.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G. Thermal behavior of in vitro mineralized anionic collagen matrices. **J. Therm Anal. Calorim.**, v.95(3), p. 945-949, 2009.
- [3] JARCHO, M. et al. Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form, **J. Mat. Sci.**, p.2027-2035, 1976.
- [4] TORRES, M. A.; VIEIRA R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente, **Polímeros: ciência e Tecnologia**, v.15, n.4, p.306-312, 2005.
- [5] FLANDIN, F.; BUFLEVANT, C.; HERBAGE, D. Differential scanning calorimetry analysis of the age-related changes in the thermal stability of rate skin collagen. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 791, p. 205-211, 1984.
- [6] MARKOVIC, M.; FOWLER, B. O.; TUNG, M. S. J. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. **J. Research of the National Institute of Standards and Technology**, v. 109, p. 553-568, 2004.

Apêndices

APÊNDICE A

FICHA DE AVALIAÇÃO DE ESCORE DAS IMAGENS RADIOGRÁFICAS

Colunas1	Colunas2	Colunas3	Colunas4	Colunas5	Colunas6	Colunas7	Colunas8	Colunas9
	MTD D7	MTD D14	MTD D21	MTD D28	MTD D35	MTD D42	MTD D49	MTD D56
Ovelha 1								
Ovelha 2								
Ovelha 3								
Ovelha 4								
Ovelha 5								
Ovelha 6								

Colunas1	Colunas2	Colunas3	Colunas4	Colunas5	Colunas6	Colunas7	Colunas8	Colunas9
	MTE D7	MTE D14	MTE D21	MTE D28	MTE D35	MTE D42	MTE D49	MTE D56
Ovelha 1								
Ovelha 2								
Ovelha 3								
Ovelha 4								
Ovelha 5								
Ovelha 6								

Referência utilizada para determinação de escores - Adaptado de (Silva et al, 2009).

- 1- Falhas com preenchimento entre 0 e 25%.
- 2- Falhas com preenchimento entre 25% e 50%.
- 3- Falhas com preenchimento entre 50% e 75%.
- 4- Falhas com preenchimento entre 75% e 100%.

APÊNDICE B

FICHA DE AVALIAÇÃO DE ESCORE DAS IMAGENS ULTRASSONOGRÁFICAS

Colunas1	Colunas2	Colunas3	Colunas4	Colunas5	Colunas6	Colunas7	Colunas8	Colunas9
	MC DIR A	MC DIR B	MC DIR C	MC DIR D	MC DIR E	MC DIR F	MC DIR G	MC DIR H
Ovino 1								
Ovino 2								
Ovino 3								
Ovino 4								
Ovino 5								
Ovino 6								

Colunas1	Colunas2	Colunas3	Colunas4	Colunas5	Colunas6	Colunas7	Colunas8	Colunas9
	MC ESQ A	MC ESQ B	MC ESQ C	MC ESQ D	MC ESQ E	MC ESQ F	MC ESQ G	MC ESQ H
Ovino 1								
Ovino 2								
Ovino 3								
Ovino 4								
Ovino 5								
Ovino 6								

Classificação de score segundo Thurmuller et al. (2002)

0- Completa passagem de 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 margem parcialmente obscuras (mais de 50 % de material ecogênico);

3- Não há passagem de ondas pela falha óssea (100% de material ecogênico)

APÊNDICE C

PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DESTINADAS À MOL

Após a coleta dos fragmentos ósseos, os mesmos foram acondicionados em recipientes contendo fixador a base de paraformaldeído a 20% em tampão de fosfato monobásico anidro a 0,1 M e fosfato dibásico a 0,1 M. A fixação se deu por um período de 48 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os espécimes foram desidratados através da manutenção em solução de álcool a 70% por um período de 24 horas, e 3 ciclos de imersão em álcool absoluto por 24, 48, 56 horas respectivamente, com troca de solução a cada dois ciclos.

Posteriormente a desidratação, foi realizada a diafanização, para a retirada de impurezas da amostra do fragmento ósseo, através de imersão em xilol por um período de 24 horas. Passado esse período o xilol foi substituído por novo e as amostras permaneceram imersas por um período de mais 48 horas na nova solução.

Cada amostra foi, então incluída em resina (metilmetacrilato) em frascos de vidro de aproximadamente 10 ml. Os frascos serviram como molde para inclusão do material, tendo sido quebrados após a polimerização da resina para a obtenção dos blocos.

Cada bloco foi aparado com o auxílio de uma serra manual para que ficasse em formato de paralelepípedo e pudesse ser fixado às garras do micrótomo EKAKT BANSYSTEM 300 CP. O micrótomo produziu cortes em espessura de aproximadamente 0,5 mm, os quais foram desgastados com lixas de carbetto de silício de granulações 320, 600, 1000, 2400 e 4000 antes de serem colados em lâminas de acrílico transparente de 2 mm de espessura.

Cada lâmina teve seu respectivo corte desgastado na mesma sequência de lixas após a colagem. Depois de prontas, as lâminas foram coradas seguindo o protocolo de coloração de Stevenel's Blue:

- Manutenção das lâminas em cubeta contendo solução de Stevenel's Blue a 60°C por 15 minutos;
- Lavagem das lâminas com água destilada a 60°C e secagem com ar;
- Pipetar pequena quantidade da solução de Alizarina Vermelha na superfície das lâminas e deixar corar por 5 minutos à temperatura ambiente;

- Enxaguar as lâminas em água destilada corrente para remover o excesso de corante e secagem com ar.

Solução de Stevenel's Blue:

- Solução A:

75 ml de água destilada

1,0 g de azul de metileno

- Solução B:

75 ml de água destilada

1,5 g de permanganato de potássio

Misturar as soluções A e B e aquecer a solução final até que o precipitado se dissolva completamente. Aguarde a solução esfriar, filtre e armazene.

Solução de Alizarina Vermelha:

75 ml de água destilada

2,0 g de Alizarina Vermelha S

Diluir a alizarina na água destilada morna (aproximadamente a 45°C), agitando sempre. Aguardar a solução esfriar, ajustar o pH para valores entre 4,1 e 4,3 com solução de hidróxido de amônia e armazenar.

APÊNDICE D

PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DESTINADAS À MEV

Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em recipientes contendo fixador à base de glutaraldeído a 25%, 2,5% de paraformaldeído a 20% em tampão fosfato a 0,1 M e pH 7,2. As amostras foram submetidas à rotação por um período de 4 horas no aparelho Infiltron Tissue Rotator (Ted Pella, Inc.) para melhor penetração da solução fixadora nas espécimes. Após, foram imersas em nova solução fixadora e mantidas *overnight* a 4 °C.

No dia seguinte procedeu-se a lavagem das mesmas para a retirada de fixador através de 6 ciclos de rotação de 10 minutos cada em água MiliQ, substituída a cada ciclo.

Depois da remoção do fixador, foi necessária a remoção do material orgânico das amostras. Para tanto, elas foram mantidas em solução de NaOCl (hipoclorito de sódio) em rotação por 3 horas, e depois submetidas a agitação ultrassônica de 3 minutos no aparelho Branson 1210.

A remoção da solução de hipoclorito de sódio foi feita através de 6 ciclos de lavagem em água MiliQ em rotação, seguidos de dois ciclos, um de 1 e outro de 2 minutos, no aparelho de ultrassom. A água foi trocada a cada ciclo.

O próximo passo foi a desidratação das amostras através da manutenção das mesmas por cerca de 5 minutos em soluções de concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 80, 90 95%). A última etapa da desidratação consistiu na manutenção das amostras em etanol absoluto por dois ciclos de 10 minutos cada, com a troca do etanol entre eles.

Os espécimes foram então retirados da solução de etanol absoluto e colocados em contato com papel absorvente para a retirada do excesso de líquido, não sendo completamente secos. Na sequência, foram tratados em hexametildisilazano (HMDS) por 10 minutos, por dois ciclos consecutivos, com a substituição da solução entre eles. Retiraram-se os fragmentos ósseos desta solução e procedeu-se a sua secagem em papel absorvente e manutenção dos mesmos à temperatura ambiente por 48 horas para a completa secagem.

Depois de secos, os fragmentos foram fixados a pequenos suportes de alumínio (*stubs*) com fita dupla face e cobertos com uma camada de

aproximadamente 25 nm de ouro em um aparelho Bal-Tec SCD 050 (Scotia, NY, USA). Em seguida, foram examinados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura LEO (LEO, Germany).