NICOLE FIDALGO PARETSIS

**Avaliação da regeneração óssea por métodos de imagem, a partir
de falhas segmentares preenchidas com biomaterial,
em tíbia de ovinos**

São Paulo

2020

NICOLE FIDALGO PARETSIS

**Avaliação da regeneração óssea por métodos de imagem, a partir
de falhas segmentares preenchidas com biomaterial,
em tibia de ovinos**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. André Luis do Valle De Zoppa

De acordo:

Orientador

São Paulo
2020

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3972
FMVZ

Fidalgo Paretsis, Nicole
Avaliação da regeneração óssea por métodos de imagem, a partir de falhas segmentares preenchidas com biomaterial, em tibia de ovinos / Nicole Fidalgo Paretsis. – 2020.
127 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

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

1. Ortopedia. 2. Biomateriais. 3. Densitometria. 4. Termografia. 5. Ultrassonografia. I. Título.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da regeneração óssea por métodos de imagem, a partir de falhas segmentares preenchidas com biomaterial, em tibia de ovinos", protocolada sob o CEUA nº 2720010716 (ID 004549), sob a responsabilidade de **André Luís do Valle de Zoppa e equipe; Nicole Fidalgo Paretsis** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 22/02/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of bone healing in tibial segmental defect with biomaterial in sheep model using imaging methods", utilizing 19 Ovines (19 females), protocol number CEUA 2720010716 (ID 004549), under the responsibility of **André Luís do Valle de Zoppa and team; Nicole Fidalgo Paretsis** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 02/22/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **11/2016** a **04/2017**

Área: **Clínica Cirúrgica Veterinária**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Ovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **3 a 4 anos**

N: **19**

Linhagem: **Suffolk**

Peso: **45 a 65 kg**

Local do experimento: Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

São Paulo, 12 de agosto de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PARETSIS, Nicole Fidalgo

Título: **Avaliação da regeneração óssea por métodos de imagem, a partir de falhas segmentares preenchidas com biomaterial, em tíbia de ovinos**

Tese 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 Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese aos meus pais **Eleutério Paretsis** e **Márcia Fidalgo Paretsis** que desde sempre me forneceram o apoio fundamental para tornar possível esta e todas as conquistas da minha vida.*

*Aos meus irmãos **Mariana Fidalgo Paretsis**, **Georgios Fidalgo Paretsis** e **Barbara Fidalgo Paretsis**, cada um com seu jeito único, me seguram, estimulam e amparam desde sempre.*

*A todos os **amigos** que vibram o bem e deixam a caminhada mais leve e divertida.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. André Luis do Valle De Zoppa pela oportunidade de continuar minha formação. À confiança, à liberdade e à permissão de elaborar e executar uma tese de doutorado com desafios bem-aventurados. Sua calma e confiança dada a mim durante as decisões do estudo me fizeram crescer como pessoa e como profissional.

Aos integrantes do projeto Dra. Geissiane Marcondes, Maria Raquel Bellomo, Anderson Souza, acolhendo e executando diferentes fases do projeto fundamentais para que fosse possível a realização. Sem esquecer da Profa. Dra. Silvia Cortopassi e do anestesista Msc. Mario Antônio Ferraro Rego. A personalidade de cada um deixou o estudo mais leve e divertido, sem perder prazos ou falhar na metodologia proposta.

Ao Prof. Dr. Victor Arana-Chavez, que continuou na minha formação com conselhos e auxiliou nas análises da microscopia eletrônica de varredura no laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para processamento e leitura. Essas etapas do estudo foram plausíveis devido a ajuda impecável e a habilidade da Elis Chien.

Aos professores do Serviço de Diagnóstico por Imagem do Departamento de Cirurgia da FMVZ - USP, Profa. Dra. Carla Aparecida Batista Lorigados e Prof. Dr. Stefano Carlo Filippo Hagen que me receberam sem hesitar e me orientaram em todas as fases do projeto, desde o planejamento, execução e análises dos exames ultrassonográficos e radiográficos. Estes aprendizados foram fundamentais para a tese e a vida profissional.

A Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis e a Dra. Virgínia Conceição Amaro Martins pela produção do biomaterial de estudo, parceria, ensinamentos e a disponibilidade prestada desde 2014 com o grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luis Claudio Lopes da Silva pelo empréstimo da máquina de termografia, por participar ativamente da minha formação na pós-graduação, me integrando em diferentes projetos e sugestões apontadas na qualificação.

À Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, assim como a Dra. Joice Fullber pelo processamento das células-tronco utilizadas no experimento e disponibilidade para execução do estudo.

À Profa. Dra. Carla Belli com sugestões pertinentes apontadas antes da execução do projeto na qualificação.

À Msc. Mariana Baroni Selim pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade para me introduzir nas análises de densitometria.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Romero Corrêa que me ingressou no mundo acadêmico e me ensinou o significado da palavra persistência. Agora mais distante, mas não menos importante, me aconselha sempre que possível.

A todos os colegas de trabalho da Universidade Anhembi Morumbi, representados pelos professores que trabalham diretamente comigo: Dra. Renata Caminha Gomes, Msc. Gabriela Machioni, Msc. Paolo Neandro Bona Soares, Dr. Roberto Foz e Dra. Angélica Trazzi. A paciência, conselhos e adaptações da nossa rotina permitiram a realização deste trabalho.

À minha referência, amigo, chefe e Professor Dr. Neimar Vanderlei Roncati, que participa da minha formação como ser humano e como médica veterinária há mais de 10 anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio Pesquisa, processo nº 2016/21997-1 para a execução do estudo.

Aos animais dedicados a experimentação animal. Em destaque aos ovinos utilizados nestes experimentos no qual sou eternamente grata.

A todos os animais que tive e tenho a oportunidade de conviver, ajudar e aprender todos os dias devido a minha profissão que tanto admiro.

A Deus, por tudo

“A natureza não faz nada em vão”

Aristóteles

RESUMO

PARETSIS, N.F. **Avaliação da regeneração óssea por métodos de imagem, a partir de falhas segmentares preenchidas com biomaterial, em tíbia de ovinos.** [*Evaluation of bone healing in tibial segmental defect with biomaterials in sheep model using imaging methods*]. 2020. 127 f. Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Os biomateriais biodegradáveis utilizados na ortopedia são desenvolvidos como adjuvantes à regeneração óssea. A associação de células-tronco a estes biomateriais vem sendo foco de estudos para potencializar esta função. Para avaliação destes substitutos ósseos há necessidade de uma série de análises multidisciplinares que envolvem desde a produção do biomaterial até a reação do organismo perante sua presença. O uso de métodos para o entendimento do processo de regeneração óssea envolve comumente os exames de imagem associados a avaliação física do paciente. Na rotina veterinária, a reparação óssea e a conduta do caso são norteadas preferencialmente por exames não invasivos para que estes não interfiram no reparo ósseo e consequentemente na cura do paciente. Acredita-se que este trabalho contribuiu para o entendimento da regeneração óssea a partir de um material exógeno (o biomaterial de estudo) através dos exames de imagem, considerados fundamentais para a rotina ortopédica. O objetivo deste trabalho foi avaliar por densitometria (convencional e digital), termografia (T), ultrassonografia (US) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), a regeneração óssea por 90 dias (D), a partir do implante de biomaterial composto de hidroxiapatita, quitosana e nanotubo de carbono. Para isso, foi realizado defeito crítico na tíbia em 18 ovelhas adultas, divididas em três grupos: grupo controle (GC), grupo com implante de biomaterial (BIO) e grupo com implante de biomaterial associada à célula-tronco (CT). O efeito tempo X grupo foi significativo na densitometria convencional com medidas menores em 60 e 90 dias do GC comparado do BIO e CT, e aumento significativo após 30 dias em todos os grupos. A análise de correlação revelou associação significativa e positiva entre as densitometrias digital e convencional. Quanto ao preenchimento do conteúdo da falha por US, nos momentos 30, 60 e 90 dias os valores para os grupos BIO e CT foram maiores em relação ao GC. O BIO apresentou valores menores em relação aos grupos GC e CT nos sinais *doppler* por US. Nos bordos da falha óssea por US, no grupo CT foi observada maior frequência de arredondamento dos bordos sem proliferação óssea comparado ao BIO e GC aos 90 dias. Na T o CT foi superior ao GC no efeito

grupo. Ao longo do tempo, foi observado aumento de temperatura a partir de 15 dias de pós-operatório nos três grupos, seguido por uma diminuição e estabilização das medidas em D30 e D60 respectivamente. Na MEV foi observada boa interação entre o tecido neoformado, o remanescente e o biomaterial. Conclui-se que o processo de regeneração óssea se encontrava em fase de reparo aos 90 dias. Não houve diferenças expressivas entre os grupos BIO e CT, os quais apresentaram comportamento favorável ao processo de regeneração até o período estudado.

palavras-chave: Ortopedia. Biomateriais. Densitometria. Termografia. Ultrassonografia.

ABSTRACT

PARETSIS, N.F. **Evaluation of bone healing in tibial segmental defect with biomaterials in sheep model using imaging methods.** [*Avaliação da regeneração óssea por métodos de imagem, a partir de falhas segmentares preenchidas com biomaterial, em tíbia de ovinos*]. 2020. 127 f. Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Biodegradable biomaterials are used in orthopedic surgery to assist bone regeneration. The ability of stem cell/biomaterial combinations to promote bone healing has been investigated in several studies. Proper evaluation of bone substitutes requires a comprehensive approach, including investigation of manufacturing practices and analysis of body responses to biomaterial implantation. In order to prevent potential interferences with bone repair and patient recovery, non-invasive methods are often selected to investigate bone healing and guide medical interventions in veterinary practice. This study was designed to investigate bone healing following implantation of a biomaterial composed of hydroxyapatite, chitosan and carbon nanotube. Bone healing assessment was based on data derived from imaging modalities traditionally used in orthopedic practice. A critical bone defect was created in the tibia of 18 adult female sheep. Animals were allocated to one of three groups: control group (CG), biomaterial group (BIO) and stem cell/biomaterial group (SC). Conventional and digital densitometry, thermography (T), ultrasonography (US) and scanning electron microscopy (SEM) were used to assess bone healing at 30, 60 and 90 days. Conventional densitometry revealed a significant group by time interaction effect, with lower values in the control relative to the BIO and the SC group at 60 and 90 days and significantly higher values after day 30 in all groups. Correlation analysis revealed significant positive associations between conventional and digital densitometry. Sonographic assessment revealed higher bone defect healing rates in the BIO and the SC relative to the control group at 30, 60 and 90 days. Doppler signals were more intense in the BIO relative to the control and the SC group. Sonographic images of bone defect margins revealed higher frequency of rounded margins and lack of bone proliferation in the SC relative to the BIO and the control group at 90 days. Thermography revealed higher temperatures in the SC relative to the control group. Temperatures increased in all groups after postoperative day 15, then decreased and remained unchanged (30 and 60 days respectively). Scanning electronic microscopy

revealed good interactions between bone tissue, newly formed bone and the selected biomaterial. In conclusion, findings of this study suggest the bone regeneration process was in the repair phase at 90 days. There were no significant differences between BIO and SC groups. In both groups, findings were consistent with satisfactory bone healing over the course of 90 days. This study was thought to make significant contributions to the understanding of biomaterial-assisted bone healing.

keywords: Orthopedics. Biomaterials. Densitometry. Thermography. Ultrasonography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Procedimento cirúrgico para realização da falha óssea segmentar de 30 mm e osteossíntese.....	49
Figura 2 - Colocação da membrana amniótica no grupo controle e nos grupos com a presença do biomaterial	50
Figura 3 - Biomaterial de estudo em formato de tarugo umedecido com células mesenquimais de ovino	51
Figura 4 - Bandagens utilizadas no pós-operatório.....	53
Figura 5 - Imagens radiográficas do pré-operatório e pós-operatório imediato do grupo controle.....	55
Figura 6 - Imagens radiográficas do pré-operatório e pós-operatório imediato dos grupos com implante de biomaterial	56
Figura 7 - Ilustração da imagem sendo processada no Image J 1.48v®	57
Figura 8 -Ilustração da imagem sendo processada no e-filmTM.....	58
Figura 9 - Imagem da avaliação termográfica	61
Figura 10 - Fragmento ósseo coletado após eutanásia - São Paulo.....	62
Figura 11 - Projeção mediolateral da tíbia com a presença do biomaterial de estudo	65
Figura 12 - Estudo completo de um ovino do grupo biomaterial	66
Figura 13 - Estudo completo de um ovino do grupo biomaterial associado à célula-tronco	67
Figura 14 - Estudo completo de um ovino do grupo controle	68
Figura 15 - Janela ultrassonográfica em corte longitudinal do grupo biomaterial	73

Figura 16 - Imagem ultrassonográfica de corte longitudinal, grupo biomaterial.....	74
Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura nos fragmentos obtidos do grupo controle.....	82
Figura 18 - Microscopia de varredura do grupo com biomaterial	82
Figura 19 - Interação do biomaterial, tecido remanescente e tecido neoformado no grupo biomaterial por microscopia eletrônica de varredura	83
Figura 20 - Fragmentos obtidos das amostras do biomaterial associado à célula-tronco	84
Figura 21 - Biomaterial após 90 dias de implante e biomaterial esterilizado e processado para análise	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão das densitometrias digital e convencional de acordo com os grupos e efeitos principais.....	69
Tabela 2 - Média e desvio-padrão da densitometria convencional de acordo com os grupos e tempos	70
Tabela 3 - Média e desvio padrão da densitometria convencional e densitometria digital de acordo com os tempos.....	71
Tabela 4 - Mediana (valores mínimo/máximo) do “conteúdo da falha” e “sinais <i>doppler</i> ” de acordo com os grupos e avaliadores	75
Tabela 5 - Frequência das alterações nos “bordos da falha” de acordo com os grupos e tempos do avaliador 1	77
Tabela 6 - Frequência das alterações nos “bordos da falha” de acordo com os grupos e tempos do avaliador 2	77
Tabela 7 - Média e desvio padrão das temperaturas máxima, mínima e média da termografia de acordo com os grupos e efeitos principais.....	79
Tabela 8 - Média e desvio-padrão das temperaturas máxima, mínima e média da termografia de acordo com os grupos e tempos	80
Tabela 9 - Média e desvio padrão das temperaturas máxima, mínima e média da termografia de acordo com os tempos.....	81

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Média e desvio-padrão da densitometria de acordo com os grupos.....	69
Gráfico 2 - Média e desvio-padrão da densitometria convencional de acordo com os grupos experimentais	70
Gráfico 3 - Média e desvio-padrão da densitometria digital (DD), e densitometria convencional (DC), de acordo com os tempos.....	71
Gráfico 4 - Associação entre a densitometria digital e convencional usando modelo para medidas repetidas	72
Gráfico 5 - Mediana e intervalo interquartil do “conteúdo da falha” de acordo com os grupos e avaliadores	75
Gráficos 6 - Mediana e intervalo interquartil dos “sinais <i>doppler</i> ” de acordo com os grupos e avaliadores	76
Gráfico 7 - Frequência das alterações nos “bordos da falha” de acordo com os grupos e avaliador 1 no D90.....	78
Gráfico 8 - Média e desvio padrão das temperaturas máxima, mínima e média da termografia de acordo com os grupos e efeito principal de grupo.....	79
Gráfico 9 - Média e desvio-padrão da temperatura média, mínima e máxima obtidas	80
Gráfico 10 - Média e desvio padrão das temperaturas máxima, mínima e média da termografia de acordo com os tempos.....	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação quanto ao conteúdo da falha óssea.....	59
Quadro 2 - Classificação quanto aos bordos da falha óssea.....	59
Quadro 3 - Classificação quanto ao sinal ultrassonográfico <i>power doppler</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS

BIO - Grupo com biomaterial

CT - Grupo com biomaterial associada à célula-tronco

DC - densitometria convencional

DD - densitometria digital

DICOM - Digital Imaging and Communications in Medicine

EGF - Fator de crescimento epidérmico

GC - Grupo Controle

HA - hidroxiapatita

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL-4 - interleucina 4

jpeg - Joint Photographics Experts Group

kHz - quilo-hertz

LCP - *Locking Compression Plate*

mHz - mega hertz

PBS - tampão fosfato salino

PRF - Frequência de repetição de pulso

PRP - Plasma rico em plaquetas

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

TGF- β 1 - Fator de crescimento transformador beta 1

TNF- α - Fatores de Necrose Tumoral Alfa

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

cm - centímetro

CO₂ - gás carbônico

g - grama

i.v. - intravenosa

Kg - kilo

Kv - quilovolts

l - litro

mAs - miliamperes por segundo

mg - miligrama

ml - mililitro

mm - milímetros

nm - nanômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	BIOMATERIAIS BIODEGRADÁVEIS NA ORTOPEDIA	27
2.1.1	Hidroxiapatita	28
2.1.2	Quitossana	29
2.1.3	Nanotubo de carbono.....	30
2.1.4	Associação biomaterial e célula-tronco.....	31
2.2	MODELO EXPERIMENTAL PARA TECIDO ÓSSEO	33
2.3	IMAGINOLOGIA NA ORTOPEDIA.....	34
2.3.1	Aspecto da imagem no processo de regeneração óssea.....	34
2.3.2	Estudo Radiográfico e Densitometria	35
2.3.3	Estudo Ultrassonográfico.....	38
2.3.4	Estudo Termográfico.....	39
2.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	41
3.	OBJETIVOS	42
3.1	OBJETIVO GERAL	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4	HIPÓTESES	43
5	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	44
6	MATERIAL E MÉTODO.....	45
6.1	ANIMAIS	45
6.2	BIOMATERIAL	45
6.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	46
6.3.1	Coleta e implante de Célula-Tronco	46
6.3.2	Procedimentos Anestésico e Cirúrgico	47
6.4	AVALIAÇÃO	52

6.4.1 Exame clínico	52
6.4.2 Avaliação Densitométrica	53
6.4.3 Avaliação Ultrassonográfica	58
6.4.4 Avaliação Termográfica	60
6.5 ESTATÍSTICA	52
7. RESULTADOS.....	64
7.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E EXAME FÍSICO	64
7.2 ASPECTOS RADIOGRÁFICOS E ANÁLISE DENSITOMÉTRICA	64
7.2.1 Exame radiográfico frente ao biomaterial.....	64
7.2.2 Análise densitométrica	68
7.3 ANÁLISE ULTRASSONOGRÁFICA	72
7.3.1 Análise ultrassonográfica frente o biomaterial	72
7.3.2 Análise por escore ultrassonográfico	74
7.4 AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA	78
7.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	81
8 DISCUSSÃO.....	86
8.1 ASPECTOS GERAIS DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E EXAME FÍSICO	86
8.2 ASPECTOS GERAIS DOS MÉTODOS DE IMAGEM FRENTE AO BIOMATERIAL	86
8.3 ASPECTOS RADIOGRÁFICOS E DENSITOMETRIA.....	87
8.4 ASPECTOS ULTRASSONOGRÁFICOS E AVALIAÇÃO POR ESCORE	88
8.5 TERMOGRAFIA.....	90
8.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	91
9. CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS	102
APÊNDICES	102
ANEXOS	120

1 INTRODUÇÃO

Os exames complementares são fundamentais para a rotina da clínica médica e cirúrgica veterinária, principalmente os exames de imagem utilizados para confirmar ou excluir possibilidades diagnósticas, realizar estadiamento, assistência e prognóstico de diferentes afecções (FEITOSA, 2013). Na ortopedia, os exames de imagem são requeridos desde o planejamento pré-cirúrgico, durante o transoperatório e no período pós-operatório, auxiliando também nas condutas terapêuticas e no manejo do paciente (ANDRADE et al., 2010; STICK, 2012).

Em grandes animais, a reparação de fraturas é desafiadora devido às condições de atendimento, o tamanho dos animais e seu temperamento (CARSTANJEN; SIEWRUK; GAJEWSKI, 2012). Atualmente, o avanço da ciência e tecnologia possibilitam que alguns tipos de fraturas tenham condições de resolução fornecendo qualidade de vida para o animal (ROSA; DEARO, 2013).

Os biomateriais compósitos podem ser naturais ou sintéticos, constituídos por dois ou mais materiais distintos com propriedades física e química significativamente diferentes. A biocompatibilidade deste compósito depende da interação dos diferentes constituintes no organismo (AUER et al., 2012).

O biomaterial ideal para substituir o tecido ósseo deve atender requisitos como ser biocompatível, osteocondutor, osteoindutor, estruturalmente semelhante ao tecido ósseo, apresentar alguma resistência mecânica e fácil de manusear (FERNANDEZ DE GRADO et al., 2018). Os substitutos ósseos biodegradáveis são desenvolvidos com o objetivo de formar tecido ósseo com qualidade e quantidade em tempo determinado. Para desenvolver e avaliá-los é necessária análise multidisciplinar, no qual envolve desde o aspecto físico-químico, conformação estrutural do biomaterial e diferentes métodos para avaliar a interação biológica *in vitro* e *in vivo* (NAVARRO et al., 2008).

A hidroxiapatita, a quitosana e o nanotubo de carbono são materiais já utilizados na regeneração óssea (FONSECA-GARCÍA et al., 2014; TÜRK et al., 2018). A associação de biomateriais com células-tronco provenientes de medula óssea apresenta grande potencial para melhorar a reparação tecidual (FERNANDES et al., 2014; HOWLADER et al., 2017).

Perante os desafios da regeneração óssea em animais de grande porte, optou-se neste trabalho por avaliar através da imagem, a reparação óssea mediante um compósito a base de nanotubo de carbono, quitosana e hidroxiapatita. Considerando o conceito que diferentes métodos de imagem podem contribuir para a avaliação do reparo ósseo (AUER; STICK, 2012; RAHIMZADEH et al., 2012), foram utilizados o exame radiográfico representado pela densitometria, a termografia e o exame ultrassonográfico.

Dois métodos de densitometria foram utilizados neste estudo, o primeiro considerado a densitometria convencional com um *phantom* (penetrômetro) como referência (GOBESSO et al., 2014; SELIM et al., 2018), e outro obtido por um *software*, intitulado como densitometria digital. Estes métodos foram comparados nas mesmas imagens para testar coerência das informações.

Com o exame ultrassonográfico, os animais foram acompanhados durante o período determinado a procura de sinais para avaliar o processo de reparação. Foram coletadas imagens no modo *power doppler* com o intuito de avaliar vascularização neste período (AUGAT et al., 2014). Devido à utilização de um material exógeno, a termografia foi incluída no experimento para observar eventual manifestação do processo inflamatório (BARGIEL et al., 2019). Ainda, para complementar as informações obtidas, foi utilizada a análise por microscopia eletrônica de varredura após 90 dias do biomaterial ser implantado (PAN et al., 2012; SELIM et al., 2018).

Pressupõe-se que este trabalho colabore com o entendimento da regeneração óssea com auxílio de um biomaterial biodegradável, através dos métodos de imagem.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOMATERIAIS BIODEGRADÁVEIS NA ORTOPEDIA

Os biomateriais utilizados em ortopedia devem permitir uma correta integração entre o biomaterial e o sistema ósseo remanescente, de modo que a integridade e a funcionalidade do conjunto possam ser mantidas. Entre eles podem-se citar ligas metálicas, polímeros, cerâmicas e compósitos (RODRIGUES, 2013). Sabe-se que os biomateriais não devem ter como função apenas o preenchimento de espaço, mas sim estimular uma resposta biológica específica, que depende de uma série de particularidades intrínsecas do biomaterial (KUBINOVÁ S.; SYKOVÁ E., 2010; MUNHOZ et al., 2014).

Biomateriais de origem natural podem ser utilizados, como por exemplo, o osso autólogo, matrizes ósseas derivadas de animais ou até mesmo exoesqueletos que oferecem estruturas semelhantes ao osso e mimetizam o ambiente fisiológico do tecido. Entretanto, quando usados sozinhos, muitas vezes, não apresentam propriedades osteoindutivas, porém orientam o tecido a ser formado (MEBARKI et al., 2017).

Atualmente, o enxerto autógeno é considerado o padrão ouro para a regeneração óssea na ortopedia e na odontologia, entretanto, suas principais desvantagens incluem: tempo prolongado de operação, preparação e cuidado adicional da região doadora, e morbidade devido a retirada do osso para o enxerto (AUER et al., 2007; SARAVANAN; LEENA; SELVAMURUGAN, 2016; DAYASHANKAR; DEEPIKA; SIDDARAMAIAH, 2017; DIAS et al., 2017; DUAN et al., 2017; LEE, O. S.; LEE, K. J.; LEE, Y. S., 2017; VERONESI et al., 2020).

A regeneração óssea é processo complexo que requer um ambiente biológico e mecânico ideal (LEE, O. S.; LEE, K. J.; LEE, Y. S., 2017). Por isso, os estudos de biomateriais devem responder questões como biocompatibilidade, osteointegração, osteocondução, osteoindução e osteogênese para o implante ser considerado candidato para utilização na rotina da medicina veterinária (DIAS et al., 2017).

Os biomateriais naturais apresentam vantagens nestas propriedades e otimizam as condições biológicas (BALAGANGADHARAN; DHIVYA; SELVAMURUGAN, 2017). Atributos como compatibilidade biomecânica para

sustentar o crescimento do novo tecido, juntamente com a manutenção da integridade estrutural e a taxa de biodegradação, são requisitos básicos para este tipo de biomaterial (AHSAN et al., 2018).

O desenvolvimento de biomateriais compósitos, formados por fases inorgânica/orgânica, como por exemplo, compostos à base de fosfatos de cálcio juntamente com polímeros para substituição de tecido ósseo, podem proporcionar vantagens como a otimização das propriedades mecânicas, químicas, morfológicas e biológicas, possibilitando a obtenção biocompatibilidade, bioatividade e aumento do potencial osteogênico (OLIVEIRA, S. S. L.; OLIVEIRA, H. M. L.; FOOK, M. V. L., 2015).

As associações destes biomateriais com célula-tronco apresentam destaque (MEBARKI et al., 2017). A qualidade e a quantidade de formação óssea dependem da capacidade do biomaterial de estimular e orientar o comportamento da célula-tronco. Na engenharia de tecidos, o biomaterial deve fornecer um microambiente favorável para as células mesenquimais atuarem de forma adequada, além de garantir estabilidade (DUAN et al., 2017).

2.1.1 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) é um dos materiais mais estudados devido à sua propriedade osteocondutora e o fácil gerenciamento de sua arquitetura, para possíveis associações com diferentes materiais (DIAS et al., 2017; MEBARKI et al., 2017). A hidroxiapatita é um componente inorgânico, encontrado na estrutura óssea e a sua composição química faz com que seja um elemento biocompatível, biodegradável e bioativo (SHIN et al., 2011; OLIVEIRA, S. S. L.; OLIVEIRA, H. M. L.; FOOK, M. V. L., 2015; LEE, O. S.; LEE, K. J.; LEE, Y. S., 2017).

Sabe-se também, que apresenta uma certa fragilidade e degradação lenta (RODRIGUES, 2013; DIAS et al., 2017). Entretanto, a HA porosa consegue ser transformada gradualmente em tecido ósseo quando há boa osteointegração (LEE, O. S.; LEE, K. J.; LEE, Y. S., 2017).

Em 2016, um biomaterial à base de hidroxiapatita foi estudado experimentalmente em tibia de ovinos com defeitos não-críticos por 12 semanas. Foi observado a participação do implante no remodelamento através da substituição do tecido, embora ainda houvesse a presença do implante. A taxa de reabsorção foi

proporcional a taxa de formação de osso sendo esta avaliação, realizada por métodos histológicos (DIAS et al., 2017).

Resultado similar foi encontrado com o estudo de biomaterial à base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana com defeitos não-críticos em tíbia de ovinos. Após 60 dias do implante, o biomaterial se manteve presente nas amostras, porém, com intensa osteointegração entre o biomaterial e o osso neoformado (MARCONDES et al., 2016; PARETSIS et al., 2017).

Estudo com ensaios de compressão com esferas de hidroxiapatita e quitosana mostrou aumento da resistência mecânica em determinada concentração (OLIVEIRA, S. S. L.; OLIVEIRA, H. M. L.; FOOK, M. V. L., 2015). A HA é objeto de estudo, pois acredita-se que diferentes associações com hidroxiapatita possam levar ao desenvolvimento de um substituto ósseo de qualidade (RODRIGUES, 2013).

2.1.2 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo e polímero natural. Apresenta características apropriadas para aplicações biomédicas, tais como, biocompatibilidade, biodegradabilidade, natureza antibacteriana intrínseca e capacidade de ser moldada (OLIVEIRA, S. S. L.; OLIVEIRA, H. M. L.; FOOK, M. V. L., 2015; AHSAN et al., 2018; BALAGANGADHARAN K.; DHIVYA S.; SELVAMURUGAN N., 2017).

A quitosana e seus derivados apresentam propriedades físico-química únicas que auxiliam a engenharia de tecidos (MUNHOZ et al., 2014; AHSAN et al., 2018; ROLIM et al., 2018). A quitosana como auxiliar na diferenciação osteoblástica e na mineralização apresenta vantagem significativa em relação aos processos celulares (SARAVANAN; LEENA; SELVAMURUGAN, 2016).

No entanto, a quitosana é frágil e não tem propriedades mecânicas adequadas para a engenharia de tecido ósseo (SABER-SAMANDARI; SABER-SAMANDARI, 2017). A taxa de degradação rápida limita a sua persistência a longo prazo *in vivo*, porém, pode ser prolongada com adição de outros materiais (SARAVANAN; LEENA; SELVAMURUGAN, 2016). Ainda assim, quitosana apresenta-se como um biomaterial promissor de ampla aplicabilidade em bioengenharia tecidual óssea (ROLIM et al., 2018).

Tanto a quitosana e a hidroxiapatita são matérias-primas biodegradáveis, biocompatíveis, cuja osteocondutividade é bem estabelecida. A associação destes materiais tem sido estudada em diferentes proporções, concentrações e porosidades na procura de uma composição ideal (TAVAKOL et al., 2013; MUNHOZ et al., 2014; SONG et al., 2014; AHSAN et al., 2018).

2.1.3 Nanotubo de carbono

A nanotecnologia é definida pelo tamanho de um material (geralmente 1-100nm) com manipulação em nível molecular, envolve uma ampla gama de materiais utilizados em vários campos da medicina, incluindo regeneração de tecidos, terapia celular, diagnóstico, administração de medicamentos entre outros (KUBINOVÁ; SYKOVÁ, 2010; BACA KOVA et al., 2020).

A densidade de um nanotubo de carbono é semelhante a um grafite. Pode apresentar conformação de parede única, com diâmetro de 1 a 1,5nm ou múltiplas paredes, com diâmetros maiores (100nm), sendo que as distâncias entre as camadas é de aproximadamente 0,34nm. Estes diâmetros são semelhantes ao tamanho das fibras de colágeno, o que faz com que se torne um material ideal para o crescimento do tecido ósseo (MARTINS-JÚNIOR et al., 2013).

O nanotubo de carbono apresenta propriedades mecânicas como rigidez e resistência. Além de possuir propriedade estrutural, térmica, química e elétrica que auxiliam na bioatividade do biomaterial (SHIN et al., 2011; TONELLI et al., 2012; MARTINS-JÚNIOR et al., 2013).

A superfície da nanoestrutura mimetiza uma matriz extracelular estimulando a interação celular (adesão, proliferação e diferenciação) entre o tecido hospedeiro, podendo servir como arcabouço para células multipotentes (KUBINOVÁ; SYKOVÁ, 2010). Este material tem um alto grau de flexibilidade e pode sustentar até 15% de tração, aumentando as propriedades mecânicas do tecido lesionado quando implantado (MARTINS-JÚNIOR et al., 2013). Várias aplicações do nanotubo de carbono foram propostas na engenharia de tecido ósseo, onde a inclusão do nanotubo de carbono em uma matriz cerâmica produz um composto de alta resistência (CHEN et al., 2006; SHIN et al., 2011).

A possível toxicidade do composto, sua natureza não biodegradável e a difícil distribuição homogênea na formação do compósito é mencionada como inconveniente (SHIN et al., 2011; BACAKOVA et al., 2020) e a biocompatibilidade do nanotubo também precisa ser aperfeiçoada (KUBINOVÁ S.; SYKOVÁ E., 2010). Por ser um composto pouco solúvel e com pouca dispersão, dificulta as interações entre os outros materiais, como com os polímeros por exemplo, o que precisa ser contornado (TONELLI et al., 2012; MARTINS-JÚNIOR et al., 2013).

A associação da hidroxiapatita, quitosana e nanotubo de carbono já foi descrita e caracterizada, e os estudos de bioatividade, demonstraram propriedades favoráveis ao processo regenerativo (GRANATO et al., 2011). O nanotubo de carbono também foi estudado como arcabouço de células mesenquimais de medula óssea e apresentou um microambiente favorável e resultados positivos (TONELLI et al., 2012).

2.1.4 Associação biomaterial e célula-tronco

As células mesenquimais são células multipotentes, não hematopoiéticas e onipresentes no organismo. Podem ser obtidas de diferentes tecidos, como o adiposo, muscular, periósteo, paredes de vasos, cordão umbilical e medula óssea. Estas células são capazes de replicação e diferenciação em células de linhagem mesenquimatosas como osso, cartilagem, músculo entre outros, podendo contribuir para a regeneração tecidual (HOWLADER et al., 2017). As células mesenquimais de medula óssea são as mais estudadas para a regeneração óssea, no entanto, sua coleta é dolorosa e invasiva (PRZEKORA et al., 2017).

Acredita-se que haja uma contribuição direta das células-tronco para regeneração do tecido ósseo, no qual estas se diferenciam em linhagens osteoblásticas, quando implantadas no local (MEBARKI et al., 2017).

O mecanismo de atuação da célula mesenquimal precisa ser elucidado, entretanto, atualmente pressupõe-se que as células atuam de duas formas. Após o trauma, acredita-se que as células-tronco são requeridas no local da lesão (semelhante aos leucócitos) e atuam por meio de restauração da cito-arquitetura do sítio lesionado, o que justifica a utilização destas células no local do trauma. O segundo mecanismo é conhecido como efeito parácrino ou como *trophic activity*, um microambiente regenerativo no qual estas células secretam fatores de crescimento,

citocinas imunomoduladoras como a prostaglandina 2, TGF- β 1, TNF- α , IL-4, 6 e 10, para modular o processo inflamatório recrutando também células como os linfócitos T e B, células *serial killer* e macrófagos (HOWLADER et al., 2017; MEBARKI et al., 2017; MICHEL et al., 2017).

As células mesenquimais também são capazes de iniciar a angiogênese e melhorar o recrutamento e proliferação de células endoteliais através de fatores de crescimento segregados, incluindo VEGF, IGF-1, angiopoietina-1 e EGF (MEBARKI et al., 2017). Em resumo, a associação de terapias com biomateriais e células mesenquimais abrem novas perspectivas, cujos resultados devem ser validados e os mecanismos de ação esclarecidos (MICHEL et al., 2017).

Estudos recentes têm sido realizados com o uso de célula-tronco e a promessa de potencializar a regeneração do tecido ósseo, com diferentes concentrações e frequência de inoculação de células (CHENG et al., 2016), comparando as células mesenquimais de origem distintas (tecido adiposo e medula óssea) associadas aos biomateriais. Neste último, destacou-se melhor associação do biomaterial à base de quitosana, hidroxiapatita e gluconato com células mesenquimais de medula óssea, uma vez que apresentaram um comportamento superior, com melhor capacidade de proliferação, adesão e distribuição (PRZEKORA et al., 2017).

No estudo realizado em 2010 foram comparadas células mesenquimais de medula óssea, de tecido adiposo e plasma rico em plaquetas (PRP) implantados sob esponjas de colágeno em defeito crítico segmentar em tíbias de ovinos, por seis meses. Por meio de análise radiográfica a cada duas semanas e histológica após seis meses, concluiu-se que as células mesenquimais de medula óssea apresentaram melhor potencial osteogênico nos dois métodos analisados (NIEMEYER et al., 2010).

No entanto, o plasma rico em plaquetas estudado nos defeitos unicorticais, em fêmur de coelhos, por duas semanas, por meio de várias análises (densitometria, histologia e microtomografia), concluiu que estimula a formação de tecido ósseo e sugere que pode acelerar o processo de regeneração. Deve-se ressaltar também, a dificuldade de interpretar e comparar diferentes modelos experimentais e processamento das terapias celulares (SKWARCZ et al., 2019).

2.2 MODELO EXPERIMENTAL PARA TECIDO ÓSSEO

A osteogênese é um processo dinâmico e multifacetado que participa das cascatas de sinalização celular e direcionam o recrutamento, a diferenciação, maturação e o comportamento celular. A capacidade de formação de osso é variável por determinadas doenças e/ou a idade do animal, que influenciam o processo (DUAN et al., 2017).

Modelos experimentais em animais são realizados a fim de verificar se a praticabilidade deste estudo se assemelha com situações clínicas reais (CANCEDDA; GIANNONI; MASTROGIACOMO, 2007; VERONESI et al., 2020). Para responder as diferentes questões quanto a regeneração do tecido ósseo a partir de um biomaterial, deve-se atentar a utilização de um defeito crítico, conceituado como uma falha que não regenera espontaneamente durante a vida do animal (KNOTHE TATE et al., 2011), ou como defeito que apresenta menos que 10% de regeneração óssea durante a vida do animal (MILLS; SIMPSON, 2012). O tamanho mínimo para considerar um defeito crítico varia de acordo com a espécie, raça, peso, idade e localização (CAMERON et al., 2012). Em ovinos, consideram-se defeitos segmentares de 25 a 40mm em ossos longos (fêmur e tíbia) (MARTINI et al., 2001), podendo chegar até 50mm (CHRISTOU et al., 2014). Na literatura, encontram-se comumente defeitos segmentares de 25 a 30mm (VERONESI et al., 2020).

Os defeitos não críticos permitem avaliar a biocompatibilidade, a osteointegração e a morfologia do tecido neoformado por métodos de imagem e histológicos (PARETSIS et al., 2016). Para certificar volume ósseo, resistência do tecido neoformado, e a influência do biomaterial de estudo no organismo e na regeneração óssea, este deve ser estudado *in vivo* em defeitos críticos (MILLS; SIMPSON, 2012).

2.3 IMAGINOLOGIA NA ORTOPEDIA

2.3.1 Aspecto da imagem no processo de regeneração óssea

Para definir a progressão da regeneração óssea pós fratura, comumente se recorre aos exames de imagem seriados associados à avaliação clínica do paciente (FIELD; RUTHENBECK, 2018). Este tipo de avaliação, não invasiva, geralmente apresenta caráter indireto, ou seja, fornece algumas medidas que representam aspectos do tecido avaliado (AUGAT et al., 2014).

Segundo AUER; STICK (2011), a regeneração óssea secundária ou indireta, comumente encontrada em diáfise de ossos longos pode ser pontuada em três fases da regeneração óssea: inflamação, reparo e remodelamento. Na primeira fase até uma semana após o trauma, os bordos e a fratura são facilmente identificáveis na imagem radiográfica e ultrassonográfica. Após a estabilização da inflamação, o *gap* da fratura parece aumentar e seus bordos passam a ser menos distintos na imagem (fase de reparo); ainda nesta fase, observam-se calos periosteais, endosteais e intracorticais, que variam de acordo com o grau de mineralização. À medida que o reparo progride, o calo ósseo diminui e a linha de fratura oblitera na fase de remodelamento.

Em estudo realizado com implante ósseo alógeno em defeito crítico segmentar no cão, as alterações observadas foram: com sete dias, nenhuma alteração foi notada quando comparada ao pós-imediato; com 15 dias, notou-se reabsorção discreta das interfaces ósseas; aos 30 dias, início de reabsorção do implante e formação de pontes ósseas em interfaces; com 45 dias, reabsorção do implante e formação de pontes ósseas nas interfaces mais acentuadas; aos 60 dias, pontes ósseas em interfaces mais evidentes e formação de calo ósseo com fechamento da linha das interfaces ósseas; com 90 dias, reabsorção do implante mais evidente, redução da linha das interfaces ósseas, formação de calo ósseo com fechamento das linhas de interface e remodelação óssea; e com 120 dias, reabsorção quase completa do implante, formação de calo ósseo com fechamento de linhas de interfaces ósseas, remodelação óssea. Neste estudo, a remodelação ocorreu a partir dos 90 dias, com a substituição do implante por tecido ósseo do animal receptor (ZILIOTTO et al., 2003).

Na reparação de fraturas, a quantidade de mineralização óssea pode ser útil para estimar a estabilidade mecânica do osso. Isto pode ser visualizado pela quantidade de tecido calcificado encontrado no *gap*, considerando o melhor preditor de estabilidade em uma fratura. Em contrapartida, deve-se atentar que a presença de um extenso calo ósseo pode indicar uma proliferação exuberante causado por uma fixação inadequada devido microinstabilidade (AUGAT et al., 2014). O tamanho do calo ósseo é influenciado pela movimentação do local da fratura (AUER; STICK, 2012). Ainda, ao acompanhar a evolução de uma fratura deve-se atentar para a possibilidade de não-união. Este tipo de situação é difícil de ser interpretada nos diferentes métodos de imagem, porém quando diagnosticada precocemente, deve ser realizada intervenção cirúrgica (FIELD; RUTHENBECK, 2018).

A reação de rejeição aos substitutos ósseos é caracterizada pela reabsorção da periferia do implante sem a substituição por tecido reparador, pela diminuição da reparação da fratura, pela resposta inflamatória com tecido fibroso encapsulando o implante e pela oclusão de neovasos com necrose progressiva (ZILIOTTO et al., 2003).

Atualmente, nenhuma medida qualitativa e/ou quantitativa disponível é capaz de definir com precisão o reparo de fraturas. A compilação de medidas auxilia em alguns *insights* e nem sempre são definitivas (FIELD; RUTHENBECK, 2018). Sugere-se a combinação de várias modalidades de exame de imagem para acompanhar e determinar o processo de regeneração óssea. Pode-se associar o exame radiográfico ao exame ultrassonográfico em fraturas que apresentam componentes articulares ou de difícil isolamento e/ou entendimento, por exemplo (AUER; STICK, 2012; RAHIMZADEH et al., 2012).

2.3.2 Estudo Radiográfico e Densitometria

Embora os métodos de imagem estejam cada vez mais avançados, o exame radiográfico continua sendo utilizado em larga escala na rotina e em experimentos (SILVA, 2003; SILVA et al., 2007; FERNANDES et al., 2014; GOBESSO et al., 2014).

De forma geral, o aumento de radiopacidade e a diminuição no tamanho do defeito ósseo é interpretado como resolução da falha óssea. Entretanto, a qualidade

do tecido neoformado só é confirmado com exames histológicos (DAYASHANKAR; DEEPIKA; SIDDARAMAIAH, 2017).

As radiografias são realizadas para mensurar a densidade do tecido formado, sabendo-se que o maior responsável pelo aumento de densidade é o cálcio e o aspecto da ponte formada (FIELD; RUTHENBECK, 2018).

A imagens fornecem a reprodução instrutiva das condições do processo de reparação óssea. A avaliação fornece medidas indiretas no qual sugere a estabilidade mecânica de acordo com o aspecto da imagem. As radiografias simples podem determinar a quantidade de ponte ou *gap* da fratura, e a presença e quantidade de calo periosteal (LIMA et al., 2004; AUGAT et al., 2014).

Deve-se ressaltar que a descrição de imagem ou atribuição em escores contém componentes subjetivos com métodos não validados (SCHÖNBERGER et al., 2007). Para contornar esta situação, descreveu-se uma pontuação indicativa de união da falha óssea por escore, dividindo o defeito ósseo em quatro quadrantes nas projeções craniocaudal e lateromedial para análise de densidade. Este método foi citado como semi-quantitativo (SARKAR et al., 2006; FIELD; RUTHENBECK, 2018).

A densitometria é técnica não invasiva de baixo custo, sendo a medida um dado numérico e objetivo (SILVA et al., 2007). Os métodos para mensurar a densidade óssea por raio-x, dependem da absorção de radiação pelo osso, provendo medidas quantitativas da massa óssea. Diferentes métodos podem ser utilizados como a absormetria de energia dupla de raios-x (DEXA), por tomografia computadorizada, por meio de uma referência densitométrica conhecida e por ultrassom (SILVA, 2003). Estes métodos são frequentemente usados para diagnosticar doenças que afetam a quantidade de mineralização do osso, como a osteoporose. A densitometria não é utilizada rotineiramente para avaliação da reparação óssea (AUGAT et al., 2014).

A densidade mineral óssea por raio x pode ser realizada por meio de um penetrômetro. A técnica é baseada na comparação da imagem radiográfica com uma escala de alumínio em forma de trapézio (denominada penetrômetro) com vários degraus (GOBESSO et al., 2014). A diferença de espessura entre os degraus de um penetrômetro se traduz nas tonalidades de cinza que aparecem na imagem processada. Quanto maior for o número de tons de cinza numa escala de alumínio, maior a possibilidade de comparação deste material com o tecido ósseo. Destaca-se também a importância da padronização da técnica e dos aparelhos utilizados (KIRSTEN et al., 2007).

A densitometria com penetrômetro é coerente com os achados de histomorfometria, com a densidade óssea por DEXA (DIAS et al., 2007) e permite avaliar quantitativamente a reparação óssea (LIMA et al., 2004). Ao comparar a densitometria com a interpretação visual dos especialistas, foi encontrado variação apenas de 4% das densidades, comparado a 22% entre os avaliadores (FIELD; RUTHENBECK, 2018).

Este tipo de análise foi descrita em projeções anteroposteriores em defeitos segmentares de tíbia em ovinos (DIAS et al., 2007), em defeitos circulares em equinos (SELIM et al., 2018), defeitos em coelhos, (LIMA et al., 2004), em cães (SILVA et al., 2007) entre outros. A densitometria em *pixels* também é descrita em diferentes estudos de pesquisa visando a regeneração óssea (KIRSTEN et al., 2007; LINDEN et al., 2016).

A presença de enxerto no defeito ósseo e de implantes metálicos para estabilizar o membro dificulta a mensuração das medidas. Imediatamente ao pós-operatório, pode ser encontrado aumento de radiopacidade o que não reflete a presença de osso neoformado, assim como é comum encontrar a diminuição dos valores de radiopacidade nas primeiras quatro semanas com enxertos biodegradáveis, que pode estar relacionado com a reabsorção/biodegradação do biomaterial (FIELD; RUTHENBECK, 2018).

Avaliar o grau de neoformação no reparo ósseo em radiografias simples pode ser discutível e impreciso, porém é considerado aceitável (LEE, O. S.; LEE, K. J.; LEE, Y. S., 2017). Outro parâmetro descrito é a taxa de absorção do biomaterial por meio do exame radiográfico, no qual se calcula a taxa de absorção dos biomateriais com a seguinte fórmula: $(A-B)/A$ sendo A = área do biomaterial imediatamente após a cirurgia, B = área do biomaterial após seis meses de implante (ONODERA et al., 2014; LEE, O. S.; LEE, K. J.; LEE, Y. S., 2017).

Considerando alguns estudos que avaliaram a regeneração óssea com diferentes terapias assistidas, a densitometria bidimensional vem sendo substituída ou complementada nas pesquisas pela microtomografia, considerada mais precisa com abordagens qualitativa e quantitativa (SKWARCZ et al., 2019).

2.3.3 Estudo Ultrassonográfico

O exame ultrassonográfico modo B e o modo *doppler* são considerados exames rápidos, portáteis, sem radiação, não invasivo e barato (RAHIMZADEH et al., 2012). As ondas refletem na superfície óssea permitindo avaliar o contorno e regiões endosteais e periosteais de ossos longos (LI et al., 2017).

A ultrassonografia pode revelar detalhes dos estágios iniciais da reparação óssea com uma ou duas semanas após a fratura, por representar o *gap*. Ainda, permite que o tecido circundante seja examinado de forma dinâmica (AUGAT et al., 2014).

O exame ultrassonográfico pode ser utilizado também em transoperatório permitindo a identificação da anatomia, estruturas ósseas e adjacentes em tempo real (BROCK et al., 2017). Monitorar fraturas em ossos longos, nos pacientes pediátricos têm sido descrito devido à suas vantagens (LI et al., 2017).

Para avaliar e comparar a eficácia da cirurgia de osteotomia de nivelamento de platô tibial (TPLO) associada ao PRP em 60 cães, foi estabelecido um escore ultrassonográfico similar aos escores radiográficos, considerando a formação de calo ósseo de 0 - 4 (0 = ausente, 1 = mínimo, 2 = moderado, 3 = remodelado, 4 = curado) e avaliação da cortical em escala de 0 - 4 (0 = 0% sem reparação, 1 = $\pm$ 25% de cortical formada, 2 = $\pm$ 50% de cortical formada, 3 = $\pm$ 75% de cortical formada, e 4 = 100%, ou seja reparação completa da cortical). Segundo o autor, esta escala foi validada para avaliar fratura em cães, em outros artigos. Ainda, a ultrassonografia *doppler* também foi utilizada em uma escala gradual de 0 - 3 com base na densidade vascular (FRANKLIN; BURKE; HOLMES, 2017).

Escore semelhante foi utilizado no experimento de Thurmüller et al. (2002) no exame ultrassonográfico modo B, no qual foi considerado 0 quando há completa transmissão das ondas, margens de aberturas claras e nenhum material ecogênico; 1- quando há transmissão parcial das ondas, margens identificáveis e menos de 50% de material ecogênico; 2- quando há transmissão parcial de ondas, margens obscurecidas e no *gap*, mais de 50% de material ecogênico; 3- quando há ausência de transmissão de ondas, margens invisíveis e falha com 100% de material ecogênico.

A angiogênese é um processo crítico e necessário para a correta regeneração óssea, sendo assim, avaliar a neovascularização no processo pode trazer informações valiosas. O *power doppler* baseia-se no sistema integrado de espectro

de potência que avalia a movimentação. Esta tecnologia supera o *doppler* colorido convencional, como a influência da angulação e separação dos demais ruídos, o que aumenta a confiança dos dados (AUGAT et al., 2014).

Em estudo avaliando biomaterial em falhas ósseas circulares em metacarpo de equinos com o exame ultrassonográfico, não foi possível avaliar o processo regenerativo devido às características físicas do biomaterial, que impediu a passagem das ondas sonoras. No modo *doppler* foi possível reconhecer a presença de neovascularização a partir do 15º dia de implante, ainda, foi possível graduar a intensidade da neovascularização, com aumento no 30º dia do membro com o biomaterial (NÓBREGA, 2014).

Baccarelli (2016) estudou neovascularização por meio do *power doppler* em defeitos não-críticos em tíbia de ovinos, no qual os vasos neoformados foram detectados, mas não se apresentaram de forma simétrica ao longo do pós-operatório (60 dias) entretanto, continua sendo indicado para acompanhamento de fraturas.

Durante o estudo anterior, o mesmo grupo teve a oportunidade de acompanhar uma fratura completa de tíbia em bisel de um ovino. Após a osteossíntese, foi possível avaliar a neovascularização por meio do *power doppler*, identificando a presença de vasos sanguíneos nos dias 14 e 21 de pós-operatório e regressão nas avaliações subsequentes (BACCARELLI et al., 2017).

2.3.4 Estudo Termográfico

A termografia é técnica de imagem capaz de mensurar a temperatura da superfície. Nos últimos anos, diferentes campos da pesquisa médica vêm utilizando esta técnica (BARGIEL et al., 2019).

A avaliação por termografia apresenta caráter não invasivo, ausente de radiação e seguro para o operador e o paciente. A técnica é baseada em imagens infravermelhas obtidas em tempo real no formato digital, com custo acessível do aparelho e do programa (BRIOSCHI et al., 2003; NÓBREGA et al., 2014; REDAELLI et al., 2014; HALUZAN et al., 2015).

As variações da temperatura local se devem a alterações locais causadas por processos metabólicos e inflamatórios causados por traumas, infecções ou neoplasias (REDAELLI et al., 2014). Autores descreveram parâmetros da termografia em animais

e humanos, que permitem definir o prognóstico clínico de várias afecções, assim como documentar a inflamação esperada em determinados procedimentos (BRIOSCHI et al., 2003; HEMPSTEAD et al., 2018).

Ao mensurar uma área superficial, avalia-se indiretamente o suprimento sanguíneo daquela área. Muitos fatores podem alterar a circulação como a própria inflamação ou isquemia (BARGIEL et al., 2019).

A termografia também foi utilizada a fim de elucidar aumento de temperatura no transoperatório, como a perfuração em osso cortical influenciado por pressão, velocidade, sistema de irrigação e geometria da broca utilizada (SCARANO et al., 2011).

Após o trauma ósseo há presença de sangramento, reação inflamatória local, aumento de fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular provocando hiperemia, e aumento de temperatura local. Durante a fase de reparo tecidual, a temperatura deve diminuir gradualmente com a progressão da fase de mineralização e aumento de densidade óssea (HALUZAN et al., 2015). Sendo assim, a termografia também é útil na identificação precoce de processos inflamatórios no sistema músculo esquelético, antes mesmo das manifestações clínicas, sendo utilizada também para monitorar lesões ósseas e o processo de regeneração (HALUZAN et al., 2015; MARCONDES et al., 2015).

Ao realizar a termografia em determinada região onde foi colocado um biomaterial, é possível que a temperatura deste local seja maior que o esperado. Isto pode ocorrer como resposta inflamatória à presença de um material exógeno. Porém, espera-se que esta resposta seja tolerável e temporária (NÓBREGA et al., 2014).

Uma limitação da técnica é que condições ambientais podem afetar a leitura da temperatura e apenas alguns centímetros da superfície do corpo podem ser penetrados e analisados (REDAELLI et al., 2014). Por isso há necessidade de padronização no preparo do paciente, do equipamento e conhecimento do operador (BRIOSCHI et al., 2003).

A literatura demonstra que a termografia, embora inespecífica, é um método muito sensível e pode ser considerada uma ferramenta valiosa para complementar o diagnóstico ou até mesmo realizar uma triagem. A interpretação da termografia deve ser sempre correlacionada com os sintomas clínicos e resultados de outros exames (BARGIEL et al., 2019).

2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode fornecer a morfologia e a identificação dos elementos químicos de uma amostra sólida, sendo utilizada comumente na biologia, medicina, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalurgia, entre outros. A aparência tridimensional da imagem das amostras permite a análise em pequenos aumentos e com grandes profundidades de foco, o que a torna extremamente útil e complementa as informações (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Diferente do microscópio óptico ou eletrônico de transmissão, a imagem é “varrida”, ou é percorrida, por um feixe de elétrons extremamente fino em todas as direções e, dessa maneira, ou por meio da relação dos elétrons com a amostra, a imagem é construída (MENDES; PIRES;; COELHO, 2014).

Para obter esta imagem tridimensional, o feixe de elétrons deve estar precisamente focado na amostra revestida com uma substância condutora como carbono, ouro, paládio ou irídio depositado com uma película fina (nanômetros de espessura) na superfície da amostra, que deve ser analisada sob vácuo (SCHWEITZER et al., 2008).

No estudo com biomateriais, esta análise é rotineiramente utilizada na caracterização do biomaterial para avaliar a morfologia e a distribuição dos componentes (HORN; MARTINS; DE GUZZI PLEPIS, 2015; DE SOUSA MORAES et al., 2016; YAO et al., 2019), assim como após o biomaterial ser implantado experimentalmente. Esta mesma técnica pode ser utilizada após uma biopsia ou *post mortem* em estudos *in vivo*, com o objetivo de avaliar novamente a superfície do biomaterial após o implante, o tecido receptor e possivelmente a interface entre eles (PAN et al., 2012; SELIM et al., 2018).

Neste estudo, a MEV foi utilizada na caracterização do biomaterial de estudo e para certificar as informações obtidas nos exames de imagem.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a reparação óssea por imagem, em falhas segmentares críticas realizadas experimentalmente em ovinos, comparando a regeneração óssea entre os diferentes grupos: animais estabilizados apenas com placa bloqueada considerado grupo controle (GC); animais com implante do biomaterial associado à placa bloqueada (BIO) e animais com implante do biomaterial e célula-tronco homóloga, associada à placa bloqueada (CT).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar a técnica de densitometria digital e compará-la com o método por meio de escala de alumínio (penetrômetro) na fase de mineralização dos diferentes grupos.
- Realizar avaliações ultrassonográficas para qualificar o reparo tecidual precoce, assim como comparar a regeneração óssea dos diferentes grupos.
- Caracterizar o comportamento termográfico devido à inflamação do tecido ósseo na região do defeito, comparando os diferentes grupos.

4 HIPÓTESES

- Os exames de imagem são capazes de exibir o processo de regeneração óssea a partir de um biomaterial compósito à base de hidroxiapatita, quitosana e nanotubo de carbono. Acredita-se que conceitos como biocompatibilidade, biodegradabilidade e o reparo ósseo podem ser sugeridos durante o processo de cicatrização com o uso da densitometria, ultrassonografia e termografia.
- A presença do biomaterial nos grupos tratados proporcionará possibilidade de reparo tecidual melhor que o grupo controle, considerando a realização de um defeito crítico.
- O grupo biomaterial associado às células mesenquimais apresentará o reparo tecidual superior comparado aos demais quanto a interação com o biomaterial, neoformação tecidual e vascularização.

5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A avaliação da regeneração óssea, neste estudo, foi finalizada aos 90 dias, independente da fase em que processo de regeneração óssea se encontrava.

Não foi possível a realização de um grupo apenas com as células mesenquimais no defeito crítico.

Não foram utilizados biomarcadores para investigar sua atividade, ou confirmar se as células mesenquimais se mantiveram no local após o implante.

Não foram utilizados marcadores biológicos para evidenciar a possível neovascularização ou até mesmo a vascularização adjacente ao defeito crítico, para certificar os resultados encontrados na ultrassonografia *doppler*.

6 MATERIAL E MÉTODO

6.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 18 ovelhas, fêmeas, adultas, entre três e quatro anos de idade, híbridas, mestiça de Suffolk. No transcorrer do estudo os animais foram mantidos em regime de estabulação (2 animais por baia), recebendo água e feno de *tifton* à vontade, além de alimento concentrado comercial peletizado calculado para dieta de manutenção (1% do peso vivo). Logo na chegada dos animais ao Hospital Veterinário da FMVZ-USP (Serviço de Cirurgia de Grandes Animais) foram identificados e vacinados contra clostridioses (primeira dose e reforço após 30 dias), realizados exames laboratoriais (hemograma, perfil hepático, perfil renal, avaliação de parasitose pelo método FAMACHA) e também vermifugados de acordo com peso vivo com moxidectina ou levamisol, e com a parasitemia indicada no exame. Este manejo foi realizado 30 dias antes das intervenções cirúrgicas.

6.2 BIOMATERIAL

O compósito à base de nanotubo de carbono, hidroxiapatita e quitosana utilizado neste experimento foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade da Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis e Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins em formato de tarugo. O protocolo de produção e caracterização do compósito está apresentado no ANEXO A.

Os testes *in vitro* de viabilidade e citotoxicidade do biomaterial foram feitos no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob supervisão da Dra. Nicolle G. T. de Queiroz Hazarbassanov, e está apresentado no APÊNDICE A.

Em outras análises, o biomaterial de estudo apresentou ausência de reação de corpo estranho após implante de subcutâneo de ratos. Na análise histomorfométrica em calvária de ratos e tibia de ovinos, não mostrou diferença significativa quanto a neoformação de tecido ósseo, entre os grupos com biomaterial e biomaterial

associada à célula mesenquimal de medula óssea de ovinos. Registrou-se também, biocompatibilidade e osteocondutividade do biomaterial (MARCONDES, G.M. 2019)¹.

6.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As ovelhas foram submetidas à ostectomia segmentar de 30mm, sendo realizadas em terço médio da diáfise da tíbia do membro direito. Posteriormente foram estabilizadas com uso de placas bloqueadas (LCP – *Locking Compression Plate*) de 4,5mm e 10 orifícios², em todos os animais. Os ovinos foram divididos em três grupos com seis animais em cada grupo, distribuídos de forma aleatória por meio do site <https://www.randomizer.org>. Após a osteossíntese, em um grupo foi implantado o biomaterial composto de nanotubo de carbono, quitosana e hidroxiapatita; no segundo grupo também foi implantado o mesmo biomaterial adicionado célula-tronco homóloga; e por fim, no terceiro grupo não foi adicionado nada, sendo realizada somente a osteossíntese com placas LCP, utilizado como controle. Em todos os grupos, o defeito ósseo foi envolto de membrana amniótica com o objetivo de manter o biomaterial no local da falha. Durante o pós-operatório foram realizados os exames de imagens (exame radiográfico, termográfico e ultrassonográfico) de forma padronizada.

6.3.1 Coleta e implante de Célula-Tronco

Para a coleta de célula-tronco foi realizado aspirado da medula óssea de um ovino com dois meses de idade, a partir da crista ilíaca sob anestesia geral.

A amostra proveniente da medula óssea foi diluída em PBS na proporção de 1:1, em seguida delicadamente depositada sobre solução de Ficoll 1077 g/ml (proporção 1:1). Após diluição, a amostra foi centrifugada a 1400 rpm durante 30 minutos, a temperatura ambiente, com o objetivo de separar as células por gradiente de densidade. Após centrifugação, a camada contendo células-tronco mesenquimais

¹ Comunicação oral: MARCONDES, G. M. **Avaliação da interação biológica entre compósito de nanotubo de carbono, quitosana e hidroxiapatita e tecido ósseo**. 2019. 174f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Documento ainda não divulgado. Retido aguardando publicação.

² LCP - FOCUS, S.P., Brasil

(fração de células mononucleares) foi diluída novamente em PBS, e então centrifugada a 2000 rpm durante 10 minutos, seguido por mais uma etapa de lavagem, nas mesmas condições já descritas.

A viabilidade celular foi realizada em microscópio óptico a partir da contagem de células coradas com azul de tripan. O *pellet* formado foi transferido para frascos de cultivo de 25 cm², e preenchidos com 5 ml de meio de cultivo DMEM (*Minimum Essential Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de ácido pirúvico, 1% de L-glutamina, 1% de insulina e 0,5% de anfotericina B, incubados a uma temperatura de 37°C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. No grupo dos animais com célula-tronco, foi utilizado 6x10³ células/animal. A certificação das células mesenquimais se encontra no APÊNDICE B.

6.3.2 Procedimentos Anestésico e Cirúrgico

Os animais foram submetidos à anestesia geral inalatória, após 48 horas de jejum alimentar e 8 horas de jejum hídrico, seguindo o protocolo: medicação pré-anestésica com cloridrato de xilazina³ (0,05 mg/kg, i.v.), indução anestésica com propofol⁴ (6 mg/kg, i.v.), a manutenção da anestesia foi feita com isoflurano⁵ vaporizado em oxigênio 100%.

Os animais foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito lateral direito. O membro foi preparado previamente com tricotomia, e realizada antissepsia pré-operatória. Foi realizada incisão de pele e subcutâneo no eixo longitudinal da tíbia, de aproximadamente 12cm de extensão no seu aspecto medial.

A placa bloqueada de 4,5mm e 10 orifícios foi ajustada de acordo com a morfologia do osso, com uso de moldador de placa de mesa, e posicionada no aspecto medial da tíbia. A extremidade distal da placa foi posicionada à 2,5cm proximal do maléolo medial da tíbia. Perfurações, com as brocas adequadas aos parafusos foram realizadas e a placa foi temporariamente fixada com dois parafusos adjacentes ao local onde foi realizado o defeito.

³ Rompum®, Bayer Saúde Animal, São Paulo, S.P., Brasil

⁴ Propovan®, Cristália, Itapira, S.P., Brasil

⁵ Isoforine®, Cristália, Itapira, S.P., Brasil

O ponto médio do defeito foi referendado e a placa removida. Foi considerada a distância de 1,5 cm proximal e distal ao meio do defeito para definir as linhas da ostectomia. Todo o tecido adjacente à região da ostectomia foi afastado e coberto por compressa úmida para evitar lesões de vasos e nervos.

Duas osteotomias paralelas entre si e perpendiculares ao eixo longitudinal do osso foram realizadas com serra oscilatória⁶, sob irrigação contínua com solução fisiológica para prevenir a osteonecrose pelo calor, até o segmento de 3cm de comprimento ser excisado. O periósteo foi removido na área do defeito, 1,5cm proximal e distal às linhas de osteotomia.

Os fragmentos ósseos foram realinhados, o defeito ósseo foi envolvido com uma membrana e fixados com placa de compressão bloqueada com parafusos craniais e caudais de tamanhos adequados, seguindo a técnica de placa ponte. Todo o processo de confecção das falhas foi acompanhado por exame radiográfico transoperatório com aparelho digital⁷ (Figura 1).

⁶ Serra oscilatória, Synthes, Solna Suíça

⁷ JOB X - Ray®, 380 HF, Job do Brasil® São Paulo, Brasil

Figura 1 - Procedimento cirúrgico para realização da falha óssea segmentar de 30 mm e osteossíntese

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Posicionamento da placa bloqueada à 2,5cm proximal ao maléolo medial da tíbia (A); realização da falha óssea segmentar de 30mm com a serra oscilatória (B); ilustração do segmento ósseo que foi removido (C); fixação da placa bloqueada após a realização da falha óssea (D). Esta foi uma ovelha do grupo controle.

A falha foi preenchida com o compósito a base de nanotubo de carbono, quitosana e hidroxiapatita no membro das ovelhas dos grupos tratados (grupo com biomaterial e grupo com biomaterial e célula-tronco). Os membros das ovelhas do grupo controle não foram preenchidos com biomaterial. Todos os grupos tiveram o defeito ósseo envolvido por uma membrana amniótica (Figura 2).

Figura 2 - Colocação da membrana amniótica no grupo controle e nos grupos com a presença do biomaterial

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Defeito ósseo segmentar envolvido com membrana antes da fixação da placa bloqueada no grupo controle (A); biomaterial de estudo envolvido com a membrana nos grupos que tiveram o biomaterial de estudo implantado (grupo biomaterial e grupo biomaterial associado à célula-tronco) (B).

A colocação de célula-tronco no biomaterial para o terceiro grupo foi realizada imediatamente antes ao implante do biomaterial no defeito ósseo. O biomaterial foi umedecido com as células mesenquimais e em seguida colocado no ovino na falha óssea (Figura 3). Após a implantação do compósito ou não (grupo controle), o tecido subcutâneo foi aproximado em padrão tipo *Cushing* com fio poligrecapone 25 nº 2.0 e a síntese de pele foi realizada com fio nylon nº 2.0, no padrão contínuo simples.

Figura 3 - Biomaterial de estudo em formato de tarugo umedecido com células mesenquimais de ovino

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Biomaterial em formato de tarugo sendo umedecido com solução contendo células mesenquimais de ovino (célula-tronco) (A). Aspecto final do biomaterial imediatamente antes da implantação no ovino (B).

Em todos os ovinos foi administrado no pós-operatório tramadol⁸ (3mg/kg I.V., TID), dipirona⁹ (25 mg/kg I.V., TID), fenilbutazona¹⁰ (4mg/kg I.V., SID) e cloridrato de ranitidina¹¹ (2 mg/kg, I.V TID) por três dias. Foi administrado também, ceftiofur¹² (2,2 mg/kg, I.M., SID) por sete dias. Após 15 dias de pós-operatório, foi realizada abertura do penso rígido e avaliação da ferida cirúrgica.

As avaliações foram realizadas com 15, 30, 60 e 90 dias de pós-operatório. Após cada captura de imagem, a bandagem foi removida, as feridas cirúrgicas foram higienizadas com solução fisiológica e os animais se mantiveram com bandagem restritiva durante todo o estudo.

⁸ Tramadon, Cristália, Itapira, S.P., Brasil

⁹ D500, Zoetis, São Paulo, S.P., Brasil

¹⁰ Equipalazone Injetável®, Marcolab, Duque de Caxias, R.J., Brasil

¹¹ Cloridrato de Ranitidina®, Novafarma, Anápolis, G.O., Brasil

¹² CEF-50 Agener, União Química, São Paulo, S.P., Brasil

6.4 AVALIAÇÃO

6.4.1 Exame clínico

Diariamente foram realizados exames físicos e inspeção da ferida até a retirada dos pontos. Após este período, os animais foram avaliados cotidianamente quanto ao seu comportamento até o final do experimento.

A ferida cirúrgica foi higienizada sempre que o membro foi manipulado e os animais se mantiveram com bandagem restritiva durante todo o experimento. Ao 60º dia de pós-operatório, a bandagem foi realizada de modo que os ovinos apoiassem o casco no chão, com a presença de uma tala plantar na altura da sobreunha dos animais. A bandagem foi mantida desta forma até o 90º dia de pós-operatório, com higienizações e troca de material de bandagem regularmente (Figura 4).

Figura 4 - Bandagens utilizadas no pós-operatório

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Bandagem abaixo da articulação femorotibiopatelar e os cascos posicionados em pinça, utilizada no pós-operatório imediato até o 60º dia e pós-operatório. A bandagem está recoberta com atadura e fita plástica para evitar umidade e sujidades (A), bandagem com uma tala em região plantar e com os cascos em apoio. Esta bandagem foi utilizada do 60º dia até o 90º dia de pós-operatório.

Durante este período, os ovinos foram submetidos aos exames de imagem por 15, 30, 60 e 90 dias. Após a eutanásia, os membros operados foram coletados e os fragmentos de interface osso/falha e osso/biomaterial foram processados para análise de microscopia eletrônica de varredura.

6.4.2 Avaliação Densitométrica

Foram realizadas projeções mediolateral e caudocranial para avaliar o implante metálico, o osso e a falha óssea, porém, apenas a projeção caudocranial foi utilizada para as análises densitométricas, devido à interferência do implante metálico nas projeções lateromedial. Não foi possível diferenciar os grupos tratados nas imagens.

Para a análise densitométrica, os animais foram submetidos às projeções radiográficas caudocranial com aparelho digital¹³. A técnica de exposição radiográfica foi de 80 kV (Quilovolts) e tempo de exposição de 1,6 mAs (Miliamperes por segundo) em uma distância de um metro, entre o placa e o emissor. As projeções foram realizadas no pré-operatório, pós-operatório imediato, e após 15, 30, 60 e 90 dias (D) de pós-operatório (Figuras 5 e 6).

12 JOB X - Ray®, 380 HF, Job do Brasil® São Paulo, Brasil

Figura 5 - Imagens radiográficas do pré-operatório e pós-operatório imediato do grupo controle

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Projeções mediolateral (A) e caudocranial (B) realizadas no pré-operatório e projeção mediolateral (C) e caudocranial (D) realizadas no pós-operatório imediato da confecção da falha. Ressalta-se a presença do penetrômetro de 25 graus em todas as imagens para a realização da densitometria convencional. Imagens do grupo controle.

Figura 6 - Imagens radiográficas do pré-operatório e pós-operatório imediato dos grupos com implante de biomaterial

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Projeções mediolateral (A) e caudocranial (B) realizadas no pré-operatório e projeção mediolateral (C) e caudocranial, com destaque no biomaterial implantado (seta azul) (D) realizadas no pós-operatório imediato. Ressalta-se a presença do penetrômetro de 25 graus em todas as imagens para a realização da densitometria convencional. Imagens do grupo biomaterial. Ao exame radiográfico não foi possível diferenciar o grupo biomaterial e biomaterial associado à célula-tronco.

Para a padronização da técnica e interpretação da densidade mineral óssea foi utilizado o *Software Image J 1.48v®* e uma escala de alumínio (penetrômetro de 25 graus), usada como referencial densitométrico, que foi denominada como método convencional. Cada degrau foi numerado de 0 a 25 (menos radiopaco, para o mais radiopaco) do penetrômetro e admitido um valor de densidade em milímetro de

alumínio (mmAl), que foi computado em um *software*¹⁴. A região da falha também foi selecionada para mensurar o valor de escala de cinza (Figura 7). Todos esses valores foram submetidos à função “tendência” do *software*⁸ e foi obtido o número do degrau para cada projeção durante o período. Esta metodologia foi detalhadamente descrita por Selim (2013) no qual apenas o formato da imagem foi alterado de *Joint Photographics Experts Group* (JPEG) para *Digital Imaging and Communications in Medicine* (DICOM), para melhor definição de imagem.

Figura 7 - Ilustração da imagem sendo processada no Image J 1.48v®

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Imagem em formato DICOM, com a ferramenta de seleção do programa *Image J* na falha óssea (seta vermelha) e no degrau denominado 9 (seta azul). Esta imagem é referente a uma ovelha do grupo controle.

¹⁴ Microsoft Office Excel 2010 ®.

Com as mesmas imagens radiográficas, a densitometria também foi analisada pelo *software e-film*¹⁵, onde a densidade foi interpretada pelo programa por *pixels*, denominado como método digital (Figura 8).

Figura 8 -Ilustração da imagem sendo processada no e-filmTM

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Imagem em formato DICOM, ilustrando a ferramenta de seleção do programa *e-film* na falha óssea (círculo verde) e os respectivos valores encontrados.

6.4.3 Avaliação Ultrassonográfica

Para avaliação ultrassonográfica foi utilizado o aparelho ultrassonográfico¹⁶ na frequência 12 MHz, com ganho superior a 79%. Esta avaliação foi realizada por dois avaliadores por meio de dois *scores* abaixo (Quadros 1 e 2):

¹⁵ E-film™ 3.3 Workstation

¹⁶ MyLab™ 30Gold VET

Quadro 1 - Classificação quanto ao conteúdo da falha óssea

ESCORE	DESCRIÇÃO
0	Completa passagem de ondas pela falha óssea (falha anecogênica)
1	Heterogenicidade difusa com material <u>pouco denso</u> (menos de 25% de material ecogênico)
2	Heterogenicidade difusa com material <u>denso</u> (mais de 50% de material ecogênico)
3	Heterogenicidade difusa com material <u>muito denso</u> (mais de 75% de material ecogênico)
4	<u>Não há</u> passagem de ondas pela falha óssea (100% de material ecogênico)
5	Material hiperecogênico impossibilitando a avaliação da falha com sombra acústica

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Quadro 2 - Classificação quanto aos bordos da falha óssea

ESCORE	DESCRIÇÃO
0	<u>Ausência</u> de proliferação periosteal e <u>ausência</u> de arredondamento dos bordos
1	Proliferação periosteal e irregularidade óssea
2	Arredondamento dos bordos <u>sem</u> proliferação óssea
3	Arredondamento dos bordos <u>com</u> proliferação óssea
4	Arredondamento dos bordos com <u>intensa</u> proliferação óssea

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Ainda, caso houvesse presença de seroma, celulite, hematomas, cistos, suspeita de osteomielites ou fraturas durante o período de avaliação, seriam identificadas, descritas e acompanhadas no pós-operatório de todos os grupos.

Na tentativa de identificar alteração na vascularização no processo da regeneração óssea, foi realizado o escaneamento da falha no modo *power doppler*, na frequência 6.6 MHz, com ganho superior a 79%, sob duas PRF de 1,2 kHz e 1,4 kHz no mesmo aparelho. Estas imagens foram realizadas em corte longitudinal e a orientação do bordo cranial da falha, sempre à esquerda da imagem. Por meio de vídeos confeccionados no momento da avaliação, as imagens também foram submetidas a dois avaliadores com o seguinte escore (Quadro 3).

Quadro 3 - Classificação quanto ao sinal ultrassonográfico *power doppler*

ESCORE	DESCRIÇÃO
0	Ausência de sinal <i>doppler</i>
1	Presença de sinal <i>doppler</i>
2	Presença intensa de sinal <i>doppler</i>

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

6.4.4 Avaliação Termográfica

Em todo o período estudado, este foi o primeiro exame a ser realizado após a remoção da bandagem para evitar manipulação do membro devido aos outros exames e evitar a interferência na temperatura. Atentou-se também em realizar o exame no mesmo local em todas as coletas e no mesmo horário.

As avaliações termográficas foram realizadas a partir da aquisição das imagens com a termocâmera¹⁷ e foram submetidas ao programa *FLIR*¹⁸ e avaliadas sob a variação de temperatura mínima e máxima, e a média. Com o ovino contido em decúbito lateral, foi obtida a imagem mediolateral do membro a ser estudado. Após colocar o animal em decúbito, a bandagem restritiva foi removida, e após 30 minutos sem qualquer manipulação do membro a imagem foi capturada (Figura 9).

A área selecionada para avaliação de temperatura foi determinada individualmente, de acordo com a posição e ângulo de obtenção da imagem.

¹⁷ FLIR T440®

¹⁸ *FLIR Quick Report 1.2 (Flir Systems, 2009)*

Figura 9 - Imagem da avaliação termográfica

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Imagem do programa FLIR Quick Report 1.2 (Flir Systems, 2009) com a seleção da área que foi avaliada (formato oval, cor preta). Ao lado direito da figura, na tabela, estão expostos os valores mínimo, máximo e a média que foi utilizada na análise. Esta imagem foi capturada de um ovino do grupo com biomaterial, em 15 dias de pós-operatório.

6.4.5. Avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura

Após eutanásia, os fragmentos foram coletados de modo que obtivesse amostras da interface entre o biomaterial e o osso remanescente. Os fragmentos foram divididos no eixo longitudinal e sequencialmente transversal, de modo que dois fragmentos com interface falha/biomaterial e osso fossem fixados e processados (Figura 10). O grupo controle foi incorporado de forma distinta dos demais grupos com o objetivo de preservar o biomaterial para análise da microscopia eletrônica. O processamento de cada grupo está exposto no ANEXO B.

Figura 10 - Fragmento ósseo coletado após eutanásia

Fonte: (PARETSIS, N.F.; 2020).

Nota: Fragmento ósseo do grupo biomaterial coletado após eutanásia. Fragmento seccionado no eixo sagital. O canhão da agulha indica a região cranial do membro (A). O fragmento foi dividido ao meio, transversalmente para o processamento da MEV (B). Em ambas as fotos, evidencia-se o biomaterial de coloração enegrecida.

6.5 ESTATÍSTICA

A análise de dados foi realizada utilizando-se o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) version 19. As variáveis qualitativas ordinais (“conteúdo da falha” e “sinais *doppler*”) foram analisadas por meio de testes não-paramétricos. O efeito principal de grupo, adotando-se três grupos, foi avaliado por meio do teste de Kruskal-Wallis, e quando significativo, as diferenças foram localizadas utilizando-se o teste de Mann-Whitney (GC x BIO, GC x CT e BIO x CT). O teste de Friedman permitiu a avaliação do efeito principal de tempo, e quando presente, os tempos pós-intervenção (D15, D30, D60 e D90) foram comparados ao pós-operatório imediato com o teste de Wilcoxon. A associação da variável qualitativa binomial, “bordos da falha” com os grupos foi realizada utilizando-se o teste qui-quadrado, em cada momento do estudo. A avaliação da concordância pelo teste

Kappa possibilitou a avaliação do grau de associação entre os avaliadores 1 e 2, para as variáveis “conteúdo da falha”, “sinais *doppler*” e “bordos da falha”.

Para a avaliação dos dados quantitativos (temperaturas máxima, mínima e média e densitometria convencional e digital), inicialmente uma análise descritiva foi realizada, sendo a média e o desvio-padrão utilizados como medidas de tendência central e dispersão, respectivamente. A distribuição dos dados foi checada por meio do teste de Kolmogorov–Smirnov com nível de significância de 5%. As variáveis que apresentaram distribuição não linear foram submetidas a transformações numéricas do tipo, inversa, log ou raiz quadrática.

Para avaliação do efeito de grupos, tempo e interação grupo X tempo o modelo linear misto foi utilizado. Os fatores grupo e tempo foram inseridos no modelo linear como efeitos fixos, e o fator sujeito (animal) como efeito aleatório. As estruturas de covariância *autoregressive* (AR), *symmetric component* (SC) e *unstructured* (UN) foram testadas com base no *akaike information criterion*, e, portanto, as matrizes com os menores valores foram escolhidas. O comando EMEANS com o teste de Bonferroni permitiu a obtenção das comparações dos efeitos principais. Adotou-se $p < 0,05$ para as diferenças estatísticas. A análise da associação entre as densitometrias foi realizada com o programa R Studio versão 3.6.1 utilizando-se um modelo de correlação para medidas repetidas (rmcorr).

7. RESULTADOS

7.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E EXAME FÍSICO

Todos os animais se mantiveram estáveis em todo o período estudado. Não houve necessidade de substituir nenhum dos ovinos do experimento ou administrar qualquer outro fármaco diferente do que foi descrito no delineamento experimental. Não foi identificado foco de infecção ou deiscência de sutura em nenhuma das ovelhas operadas.

O procedimento cirúrgico foi realizado sem intercorrências em todos os animais. Apenas um ovino apresentou paralisia do membro anterior direito no pós-operatório imediato. Acredita-se que foi devido ao posicionamento em decúbito lateral no transoperatório. Com as sessões de eletroacupuntura na região, foi possível reverter o quadro em sete dias e o ovino se manteve no experimento.

O exame físico dos animais durante o pós-operatório foi apresentado no APÊNDICE C.

7.2 ASPECTOS RADIOGRÁFICOS E ANÁLISE DENSITOMÉTRICA

7.2.1 Exame radiográfico frente ao biomaterial

No exame radiográfico no 15º de dia pós-operatório, observou-se que dos 12 animais em que foi implantado o biomaterial (BIO e CT) em 10, o biomaterial se deslocou do defeito ósseo e/ou fragmentou (Figura 11)

Figura 11 - Projeção mediolateral da tíbia com a presença do biomaterial de estudo

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Projeção mediolateral do membro operado no qual demonstra-se o deslocamento do biomaterial (A) e fragmentação (seta azul). Imagem ampliada (B).

No exame radiográfico, o biomaterial apresentou discreta radiopacidade, passível de delimitar e identificá-lo em todas as imagens obtidas. Optou-se por não excluir a densidade do biomaterial neste estudo, devido as propriedades da matéria-prima no qual o tecido neoformado poderia estar entremeado ao biomaterial.

Ainda assim, foi possível observar aumento de radiopacidade no defeito ósseo por tempo no BIO e CT em alguns animais (Figuras 12 e 13), antes mesmo de mensurar a densitometria da área de interesse. Este aumento de radiopacidade não foi observado em nenhuma ovelha do GC (Figura 14).

Figura 12 - Estudo completo de um ovino do grupo biomaterial

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Projeção caudocranial de um ovino do grupo com biomaterial no pré-operatório (A); pós-operatório imediato (B); 15 dias de pós-operatório (C); 30 dias de pós-operatório (D); 60 dias de pós-operatório (E) e 90 dias de pós-operatório (F). Destaca-se a presença do biomaterial no defeito ósseo (seta verde).

Figura 13 - Estudo completo de um ovino do grupo biomaterial associado à célula-tronco

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Projeção caudocranial de um ovino do grupo com biomaterial associado à célula-tronco no pré-operatório (A); pós-operatório imediato (B); 15 dias de pós-operatório (C); 30 dias de pós-operatório (D); 60 dias de pós-operatório (E) e 90 dias de pós-operatório (F). Destaca-se a presença do biomaterial nas imagens após a confecção do defeito (seta amarela) e nota-se aspecto radiográfico semelhante ao grupo com apenas o biomaterial, sem adição da célula-tronco.

Figura 14 - Estudo completo de um ovino do grupo controle

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Projeção caudocranial de um ovino do grupo com implante de controle no pré-operatório (A); pós-operatório imediato (B); 15 dias de pós-operatório (C); 30 dias de pós-operatório (D); 60 dias de pós-operatório (E) e 90 dias de pós-operatório (F). Destaca-se a presença da confecção do defeito (seta azul). Nota-se que não é possível identificar aumento de radiopacidade no local do defeito ósseo em nenhum período estudado.

7.2.2 Análise densitométrica

A análise de modelo linear misto revelou efeito principal de grupo para as variáveis “densitometria convencional” (DC) e “densitometria digital” (DD), sendo o grupo controle inferior aos demais (Gráfico 1, Tabela 1). As distribuições das densitometrias foram descritas no APÊNDICE D.

Gráfico 1- Média e desvio-padrão da densitometria de acordo com os grupos

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: DD= densitometria digital (média de *pixels*); DC= densitometria convencional (mmAl); GC= grupo controle; BIO= grupo biomaterial; CT= grupo biomaterial associada à célula-tronco. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos, de acordo com o teste de Bonferroni.

Tabela 1 - Média e desvio padrão das densitometrias digital e convencional de acordo com os grupos e efeitos principais

	GC	BIO	CT	Tempo	Grupos	Tempo x grupos
DD	651,31±231,63a	872,36±203,09b	854,86±205,63b	0,000	0,000	0,062
DC	4,87±3,48a	7,46±2,75b	7,51±2,46b	0,000	0,000	0,003

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: DD = densitometria digital (média de *pixels*); DC = densitometria convencional (mmAl) GC = Grupo controle; BIO = grupo com biomaterial na falha óssea; CT = grupos com biomaterial associado à célula-tronco; Letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças entre grupos.

O efeito de interação tempo x grupo foi significativo para a variável DC, e a análise *post hoc* revelou que o grupo controle apresentou medidas menores que os demais no D60 e D90 ($p= 0,001$ e $p= 0,001$ respectivamente, destacados na tabela 1), e detalhados na Tabela 2 e Gráfico 2.

Tabela 2 - Média e desvio-padrão da densitometria convencional de acordo com os grupos e tempos

	D0	D1	D15	D30	D60	D90	p-valor
DC GC	11,67±1,63a	3±1,53bc	5,11±1,41b	5,47±1,79b	1,4±1,64Ac	3,72±1,72Abc	0,001
BIO	11,18±0,83a	5,37±1,66b	6,32±3,2b	6,85±3,14b	7,44±1,49Bab	7,59±1,8Bab	0,001
CT	11,38±1,54a	4,41±0,8b	6,74±0,86bc	7,65±1,5c	7,24±2,04Bcd	7,64±1,33Bce	0,001
p-valor	0,927	0,072	0,258	0,104	0,000	0,000	

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: GC = grupo controle; BIO = grupo com biomaterial na falha óssea; CT = grupo com biomaterial associado à célula-tronco; D = dias. Letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças entre os tempos, enquanto as maiúsculas indicam diferenças entre grupos em um mesmo tempo.

Gráfico 2- Média e desvio-padrão da densitometria convencional de acordo com os grupos experimentais

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: * = indica diferença entre grupos, em dias específicos $p < 0,05$; GC = grupo controle; BIO = grupo com biomaterial na falha óssea; CT = grupo com biomaterial associado à célula-tronco; D = dias.

O efeito principal do tempo foi significativo para as duas variáveis, e de forma geral houve redução das medidas após a intervenção (D1 em relação ao D0), e estabilização nos momentos subsequentes (Gráfico 3 e Tabela 3). A variável DC, registrou aumento significativo no D30 em relação ao D1.

Gráfico 3 - Média e desvio-padrão da densitometria digital (DD), e densitometria convencional (DC), de acordo com os tempos

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: DD = densitometria digital (média de *pixel/s*); DC = densitometria convencional (mmAl); D= dias.

Tabela 3 - Média e desvio padrão da densitometria convencional e densitometria digital de acordo com os tempos

	D0	D1	D15	D30	D60	D90	p-valor
DD	1089,44±158,67a	711,01±143,35b	766,48±146,27b	812,09±173,11b	679,74±277,21b	707,22±217,31b	0,001
DC	11,39±1,29a	4,26±1,64b	6,06±2,08bc	6,66±2,31c	5,36±3,31bc	6,32±2,43bc	0,001

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: DD = densitometria digital (média de *pixel/s*); DC = densitometria convencional (mmAl); Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças entre os tempos. D = dias.

A análise de correlação revelou associação significativa e positiva entre as densitometrias digital e convencional, com coeficiente de correlação (*r*) igual a 0,751 (concordância substancial), e intervalo de confiança igual a 0,641-0,831; *p*= 0,001 (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Associação entre a densitometria digital e convencional usando modelo para medidas repetidas

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

7.3 ANÁLISE ULTRASSONOGRÁFICA

7.3.1 Análise ultrassonográfica frente o biomaterial

No exame ultrassonográfico, todas as imagens foram obtidas apenas com uma janela ultrassonográfica, devido à presença do implante metálico. Esta janela foi localizada na tíbia, na altura do defeito ósseo, na face dorsomedial. A orientação da imagem foi longitudinal ao membro com: esquerda do coto ósseo cranial e direita, do coto ósseo caudal. Nos grupos que apresentavam biomaterial (BIO e CT), não foi possível avaliar o conteúdo da falha como inicialmente proposto, pois o biomaterial é hiperecogênico. Em contrapartida, foi possível delimitar e avaliar os cotos ósseos cranial e caudal e sua relação com o biomaterial nos dois grupos de estudo (Figura 15).

Figura 15 - Janela ultrassonográfica em corte longitudinal do grupo biomaterial

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Imagem ultrassonográfica de corte longitudinal com 15 dias de pós-operatório, grupo com biomaterial. Na ilustração, destaca-se com seta azul os cotos ósseos cranial à esquerda da imagem e caudal, à direita da imagem. A chave de cor vermelha delimita o biomaterial fazendo sombra acústica no conteúdo da falha óssea. A hiperecogenicidade do biomaterial impossibilita avaliar o conteúdo do defeito ósseo.

Assim como identificado no exame radiográfico, foi possível observar a fragmentação do biomaterial a partir do 15º dia de pós-operatório no exame ultrassonográfico (Figura 16).

Figura 16 - Imagem ultrassonográfica de corte longitudinal, grupo biomaterial

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Imagem ultrassonográfica de corte longitudinal, grupo com biomaterial. Na ilustração, destaca-se com seta azul os cotos ósseos. Com a seta vermelha, destaca-se imagem anecoica, impossibilitando a visualização do conteúdo. A seta verde aponta para os fragmentos do biomaterial no defeito ósseo.

Não foi possível diferenciar os grupos BIO e CT apenas com as imagens. Para exemplificar, foi exposto um exame ultrassonográfico completo de cada grupo disponível no APÊNDICE E.

7.3.2 Análise por escore ultrassonográfico

Quanto aos avaliadores, a análise da variável “conteúdo da falha”, para o avaliador 1, revelou diferença entre grupos nos seguintes momentos: pós-operatório imediato; D30; D60; D90 (Tabela 4 e Gráficos 5A e 5B).

No pós-operatório imediato, a mediana do grupo CT foi maior em relação ao grupo GC. Nos momentos D30, D60 e D90, os valores para os grupos BIO e CT foram maiores em relação ao GC. As mesmas diferenças foram observadas para o avaliador 2 (Tabela 4 e Gráficos 5A e 5B). Para o avaliador 2, o grupo BIO apresentou variação ao longo do tempo ($p=0,046$). Nas comparações múltiplas não foi possível observar diferenças entre os tempos.

Tabela 4 - Mediana (valores mínimo/máximo) do “conteúdo da falha” e “sinais *doppler*” de acordo com os grupos e avaliadores

			PRE	POS	D15	D30	D60	D90	P-valor
Conteúdo da falha	Avaliador 1	GC	4(4/4)	1,5(0/2)a	1(1/2)	2(0/2)a	1,5(1/2)a	1(0/2)a	0,518
		BIO	4(4/4)	5(0/5)ab	3(0/5)	5(0/5)b	5(5/5)b	5(5/5)b	0,124
		CT	4(4/4)	5(5/5)b	5(1/5)	5(5/5)b	5(5/5)b	5(5/5)b	0,092
		P-valor	1,000	0,006	0,085	0,004	0,000	0,000	
	Avaliador 2	GC	0(0/0)	1(1/1)a	1(1/1)	1(1/2)a	1(1/1)a	1(1/1)a	0,406
		BIO	0(0/0)	5(2/5)b	3,5(0/5)	5(5/5)b	5(5/5)b	5(5/5)b	0,046
		CT	0(0/0)	5(1/5)b	5(1/5)	5(1/5)b	5(5/5)b	5(5/5)b	0,406
		P-valor	-	0,002	0,081	0,002	0,000	0,000	
Sinais doppler	Avaliador 1	GC	0(0/0)	0(0/1)	1(1/1)	1(1/2)a	0,5(0/1)	0(0/0)	0,056
		BIO	0(0/0)	0,5(0/1)	1(0/2)	0(0/1)b	0(0/1)	0(0/1)	0,406
		CT	0(0/0)	0,5(0/1)	1(1/2)	1(1/2)a	1(0/2)	1(0/1)	0,339
		Sig	-	0,951	0,247	0,01	0,555	0,088	
	Avaliador 2	GC	0(0/0)	0,5(0/1)	1(1/2)	1(1/1)a	1(0/1)	1(0/1)	0,406
		BIO	0(0/0)	0(0/0)	0,5(0/2)	0(0/1)b	0(0/2)	0(0/1)	0,511
		CT	0(0/0)	0(0/0)	1(1/2)	1,5(1/2)a	1(0/2)	1(0/1)	0,053
		p-valor		0,185	0,5	0,012	0,484	0,268	

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: GC = grupo controle; BIO = grupo com biomaterial na falha óssea; CT = grupo com biomaterial associado à célula-tronco; D = dias. Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$); * = diferença estatística em relação ao pós-operatório imediato pelo teste de Wilcoxon.

Gráfico 5 - Mediana e intervalo interquartil do “conteúdo da falha” de acordo com os grupos e avaliadores

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: * = indica diferença entre grupos, em dias específicos $P < 0,05$; GC = grupo controle; BIO = grupo com biomaterial na falha óssea; CT = grupo com biomaterial associado à célula-tronco.

Quanto a avaliação dos “sinais *doppler*”, as diferenças entre grupos foram observadas no D30, para ambos os avaliadores. Para os dois avaliadores o grupo BIO apresentou menores valores em relação aos grupos GC e CT (Tabela 4 e Gráficos 6A e 6B).

Gráficos 6 - Mediana e intervalo interquartil dos “sinais *doppler*” de acordo com os grupos e avaliadores

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: * = indica diferença entre grupos, em dias específicos $p < 0,05$; GC = grupo controle; BIO = grupo com biomaterial na falha óssea; CT = grupo com biomaterial associado à célula-tronco.

Na avaliação dos “bordos da falha”, a análise dos resultados obtidos pelo avaliador 1 revelou associação com os grupos no D90 ($p=0,027$). O grupo CT apresentou maior frequência para a categoria 2 (67%) em relação aos grupos BIO e GC, com frequência de 17 e 0%, respectivamente (Tabelas 5 e 6 e Gráfico 7).

Tabela 5 - Frequência das alterações nos “bordos da falha” de acordo com os grupos e tempos do avaliador 1

	GC		BIO		CT		Qui-quadrado
	Número	Percentual	Número	Percentual	Número	Percentual	
POS	0 6	100%	6	100%	6	100%	-
D15	0 3	50%	4	67%	4	67%	0,792
	1 3	50%	2	33%	2	33%	
D30	0 1	17%	1	17%	2	33%	0,744
	1 3	50%	1	17%	2	33%	
	2 1	17%	1	17%	0	0%	
	3 1	17%	3	50%	2	33%	
D60	1 1	17%	1	20%	1	17%	0,998
	2 2	33%	2	40%	2	33%	
	3 3	50%	2	40%	3	50%	
D90	2 0	0%	1	17%	4	67%	0,027
	3 6	100%	5	83%	2	33%	

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: 0 = Ausência de irregularidades ósseas e ausência arredondamento dos bordos; 1 = Proliferação periosteal e irregularidades óssea; 2 = Arredondamento dos bordos sem proliferação óssea; 3 = Arredondamento dos bordos com proliferação óssea; GC = grupo controle; BIO = grupo com biomaterial na falha óssea; CT = grupo com biomaterial associado à célula-tronco.

Tabela 6 - Frequência das alterações nos “bordos da falha” de acordo com os grupos e tempos do avaliador 2

	GC		BIO		CT		Qui-quadrado
	Número	Percentual	Número	Percentual	Número	Percentual	
POS	0 6	100%	6	100%	6	100%	-
D15	0 6	100%	6	100%	6	100%	-
D30	0 5	83%	6	100%	4	67%	0,301
	2 1	17%	0	0%	2	33%	
D60	0 0	0%	2	33%	0	0%	0,199
	1 1	17%	0	0%	0	0%	
	2 4	67%	4	67%	6	100%	
	3 1	17%	0	0%	0	0%	
D90	0 0	0%	1	17%	0	0%	0,389
	2 5	83%	5	83%	6	100%	
	3 1	17%	0	0%	0	0%	

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: 0 = Ausência de irregularidades ósseas e ausência arredondamento dos bordos; 1 = Proliferação periosteal e irregularidades óssea; 2 = Arredondamento dos bordos sem proliferação óssea; 3 = Arredondamento dos bordos com proliferação óssea; GC = grupo controle; BIO = grupo com biomaterial na falha óssea; CT = grupo com biomaterial associado à célula-tronco.

Gráfico 7 - Frequência das alterações nos “bordos da falha” de acordo com os grupos e avaliador 1 no D90

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: 2 = Arredondamento dos bordos sem proliferação óssea; 3 = Arredondamento dos bordos com proliferação óssea; GC = grupo controle; BIO = grupo com biomaterial na falha óssea; CT = grupo com biomaterial associado à célula-tronco.

Na avaliação da concordância (teste kappa), os avaliadores apresentaram resultados significativos para as três variáveis “conteúdo da falha”, “sinais *doppler*” e “bordos da falha”. O coeficiente de concordância Kappa para o “conteúdo da falha” foi de 0,620, para os “sinais *doppler*” foi de 0,695, enquanto para “bordos da falha”, com menor valor, o coeficiente foi de 0,276, indicando concordância razoável. A classificação está apresentada no APÊNDICE D.

7.4 AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA

As temperaturas máxima, mínima e média obtidas com a termografia apresentaram distribuição não linear, não adequando ao modelo proposto. Para o tratamento estatístico fez-se necessário a transformação com o uso da inversa, possibilitando assim, uma distribuição adequada para o modelo (APÊNDICE D).

A análise do modelo linear misto para as medidas termográficas revelou efeito principal de grupo para as variáveis “temperatura máxima” e “temperatura média” (Tabela 7 e Gráfico 8), sendo o grupo CT superior ao GC. O efeito de interação tempo

x grupo foi significativo para a variável “temperatura mínima”, e a análise *post hoc* revelou diferenças em D30 e D60 ($p=0,019$ e $p=0,015$, respectivamente). Os valores mensurados foram apresentados no Gráfico 9.

Tabela 7 - Média e desvio padrão das temperaturas máxima, mínima e média da termografia de acordo com os grupos e efeitos principais

	GC	BIO	CT	Tempo	Grupos	Tempo x grupos
Máxima	35,91±3,3a	36,28±3,2ab	36,6±3,48b	0,000	0,008	0,181
Mínima	29,03±4,2	28,42±5,35	29,07±5,46	0,000	0,517	0,011
Média	33,54±4,23a	33,48±4,71ab	34,19±4,94b	0,000	0,007	0,086

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: GC = Grupo controle; BIO = grupo com biomaterial na falha óssea; C = grupos com biomaterial associado à célula-tronco; Letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças entre grupos.

Gráfico 8- Média e desvio padrão das temperaturas máxima, mínima e média da termografia de acordo com os grupos e efeito principal de grupo

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: GC = Grupo controle; BIO = grupo com biomaterial na falha óssea; C = grupos com biomaterial associado à célula-tronco; Letras minúsculas entre as colunas indicam diferenças entre grupos.

Em D30 a temperatura mínima do grupo CT foi maior que a do grupo BIO, entretanto, tais diferenças não se estenderam até D60, em que os valores de ambos os grupos CT e BIO foram maiores em relação ao GC (Tabela 8 e Gráfico 9)

Tabela 8 - Média e desvio-padrão das temperaturas máxima, mínima e média da termografia de acordo com os grupos e tempos

		D1	D15	D30	D60	D90	p-valor
Mínima	GC	23,23±3,59a	32,32±1,56b	31,11±0,9ABb	26,67±2,1Aa	31,44±2,83b	0,001
	BIO	19,02±2,27a	32,51±1,92b	28,62±2,6Ac	30,94±1,41Bbc	31,01±2,59bc	0,001
	CT	18,87±1,73a	31,84±1,39b	31,66±1,21Bb	30,91±2,56Bb	32,08±1,7b	0,001
p-valor		0,078	0,680	0,019	0,015	0,895	

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: GC = grupo controle; BIO = grupo com biomaterial na falha óssea; CT = grupo com biomaterial associado à célula-tronco; D = dias. Letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças entre os tempos, enquanto as maiúsculas indicam diferenças entre grupos em um mesmo tempo.

Gráfico 9 - Média e desvio-padrão da temperatura média, mínima e máxima obtidas

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: * = indica diferença entre grupos, em dias específicos $p < 0,05$; GC = grupo controle; BIO = grupo com biomaterial na falha óssea; CT = grupo com biomaterial associado à célula-tronco.

Houve uma mudança significativa para as três variáveis termográficas no efeito tempo, com aumento significativo após a intervenção (D15), seguido por uma diminuição e estabilização das medidas em D30 e D60, respectivamente (Tabela 9 e Gráfico 10).

Tabela 9 - Média e desvio padrão das temperaturas máxima, mínima e média da termografia de acordo com os tempos

	D0	D1	D15	D30	D60	D90	p-valor
T. Máxima		30,19±2,06a	38,28±0,65b	37,29±0,84c	37,64±0,9bc	38,02±0,79bc	0,001
T. Mínima		20,37±3,24a	32,22±1,57b	30,46±2,13c	29,67±2,79c	31,51±2,32bc	0,001
T. Média		25,22±2,63a	36,74±0,75b	35,32±1,13c	35,46±1,41c	36,06±1bc	0,001

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: T = temperatura; Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças entre os tempos. D = dias

Gráfico 10- Média e desvio padrão das temperaturas máxima, mínima e média da termografia de acordo com os tempos

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: D= Dias; Letras diferentes indicam diferenças entre os momentos $p < 0,05$.

7.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

No GC, foi observado irregularidades na superfície do tecido evidenciando tecido ósseo primário em remodelação, com áreas de neoformação e de reabsorção. Nestas amostras não foi possível identificar a interface da falha segmentar (Figura 17).

Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura nos fragmentos obtidos do grupo controle

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Observa-se tecido ósseo primário evidenciando irregularidades em superfície e espaços medulares irregularmente dispostos. Não é possível identificar com exatidão a interface da falha segmentar com o osso remanescente; aumento de 200X (A); com maiores detalhes, observa-se áreas de neoformação (superfície rugosa/ seta preta) e de reabsorção (superfícies lisas/ seta laranja); aumento de 1000x (B).

Nas amostras do grupo BIO, examinando diferentes planos, foi possível identificar tanto tecido ósseo neoformado como presença do biomaterial. O osso neoformado foi evidenciado com superfície irregular, semelhante ao do grupo controle, sendo também compatível com osso primário (Figura 18).

Figura 18 - Microscopia de varredura do grupo com biomaterial

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Presença do biomaterial (**) e de osso neoformado (*) em diferentes planos, aumento de 500x (A). Foco no tecido neoformado com aspecto irregular e desorganizado, característico de osso primário (seta azul) e em outro plano posterior, o biomaterial (**), aumento de 1200x (B).

Neste mesmo grupo, em outros fragmentos foi possível observar a presença do osso pré-existente, do osso neoformado e do biomaterial, todos no mesmo plano. O osso neoformado apareceu semelhante a uma “ponte” entre o osso pré-existente e o biomaterial, em íntimo contato com ambos (Figura 19).

Figura 19 - Interação do biomaterial, tecido remanescente e tecido neoformado no grupo biomaterial por microscopia eletrônica de varredura

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: O osso neoformado se apresenta como uma “ponte” (seta azul) entre o osso pré-existente (*) e o biomaterial (**), aumento de 1200x (A); a mesma região em maior aumento, observa-se o osso pré-existente (*) e os grânulos do biomaterial sobre o tecido neoformado (**), aumento de 2500x (B).

Nas amostras do grupo CT, foi possível identificar a transição entre o osso remanescente e osso primário em formação, com diferenças de características de superfícies evidentes. Em alguns fragmentos, houve a presença de um *gap*, uma fenda entre o biomaterial e o tecido neoformado (Figura 20).

Figura 20 - Fragmentos obtidos das amostras do biomaterial associado à célula-tronco

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Destaque na transição do osso primário desorganizado (**) e do osso pré-existente, mais compacto e organizado (*) na amostra dos grupos biomaterial associada com célula-tronco, aumento de 150x (A). Evidencia-se uma lacuna (flecha amarela) na interface entre o osso neoformado (**) e o biomaterial (*), aumento de 100x (B).

Nos grupos com biomaterial (BIO e CT), verificou-se a presença do biomaterial em todas as amostras processadas. Propõe-se a identificação da matéria-prima do biomaterial como a quitosana semelhante a pétalas e a hidroxiapatita em formato de grânulos. No entanto, o nanotubo de carbono não foi possível de ser identificado nas amostras. Para complemento de estudo, apenas o biomaterial esterilizado foi processado, ou seja, sem estar implantado no ovino. Nesta amostra, o biomaterial se encontrou idêntico aos pós-implante, porém, o biomaterial não foi considerado homogêneo (Figura 21).

Figura 21 - Biomaterial após 90 dias de implante e biomaterial esterilizado e processado para análise

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Biomaterial analisado encontrado nas amostras após 90 dias do implante, aumento de 1200x (A). Biomaterial esterilizado e processado para comparação, aumento de 500x (B). Sugere-se a identificação da matéria-prima como a quitosana, em formato de “pétalas” (**), e a hidroxiapatita em grânulos (seta amarela).

8 DISCUSSÃO

8.1 ASPECTOS GERAIS DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E EXAME FÍSICO

O manuseio do biomaterial deste estudo, devido ao seu aspecto friável dificultou sua manutenção no defeito ósseo segmentar. Em situação real de rotina, existem inúmeras configurações de fraturas e acredita-se que este biomaterial pode auxiliar a preencher as falhas ósseas, uma vez que é possível desfazer sua configuração inicial, umedecê-lo e modelá-lo. Esta possibilidade de manipulação pode ser considerada como vantagem em substitutos ósseos (BRYDONE; MEEK; MACLAINE, 2010). Neste estudo, não foi possível atribuir alguma deficiência no processo de regeneração óssea devido ao deslocamento do biomaterial neste estudo.

Nenhum dos animais do experimento foi substituído ou afastado, e os exames se mantiveram estáveis durante todo o período estudado. Estes fatos confirmam que este estudo seguiu as diretrizes da experimentação animal conhecida como os três “R” (*Refine, Reduce e Replace*) isto é, refinar, reduzir e substituir. Ou seja, utilizar o menor número de animais possível, refinamento definido como técnicas que minimizam o sofrimento do animal e substituir sempre que possível (AUER et al., 2007).

Acredita-se que o processo de regeneração óssea foi interrompido na fase de reparo aos 90 dias de pós-operatório. Esta afirmação pode ser confirmada em todos os métodos de imagem estudados que foram detalhados nas sessões a seguir.

8.2 ASPECTOS GERAIS DOS MÉTODOS DE IMAGEM FRENTE AO BIOMATERIAL

Os resultados deste experimento confirmam as informações de Rahimzdeh et al. (2014) e Auer; Stick (2011), no qual com a utilização de várias modalidades de exames de imagem, quando realizadas de forma seriada é possível acompanhar e determinar o processo de regeneração óssea. Pôde-se observar propriedades do biomaterial e a relação com o tecido receptor com os métodos utilizados nesse experimento. Cada exame com sua capacidade como por exemplo, a identificação da mineralização do tecido neoformado (ZILIOTTO et al., 2003) e degradação do

biomaterial no exame radiográfico (LEE, O. S.; LEE, K. J.; LEE, Y. S., 2017); a relação com o tecido ósseo adjacente e o biomaterial no exame ultrassonográfico (THURMÜLLER et al., 2002) ou até mesmo, a reação inflamatória do organismo frente ao biomaterial com o exame termográfico (REDAELLI et al., 2014).

Os resultados da MEV sugeriram boa interação entre o biomaterial e os exames de imagem. Embora essas informações sejam confirmadas apenas por métodos histológicos, capazes de avaliar a morfologia celular, a estrutura do tecido neoformado e a osteointegração (EMARA, S, A.; GADALLAH, S.M.; SHARSHAR, 2013; PARETSIS et al., 2017), é possível comprovar a capacidade dos exames de imagem em avaliar esta interação, inclusive comparar os diferentes grupos deste experimento.

8.3 ASPECTOS RADIOGRÁFICOS E DENSITOMETRIA

Devido à radiopacidade do biomaterial, observou-se discreto aumento de densidade dos grupos tratados (BIO e CT) comparados ao GC no pós-imediato. Definitivamente, não se pode atribuir este aumento de radiopacidade com tecido neoformado ou presença de mineralização. Na primeira análise do pós-operatório, registrou-se na densitometria convencional uma queda da densidade óssea devido à realização da falha óssea, e aumento significativo de densidade a partir do 30º dia de pós-operatório, em todos os grupos estudados. Estes dados condizem com a literatura, com o cenário do experimento e o processo de regeneração óssea, respectivamente (ZILIOTTO et al., 2003; NIEMEYER et al., 2010). Ressalta-se a importância de associar a situação clínica à densidade óssea, pois a densidade por si só pode gerar interpretações precipitadas como retratado por Field; Ruthenbeck (2018).

Após o D30, os grupos tratados (BIO e CT) se mantiveram com densidades semelhantes ao longo do tempo (efeito grupo X tempo). Este dado aponta para a suspeita de que o processo de biodegradação do biomaterial de estudo não ocorreu de forma significativa no período estudado, motivo pelo qual as taxas de degradação propostas por Lee, O. S.; Lee, K. J.; Lee, Y. S. (2017) não foram realizadas. Embora neste experimento não foi observado a degradação do biomaterial, estas informações confirmam que é possível acompanhar uma possível degradação do biomaterial pelo exame radiográfico.

Inúmeras técnicas podem ser encontradas na literatura para a obtenção da densitometria óssea com o objetivo de avaliar substitutos ósseos (DIAS et al., 2007; LINDEN et al., 2016; SELIM et al., 2018). Neste experimento, ao comparar duas técnicas de densitometria, foram observadas diferenças estatísticas na densitometria convencional (DC) de acordo com o grupo x tempo, o que não ocorreu na densitometria digital (DD). Ainda assim, foi possível comprovar a concordância substancial entre as densitometrias, ou seja, representam a densidade da área de interesse de forma equivalente, mesmo sendo escalas diferentes.

Desta forma, acredita-se que seja possível comparar a interpretação de diferentes métodos de densitometrias realizadas por exame radiográfico, desde que essa associação seja analisada e as imagens sejam feitas de forma padronizada.

8.4 ASPECTOS ULTRASSONOGRÁFICOS E AVALIAÇÃO POR ESCORE

Ao utilizar o exame ultrassonográfico para estudar a regeneração óssea *in vivo* com auxílio de determinado biomaterial, é comum encontrar o acompanhamento do conteúdo da falha óssea experimental (THURMÜLLER et al., 2002; NÓBREGA, 2014; FRANKLIN; BURKE; HOLMES, 2017). Porém, neste experimento não foi possível averiguar o processo de regeneração no conteúdo da falha, pois o biomaterial se apresentava hiperecogênico nas imagens e não degradou de forma evidente no período estudado. O mesmo ocorreu no experimento de Nóbrega (2014). Por este motivo, observa-se a alta frequência do escore 5 para os avaliadores e a diferença entre os grupos tratados (BIO e CT) comparado ao GC, no qual este preenchimento reflete apenas a presença do biomaterial.

Com base no que foi apresentado no parágrafo anterior, pode-se extrapolar esta informação e considerar que a biodegradação do biomaterial poderia ter sido avaliada através da imagem ultrassonográfica.

Foi possível identificar o biomaterial e os bordos ósseos com a presença de uma lacuna entre eles, nas interfaces proximal e distal em todas as análises de todos os grupos estudados. Entende-se que a interação entre o biomaterial e o tecido remanescente não foi evidenciado neste tipo de análise nos grupos BIO e CT. A presença de arredondamento dos bordos no D90 em todos os grupos neste experimento foi interpretada como fase de reparo de acordo com as outras análises

obtidas (densitometria, termografia e MEV) e não como a formação de não-união (AUGAT et al., 2014). Para confirmar esta afirmação, seria necessário acompanhar os animais por um período maior.

O escore descrito na metodologia foi interpretado diferente do “conteúdo da falha ou sinal *doppler*”, pois não segue uma escala ordinal, sendo apenas uma interpretação da imagem obtida. Foi analisado desta maneira visto que a imagem pode apresentar inúmeras interpretações quando fora de contexto. A proliferação periosteal por exemplo, ocorre no processo de regeneração óssea, assim como no remodelamento das mais diversas causas, além do mais, em excesso pode ser considerado prejudicial (AUER; STICK, 2012). Limitar a interpretação de uma imagem em escore para se tornar um dado mensurável é um desafio podendo ocorrer conflito nas interpretações, além de não explorar o valor informativo e qualitativo da imagem.

O sinal *doppler* foi utilizado para identificar e comparar a vascularização da área de interesse. Como apresentado no relato de Baccarelli (2017), no processo de regeneração óssea de uma fratura em ovino, a presença de sinal *doppler* foi facilmente identificada no 14° e 21° dias de pós-operatório e regressão após o 28° e 35° dias. Neste experimento, apenas para o avaliador 1 foi possível identificar aumento com diferença estatística de sinal *doppler* no 30° dia de pós-operatório. Acredita-se que o aumento de vascularização ocorreu tardiamente comparado ao estudo anterior, devido ao defeito considerado defeito-crítico.

No sinal *doppler*, o GC foi semelhante ao CT e menor que o BIO e considerando que as células mesenquimais apresentam capacidade de auxiliar na angiogênese (MEBARKI et al., 2017), esperava-se diferença entre os grupos tratados, porém, nesta análise a informação não pôde ser comprovada. Ainda, a ausência do sinal não reflete a ausência de vascularização local. Confirma-se este fato quando realizada esta análise no pré-operatório, não foi identificado nenhum sinal em todos os animais do experimento. Entretanto, isto não impede de identificar e acompanhar o processo de regeneração óssea por meio deste método.

8.5 TERMOGRAFIA

A temperatura é considerada um dos sinais de inflamação facilmente identificado na rotina clínica. Utiliza-se a termografia para torná-la mensurável. Foi observado aumento significativo na temperatura média e máxima do CT quando comparado com GC. Isto pode ser interpretado como aumento do processo inflamatório ou até mesmo neovascularização (REDAELLI et al., 2014; BARGIEL et al., 2019). Porém, na análise *doppler*, no efeito grupo, a temperatura foi maior no grupo BIO, o que não possibilita associar os dados neste estudo.

No trabalho de Marcondes et al. (2015), ao comparar os grupos ao longo do tempo, o pico de temperatura ocorreu em 14° e 21° dia de pós-operatório. No presente trabalho, este pico também ocorreu no 15° dia em todos os grupos. Como o 15° dia de pós-operatório foi a primeira análise, não se pode confirmar se este aumento de temperatura pode ter ocorrido antes deste período.

Foi observado aumento na temperatura mínima no CT comparado ao BIO e os grupos tratados (BIO e CT) maiores comparado ao GC no D30 e D60 (efeito grupo). Ao associar com os dados densitométricos, observa-se que no mesmo período estudado houve aumento de radiopacidade. Considera-se este aumento de temperatura relacionado ao processo de neoformação óssea.

Ao observar as temperaturas ao longo do tempo estudado (efeito grupo X tempo) considera-se estes dados favoráveis ao biomaterial associado ou não à célula-tronco, uma vez que nos grupos tratados havia a presença de um material exógeno e o comportamento do organismo foi semelhante ao GC. Caso houvesse rejeição ao implante ou até mesmo necrose do tecido, estes fatos seriam refletidos no aumento ou diminuição significativa de temperatura ao longo do tempo, o que não aconteceu.

Evidencia-se que em todo o período estudado, nenhum dos grupos estudados diminuíram a temperatura até valores semelhantes aos mensurados no pré-operatório, o que comprova novamente que o experimento foi finalizado ainda na fase de reparo no processo de regeneração óssea (HALUZAN et al., 2015).

8.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A utilização da MEV não é realizada de forma rotineira ao avaliar o processo de reparo de fratura em situação clínica. O método foi realizado de forma a complementar o estudo. A MEV confirma a presença de tecido neoformado, que foi observado na densitometria nos grupos tratados (BIO e CT) e ainda demonstra a presença de neoformação óssea no GC, que não foi evidenciado na densitometria ou na ultrassonografia. Na MEV foi possível identificar boa interação entre o tecido primário e o biomaterial, com a presença do biomaterial sobre o tecido neoformado e certifica a boa interação entre o biomaterial e o tecido ósseo remanescente, sugerido na análise termográfica.

A presença de uma lacuna entre o tecido neoformado e o biomaterial no grupo CT sugere que o biomaterial pode ter sido degradado mais rápido do que a formação de um novo tecido, o que não pode ser considerado ponto benéfico. Outra teoria a ser considerada para a presença da lacuna na imagem seria o deslocamento do biomaterial do experimento, que foi evidenciado nesta amostra.

Todas as amostras para a MEV foram obtidas na interface entre a falha/biomaterial e o tecido ósseo remanescente. Durante o processamento, essas amostras devem ser fraturadas (ANEXO B), o que impossibilita direcionar tendenciosamente para alguma dessas hipóteses.

A MEV é capaz de avaliar a superfície da amostra coletada e não permite a avaliação da qualidade dos tecidos, porém, ao comparar o GC com os grupos tratados (BIO e CT), o tecido neoformado e o tecido remanescente são estruturalmente semelhantes. Considera-se também a presença do biomaterial nos grupos tratados. Nesta análise também não é possível quantificar o tecido para comparação dos grupos como realizado em outros experimentos (NÓBREGA, 2014; PARETSIS et al., 2017).

Ao ponderar todos os dados obtidos, observa-se diferença entre os grupos tratados (BIO e CT) comparados ao GC. Não se observou diferença entre BIO e CT neste experimento, corroborando com os dados obtidos no experimento a Marcondes, G.M. (2019), no qual foi utilizado a mesma metodologia e biomaterial, porém com hipóteses e análises diferentes.

9. CONCLUSÃO

- O biomaterial deste estudo apresenta potencial como substituto ósseo, uma vez que assistiu o processo de regeneração óssea, em defeito crítico comparado ao grupo controle.
- Não foram observadas diferenças significativas ao longo do processo de regeneração entre os grupos BIO e CT nos métodos densitométricos e ultrassonográficos no período estudado.
- A densitometria digital pode ser considerada válida, uma vez que apresentou associação substancial com a densitometria convencional.
- A termografia apresentou comportamento semelhante entre os grupos controle, biomaterial e biomaterial associado à célula-tronco sugerindo um processo inflamatório tolerável e favorável.
- Os achados dos exames de imagem foram coerentes e capazes de acompanhar o processo de regeneração óssea a partir de um biomaterial.

REFERÊNCIAS

AHSAN, S. M.; THOMAS, M.; REDDY, K. K.; SOORAPARAJU, S. G.; ASTHANA, A.; BHATNAGAR, I. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.110, p. 97–109, 2018.

ANDRADE, A. P. P.; SILVA, E. V. de S.; PAULA, F. A. da S. de; BRITO, G. de S.; CARNEIRO, S. C. M. C. **Serviços em ortopedia veterinária**. Goiás: Universidade Federal de Goiás, [20--]. 5 f. Disponível em: https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/399/o/ANA_PAULA_PEREIRA_DE_ANDRADE.pdf. Acesso em: 29 abr. 2020.

AUER, J. A.; RECHENBERG, B. Von; BOHNER, M.; HOFMANN-AMTENBRINK, M. Bone Grafts and Bone Replacements. In: **Equine Surgery**. Fourth ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012. p. 1081–1096.

AUER, J. A.; STICK, J. A. **Equine Surgery**. 4 edição ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012.

AUER, J.; 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 research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 8, p. 72, 2007.

AUGAT, P.; MORGAN, E. F.; LUJAN, T. J.; MACGILLIVRAY, T. J.; CHEUNG, W. H. Imaging techniques for the assessment of fracture repair. **Injury**, v. 45, p. S16–S22, 2014.

BACAKOVA; PAJOROVA; TOMKOVA; MATEJKA; BROZ; STEPANOVSKA; PRAZAK; SKOGBERG; SILJANDER; KALLIO. Applications of Nanocellulose/Nanocarbon Composites: Focus on Biotechnology and Medicine. **Nanomaterials**, v. 10, n. 2, p. 196, 23 jan. 2020.

BACCARELLI, D. C.; PARETSIS, N. F.; LHAMAS, C. L.; CORRÊA, R. R.; SPAGNOLO, J. D.; BENESI, F. J.; MANCHINI, G.; ZOPPA, A. L. do V. De. Power Doppler sonography in the assessment of neovascularization following surgical fracture repair in sheep: case report. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 54, n. 3, p. 283–286, 2017.

BALAGANGADHARAN, K.; DHIVYA, S.; SELVAMURUGAN, N. Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1372–1382, 2017.

BARGIEL, P.; CZAPLA, N.; PETRICZKO, J.; KOTRYCH, D.; ZACHA, W.; JUSZKIEWICZ, S.; LUSINA, D.; PROWANAS, P. Thermography in the diagnosis of musculo-skeletal disorders. **Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska**, v. 83, n. 6, p. 234–240, 2019.

- BRIOSCHI, M. L.; MACEDO, J. F.; DE ALMEIDA, R.; MACEDO, C. Termometria cutânea: novos conceitos Skin thermometry: new concepts. **Jornal vascular Brasileiro**, v. 22, n. 2, p. 151–60, 2003.
- BROCK, R. S.; TARICCO, M. A.; DE OLIVEIRA, M. F.; DE LIMA OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, M. J.; BOR-SENG-SHU, E. Intraoperative Ultrasonography for Definition of Less Invasive Surgical Technique in Patients with Chiari Type I Malformation. **World Neurosurgery**, v. 101, p. 466–475, 2017.
- BRYDONE, A. S.; MEEK, D.; MACLAINE, S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine**, v. 224, n. 12, p. 1329–1343, 2010.
- CAMERON, J. A.; MILNER, D. J.; LEE, J. S.; CHENG, J.; FANG, N. X.; JASIUK, I. M. Employing the Biology of Successful Fracture Repair to Heal Critical Size Bone Defects. **Life Science Journal**, v. 6, n. 4, p. 113–132, 2012.
- CANCEDDA, R.; GIANNONI, P.; MASTROGIACOMO, M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. **Biomaterials**, v. 28, n. 29, p. 4240–4250, 2007.
- CARSTANJEN, B.; SIEWRUK, K.; GAJEWSKI, Z. In field fracture management in horses. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 42, n. 4, p. 407–411, 2012.
- CHEN, Y.; ZHANG, Y. Q.; ZHANG, T. H.; GAN, C. H.; ZHENG, C. Y.; YU, G. Carbon nanotube reinforced hydroxyapatite composite coatings produced through laser surface alloying. **Carbon**, v. 44, n. 1, p. 37–45, 2006.
- CHENG, G.; LI, Z.; XING, X.; LI, D.-Q.; LI, Z.-B. Multiple Inoculations of Bone Marrow Stromal Cells into Beta-Tricalcium Phosphate/Chitosan Scaffolds Enhances the Formation and Reconstruction of New Bone. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 31, n. 1, p. 204–215, 2016.
- CHRISTOU, C.; OLIVER, R. A.; PELLETIER, M. H.; WALSH, W. R. Ovine model for critical-size tibial segmental defects. **Comparative Medicine**, v. 64, n. 5, p. 377–385, 2014.
- DAYASHANKAR, C.; DEEPIKA, P.; SIDDARAMAIAH, B. Clinical and radiographic evaluation of citric acid-based nano hydroxyapatite composite graft in the regeneration of intrabony defects - A randomized controlled trial. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 8, n. 3, p. 380–386, 2017.
- DE SOUSA MORAES, P. R. F.; SASKA, S.; BARUD, H.; DE LIMA, L. R.; DA CONCEICAO AMARO MARTINS, V.; DE GUZZI PLEPIS, A. M.; RIBEIRO, S. J. L.; GASPAR, A. M. M. Bacterial cellulose/collagen hydrogel for wound healing. **Materials Research**, v. 19, n. 1, p. 106–116, 2016.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura - Aplicações e preparação de amostras - Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores**. 1. ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DIAS, G. J.; MAHONEY, P.; HUNG, N. A.; SHARMA, L. A.; KALITA, P.; SMITH, R. A.; KELLY, R. J.; ALI, A. Osteoconduction in keratin–hydroxyapatite composite bone-graft substitutes. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 105, n. 7, p. 2034–2044, 2017.

DIAS, M. I.; DIAS, M. I.; LOURENÇO, P.; RODRIGUES, A.; AZEVEDO, J.; VIEGAS, C.; FERREIRA, A.; CABRITA, A. S. The effect of the quantitative variation of autologous spongy bone graft applied for bone regeneration in an experimental model of tibia osteotomy. **Acta Médica Portuguesa**, v. 20, n. 1, p. 37–46, 2007.

DUAN, W.; HAQUE, M.; KEARNEY, M. T.; LOPEZ, M. J. Collagen and Hydroxyapatite Scaffolds Activate Distinct Osteogenesis Signaling Pathways in Adult Adipose-Derived Multipotent Stromal Cells. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 23, n. 10, p. 592–603, 2017.

EMARA, S. A.; GADALLAH, S. M.; SHARSHAR, A. M. Evaluation of coral wedge and composite as bone graft substitute to induce new bone formation in a dog tibial defect. **Journal of American Science**, v. 9, n. 7, p. 526–537, 2013.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária - A arte diagnóstica**. 3. ed. Araçatuba: Roca, 2013.

FERNANDES, M. B. C.; GUIMARÃES, J. A. M.; CASADO, P. L.; CAVALCANTI, A. D. S.; GONÇALVES, N. N.; AMBRÓSIO, C. E.; RODRIGUES, F.; PINTO, A. C. F.; MIGLINO, M. A.; DUARTE, M. E. L. The effect of bone allografts combined with bone marrow stromal cells on the healing of segmental bone defects in a sheep model. **BMC Veterinary Research**, v. 10, p. 0–11, 2014.

FERNANDEZ DE GRADO, G.; KELLER, L.; IDOUX-GILLET, Y.; WAGNER, Q.; MUSSET, A. M.; BENKIRANE-JESSEL, N.; BORNERT, F.; OFFNER, D. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. **Journal of Tissue Engineering**, v. 9, p. 1–18, 2018.

FIELD, J. R.; RUTHENBECK, G. R. Qualitative and Quantitative Radiological Measures of Fracture Healing. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 31, n. 1, p. 1–9, 2018.

FONSECA-GARCÍA, A.; MOTA-MORALES, J. D.; QUINTERO-ORTEGA, I. A.; GARCÍA-CARVAJAL, Z. Y.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, V.; RUVALCABA, E.; LANDA-SOLÍS, C.; SOLIS, L.; IBARRA, C.; GUTIÉRREZ, M. C.; TERRONES, M.; SANCHEZ, I. C.; DEL MONTE, F.; VELASQUILLO, M. C.; LUNA-BÁRCENAS, G. Effect of doping in carbon nanotubes on the viability of biomimetic chitosan-carbon nanotubes-hydroxyapatite scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 102, n. 10, p. 3341–3351, 2014.

FRANKLIN, S. P.; BURKE, E. E.; HOLMES, S. P. The effect of platelet-rich plasma on osseous healing in dogs undergoing high tibial osteotomy. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, 2017. Disponível em <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0177597>>. Acesso dia 28 de julho de 2020.

GOBESSO, A. A. D. O.; SOARES, A.; RIBEIRO, R. M.; TAMAS, W. T.; GONZAGA, I.

V. F. Deposição óssea de cálcio e fósforo , densidade radiográfica e desenvolvimento corporal em potros alimentados com minerais orgânicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n. 2, p. 142–148, 2014.

GRANATO, A. E.; LOBO, A. D. O.; PACHECO-OLIVEIRA, C.; CORAT, E. J. E HIDROXIAPATITA PARA APLICAÇÕES COMO ARCABOUÇOS DE CRESCIMENTO ÓSSEO Materiais e Métodos. In: XIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e X Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba 1, São José dos Campos: 2011. **Anais...** São José dos Campos: 2011.

HALUZAN, D.; DAVILA, S.; ANTABAK, A.; DOBRIC, I.; STIPIC, J.; AUGUSTIN, G.; EHRENFREUND, T.; PRLIC, I. Thermal changes during healing of distal radius fractures—Preliminary findings. **Injury**, v. 46, p. S103–S106, 2015.

HEMPSTEAD, M. N.; WAAS, J. R.; STEWART, M.; CAVE, V. M.; SUTHERLAND, M. A. Evaluation of alternatives to cautery disbudding of dairy goat kids using physiological measures of immediate and longer-term pain. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 6, p. 5374–5387, 2018.

HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; DE GUZZI PLEPIS, A. M. Influence of collagen addition on the thermal and morphological properties of chitosan/xanthan hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 225–230, 2015.

HOWLADER, D.; VIGNESH, U.; BHUTIA, D. P.; PANDEY, R.; KUMAR, S.; CHANDRA, T.; MEHROTRA, D. Hydroxyapatite collagen scaffold with autologous bone marrow aspirate for mandibular condylar reconstruction. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 9, p. 1566–1572, 2017.

KIRSTEN, G. A.; BERTI, S. de A.; BRANCHER, J. A.; WESTPHALEN, F. H.; IGNÁCIO, S. A.; SOUZA, P. H. C. Estudo radiográfico da densidade óssea, utilizando diferentes penetrômetros de alumínio. **Revista Odonto Ciência**, v. 22, n. 58, p. 299–304, 2007.

KNOTHE TATE, M. L.; CHANG, H.; MOORE, S. R.; KNOTHE, U. R. Surgical membranes as directional delivery devices to generate tissue: Testing in an ovine critical sized defect model. **PLOS ONE**, v. 6, n. 12, p. 1–9, 2011. Disponível em < <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0028702>>. Acesso 28 de julho de 2020.

KUBINOVÁ, Š.; SYKOVÁ, E. Nanotechnologies in regenerative medicine. **Minimally Invasive Therapy and Allied Technologies**, v. 19, n. 3, p. 144–156, 2010.

LEE, O. S.; LEE, K. J.; LEE, Y. S. Comparison of bone healing and outcomes between allogeneous bone chip and hydroxyapatite chip grafts in open wedge high tibial osteotomy. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 28, n. 12, p. 189, 2017.

LI, Y.; LIU, D.; XU, K.; TA, D.; LE, L. H.; WANG, W. Transverse and Oblique Long Bone Fracture Evaluation by Low Order Ultrasonic Guided Waves: A Simulation Study. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–10, 2017.

LIMA, A. F. da M.; RAHAL, S. C.; VOLPI, R. dos S.; MAMPRIM, M. J.; VULCANO, L. C.; CORREIA, M. do A. Aspectos radiográficos e densitométricos na consolidação de fraturas tratadas por proteínas morfogenéticas ósseas em rádio de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 7, p. 416–422, 2004.

LINDEN, M. S. S.; MIYAGAKI, D. C.; GROPPPO, F. C.; SANTOS, F. A. dos; CARLI, J. P. De; RAMACCIATO, J. C. Osseointegration of machined and anodized implants under the influence of nicotine. **RGO - Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 64, n. 2, p. 148–153, 2016.

MARCONDES, G. M.; NOBREGA, F. S.; CORRÊA, L.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; PLEPIS, A. M. G.; MARTINS, V. C. A.; ZOPPA, A. L. V. Avaliação da interação biológica entre compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita e tecido ósseo ovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 6, p. 1531–1538, 2016.

MARCONDES, G. M.; NÓBREGA, F. S.; PEDRON, B. G.; CORTOPASSI, S. R. G.; HAGEN, S. C. F.; ZOPPA, A. L. do V. de. Use of non-invasive imaging methods for evaluation of bone regeneration in bone defects induced experimentally in III/IV metacarpus of sheep. **Acta Scientiae**, v. 43, n. 1319, p. 1–9, 2015.

MARTINI, L.; FINI, M.; GIAVARESI, G.; GIARDINO, R. Overview Sheep Model in Orthopedic Research : A Literature Review. **Comparative Medicine**, v. 51, n. 4, p. 292–299, 2001.

MARTINS-JÚNIOR, P. A.; ALCÂNTARA, C. E.; RESENDE, R. R.; FERREIRA, A. J. Carbon nanotubes: Directions and perspectives in oral regenerative medicine. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 7, p. 575–583, 2013.

MEBARKI, M.; COQUELIN, L.; LAYROLLE, P.; BATTAGLIA, S.; TOSSOU, M.; HERNIGOU, P.; ROUARD, H.; CHEVALLIER, N. Enhanced human bone marrow mesenchymal stromal cell adhesion on scaffolds promotes cell survival and bone formation. **Acta Biomaterialia**, v. 59, p. 94–107, 2017.

MENDES, A. L.; PIRES, C.; COELHO, A. B. **Microscopia**: contexto, histórico, técnicas e procedimentos para observação de amostras biológicas. São Paulo: Erica, 2014. ebook.

MICHEL, G.; BLERY, P.; HENOUX, M.; GUICHEUX, J.; WEISS, P.; BROUARD, S.; MALARD, O.; ESPITALIER, F. Bone marrow cell extract promotes the regeneration of irradiated bone. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, 2017. Disponível em <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0178060>>. Acesso dia 28 de julho de 2020.

MILLS, L. a.; SIMPSON, a. H. R. W. In vivo models of bone repair. **Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume**, v. 94-B, n. 7, p. 865–874, 2012.

MUNHOZ, M. A. S.; HIRATA, H. H.; MACHADO, E. G.; CUNHA, M. R.; PLEPIS, A. M. G.; YOSHIOKA, E. S.; MARTINS, V. C. A. Estudo experimental do reparo de defeitos ósseos cranianos de ratos com blendas poliméricas de colágeno. In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB 2014, Uberlândia:

2014. **Anais...** Uberlândia: CBEB, 2014.

NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTAÑO, O.; PLANELL, J. A.; NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTAN, O. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of the Royal Society interface**, v. 5, p. 1137–1158, 2008.

NIEMEYER, P.; FECHNER, K.; MILZ, S.; RICHTER, W.; SUEDEKAMP, N. P.; MEHLHORN, A. T.; PEARCE, S.; KASTEN, P. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3572–3579, 2010.

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

NÓBREGA, S. F.; FERREIRA, M. P.; FACÓ, L. L.; SELIM, M. B.; ZOPPA, A. L. do V. de. Uso da Termografia para Avaliação da Resposta Tecidual após Implante. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.42, n. 1246, p. 1–5, 2014.

OLIVEIRA, S. S. L.; OLIVEIRA, H. M. L.; FOOK, M. V. L. Arcabouços obtidos por agregação de esferas de quitosana/hidroxiapatita. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, n. 3, p. 128–136, 2015.

ONODERA, J.; KONDO, E.; OMIZU, N.; UEDA, D.; YAGI, T.; YASUDA, K. Beta-tricalcium phosphate shows superior absorption rate and osteoconductivity compared to hydroxyapatite in open-wedge high tibial osteotomy. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 22, n. 11, p. 2763–2770, 2014.

PAN, L.; PEI, X.; HE, R.; WAN, Q.; WANG, J. Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue engineering application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 226–234, 2012.

PARETSIS, N. F.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; CORREA, L.; PLEPIS, A. M. G.; MARTINS, V. C. A.; CORTOPASSI, S. R. G.; ZOPPA, A. L. V. Avaliação histológica e histomorfométrica da regeneração óssea a partir da utilização de biomateriais em tíbias de ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1537–1544, 2017.

PARETSIS, N. F.; BACCARELLI, D. C.; LHAMAS, C. L.; ALONSO, D. C.; NÓBREGA, F. S.; ZOPPA, A. L. V. Osteotomia De Tibia Em Modelo Experimental Ovino Para Estudo De Regeneração Óssea. **Ars Veterinaria**, v. 32, n. 1, p. 01–08, 2016.

PRZEKORA, A.; VANDROVCOVA, M.; TRAVNICKOVA, M.; PAJOROVA, J.; MOLITOR, M.; GINALSKA, G.; BACAKOVA, L. Evaluation of the potential of chitosan/ β -1,3-glucan/HA material as scaffold for living bone graft production in vitro by comparison of ADSC and BMDSC behaviour on its surface. **Biomedical materials**, v. 12, n. 1, p. 2–25, 2017.

RAHIMZADEH, R.; VESHKINI, A.; SHARIFI, D.; HESARAKI, S. Value of color Doppler ultrasonography and radiography for the assessment of the cancellous bone

scaffold coated with nano-hydroxyapatite in repair of radial bone in rabbit. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 148–154, 2012.

REDAELLI, V.; TANZI, B.; LUZI, F.; STEFANELLO, D.; PROVERBIO, D.; CROSTA, L.; GIANCAMILLO, M. Di. Use of thermographic imaging in clinical diagnosis of small animal: preliminary notes. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 50, n. 2, p. 140–146, 2014.

RODRIGUES, L. B. Biomaterials applications in orthopaedics. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 2, p. 63–76, 2013.

ROLIM, A. E. H.; CARVALHO, F. A. A.; COSTA, R. C. C.; ROSAA, F. P. Chitosan scaffolds - Physico - Chemical and biological properties for bone repair. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 2, p. 211–228, 2018.

ROSA, G. dos S.; DEARO, A. C. de O. Manejo e transporte de equinos fraturados. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 16, n. 2, p. 169–183, 2013.

SABER-SAMANDARI, S.; SABER-SAMANDARI, S. Biocompatible nanocomposite scaffolds based on copolymer-grafted chitosan for bone tissue engineering with drug delivery capability. **Materials Science and Engineering C**, v. 75, p. 721–732, 2017.

SARAVANAN, S.; LEENA, R. S.; SELVAMURUGAN, N. Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1354–1365, 2016.

SARKAR, M. R.; AUGAT, P.; SHEFELBINE, S. J.; SCHORLEMMER, S.; HUBER-LANG, M.; CLAES, L.; KINZL, L.; IGNATIUS, A. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 1817–1823, 2006.

SCARANO, A.; PIATTELLI, A.; ASSENZA, B.; CARINCI, F.; DONATO, L. Di; ROMANI, G. L.; MERLA, A. Infrared thermographic evaluation of temperature modifications induced during implant site preparation with cylindrical versus conical drills. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 13, n. 4, p. 319–323, 2011.

SCHÖNBERGER, T.; HAHN, J.; KASTEN, P.; SÜDKAMP, N. P.; FECHNER, K.; PEARCE, S.; NIEMEYER, P. A novel software-based evaluation method for objective quantification of bone regeneration in experimental bone defects. **European Cells and Materials**, v. 14, p. 92, 2007.

SCHWEITZER, M. H.; AVCI, R.; COLLIER, T.; GOODWIN, M. B. Microscopic, chemical and molecular methods for examining fossil preservation. **Comptes Rendus - Palevol**, v. 7, n. 2–3, p. 159–184, 2008.

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

SELIM, M. B.; NÓBREGA, F. S.; FACÓ, L. L.; FILIPPO HAGEN, S. C.; DE ZOPPA, A. L. D. V.; ARANA CHAVEZ, V. E.; CORRÊA, L. Histological and Radiographic Evaluation of Equine Bone Structure after Implantation of Castor Oil Polymer. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 31, n. 6, p. 405–412, 2018.

SHIN, U. S.; YOON, I.-K.; LEE, G.-S.; JANG, W.-C.; KNOWLES, J. C.; KIM, H.-W. Carbon nanotubes in nanocomposites and hybrids with hydroxyapatite for bone replacements. **Journal of Tissue Engineering**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

SILVA, S. B. Da; FERRIGNO, C. R. A.; STERMAN, F. D. A.; BACCARIN, D. C. B.; YAZBEK, K. V. B.; MURAMOTO, C.; AMAKU, M. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1045–1051, 2007.

SILVA, L. K. Avaliação tecnológica em saúde: densitometria óssea e terapêuticas alternativas na osteoporose pós-menopausa TT - Technology assessment in health care: bone densitometry and alternatives therapeutical in post-menopausal osteoporosis. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n. 4, p. 987–1003, 2003.

SKWARCZ, S.; BRYZEK, I.; GREGOSIEWICZ, A.; WARDA, E.; GAWĘDA, K.; TARCZYŃSKA, M.; WĘGŁOWSKI, R.; SKWARCZ, J.; NADULSKI, R.; STAREK, A.; SANFORD, J. Autologous activated platelet-rich plasma (PRP) in bone tissue healing – does it work? Assessment of PRP effect on bone defect healing in animal models. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 22, n. 1, p. 109–115, 2019.

SONG, J. M.; SHIN, S. H.; KIM, Y. D.; LEE, J. Y.; BAEK, Y. J.; YOON, S. Y.; KIM, H. S. Comparative study of chitosan/fibroin-hydroxyapatite and collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects: micro-computed tomography analysis. **International Journal of Oral Science**, v. 6, n. January, p. 1–7, 2014.

STICK, J. A. Preparation of the Surgical Patient, the Surgery Facility, and the Operating Team. In: AUER, J. A. STICK, J. **Equine surgery**. 4. ed. St Louis: Elsevier Saunders, 2012. Cap. 10, p. 111-122

TAVAKOL, S.; NIKPOUR, M. R.; AMANI, A.; SOLTANI, M.; RABIEE, S. M.; REZAYAT, S. M.; CHEN, P.; JAHANSHAHI, M. Bone regeneration based on nano-hydroxyapatite and hydroxyapatite/chitosan nanocomposites: An in vitro and in vivo comparative study. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2013.

THURMÜLLER, P.; TROULIS, M.; O'NEILL, M. J.; KABAN, L. B. Use of ultrasound to assess healing of a mandibular distraction wound. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 60, n. 9, p. 1038–1044, 2002.

TONELLI, F. M. P.; SANTOS, A. K.; GOMES, K. N.; LORENÇON, E.; GUATIMOSIM, S.; LADEIRA, L. O.; RESENDE, R. R. Carbon nanotube interaction with extracellular matrix proteins producing scaffolds for tissue engineering. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 4511–29, 2012.

TÜRK, S.; ALTINSOY, I.; ÇELEBI EFE, G.; IPEK, M.; ÖZACAR, M.; BINDAL, C. 3D porous collagen/functionalized multiwalled carbon nanotube/chitosan/hydroxyapatite

composite scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 92, p. 757–768, 2018.

VERONESI, F.; MARTINI, L.; GIAVARESI, G.; FINI, M. Bone regenerative medicine: metatarsus defects in sheep to evaluate new therapeutic strategies for human long bone defect: a systematic review. **Injury**, v. 51, p. 1457–1467, 2020.

YAO, J. J.; WANG, W. Y.; ZENG, D. C.; ZHANG, Y. X.; XIE, Z. W.; LU, T.; BAO, G. H. Novel polymeric biomaterial poly(butyl-2-cyanoacrylate) nanowires: synthesis, characterization and formation mechanism. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, n. September 2018, p. 454–462, 2019.

ZILIOTTO, L.; DALECK, C. R.; PADILHA FILHO, J. G.; SOUZA, A. P. de; FANTINATTI, A. P.; DINIZ, P. P. V. de P. Utilização de implante ósseo cortical alógeno conservado em glicerina para preservação de membro torácico: estudo experimental em cães. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 107–115, 2003.

APÊNDICE A**CITOTOXICIDADE POR ENSAIO DE MTT E PI****Método de difusão de extrato em solução:**

O biomaterial deste estudo foi avaliado juntamente com o controle positivo (látex), sendo que ambos foram submetidos a procedimentos de extração. O biomaterial com a dimensão de 7 X 1mm foi submerso em 2 mL de RPMI por 24 horas em condições estáticas a 37°C.

Foram plaqueadas 1×10^5 células/mL em meio de RPMI para células VERO e célula-tronco mesenquimais proveniente de ovinos com 10% de SFB em placas de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, removeu-se o meio por aspiração e lavou em monocamada de células com PBS. Preparou-se a solução de extratos no meio de cultura nas seguintes concentrações: 100%, 90%, 75%, 60%, 50%, 25% e 10%. Estas soluções foram preparadas utilizando os extratos dos biomateriais. As células foram incubadas por 48 horas na placa de 96 poços a 37°C e 5% de CO₂.

Para controle positivo, utilizou-se extrato de látex em concentrações de 100% e 50% e para controle negativo (branco) concentração de 100% no meio de cultura.

Teste MTT:

Após este período, as células foram tratadas com 3- (4,5-dimetil) tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tereazolio (MTT), para o desenvolvimento de uma cor azul. Este método de contagem baseia-se na redução do MTT, composto amarelo, a um produto formazan, de coloração violeta, que absorve em 570nm. A redução foi feita pelas desidrogenases mitocondriais, presentes somente nas células vivas. Após 2 horas de incubação, o meio MTT é retirado e 100µL de DMSO na proporção 1:1. A placa foi lida em leitor ELISA BIO-RAD em 50nm.

Teste PI:

Após o período de incubação nas placas, foi adicionado o iodeto de propidium (PI), este interage apenas com o DNA nuclear de células que tenham interrompido membranas citoplasmáticas e nucleares, produzindo uma cor vermelha. Depois de 15 minutos, as placas foram avaliadas no microscópio de fluorescência.

Resultados:

Segue abaixo o gráfico que representa o teste MTT nas células VERO em diferentes concentrações. Observa-se que o biomaterial se assemelha ao controle (blk), e nas concentrações de 50% e 10% supera o mesmo. Em nenhuma das outras concentrações observa-se absorvância semelhante com o controle positivo (látex).

Segue abaixo o gráfico que representa o teste MTT nas células mesenquimais em diferentes concentrações. Observa-se também, que a presença do biomaterial não impediu o crescimento das células mesenquimais. Ainda, em nenhuma concentração, foi observado comportamento semelhante ao controle positivo (látex). Nota-se também, que nas concentrações de 100% e 75% a 25%, superou o controle negativo.

Segue abaixo o gráfico que representa o teste PI em diferentes concentrações nas células VERO. Assim como esperado, o controle positivo apresentou alto índice de morte celular, diferentemente das amostras com a presença do biomaterial em diferentes concentrações ou até mesmo o controle negativo (blk).

O gráfico abaixo representa o ensaio de PI nas células mesenquimais de ovinos. Diferente dos outros resultados, o resultado do controle negativo (branco) e das amostras com biomaterial não foram semelhantes. Observa-se maior número de morte celular na presença do biomaterial comparado ao controle negativo, porém, ainda sim, o número de morte celular na presença do biomaterial não supera o controle positivo.

Considerações:

A partir dos diferentes testes *in vitro* realizado neste experimento, pode-se observar que o biomaterial de estudo não apresentou citotoxicidade significativa em nenhuma das linhagens celulares que foram testados.

APÊNDICE B**DIFERENCIAÇÃO CELULAR DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE OVINO (MSCs)**Descongelamento das MSCs de ovino:

Para o descongelamento foi acrescido ao criotubo 1 mL de meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de glutamina (200Mmol) e 0,25% de anfotericina B (meio de cultivo suplementado). Em seguida as células foram transferidas para tubos cônico de 15 mL e centrifugadas durante 10 minutos a 300 X *g*. O sobrenadante foi descartado e o botão celular foi re-suspendido em 5 mL de meio de cultura suplementado, que foram inicialmente cultivados em frascos de cultivo¹⁹ de 25 e 75 cm³, incubadas a uma temperatura de 37°C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. O meio de cultivo suplementado foi trocado a cada 48 horas até as células atingirem 70 a 80% de confluência.

Dissociação enzimática ou tripsinização das células:

As MSCs foram removidas dos frascos de cultivo a partir do tratamento enzimático com tripsina (tripsinização), após confluência de 70 a 80% de células expandidas nos frascos. Esse processo se deve a remoção do meio de cultivo, seguido de duas lavagens com 2 mL de PBS e posteriormente foi adicionado 1 mL de tripsina 0,25%. As amostras foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 2 mL de meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino para inativação da tripsina. A suspensão celular foi aspirada e transferida para um tubo cônico de 15 mL, centrifugada durante 10 minutos a 300 x *g*. O botão celular foi re-suspendido em meio de cultivo DMEM/F12 suplementado e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Para confirmação do potencial multipotente das células foi realizada indução de diferenciação celular *in vitro* com os meios de indução nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica.

¹⁹ Frascos de cultivo de 25 cm³ e 75 cm³ da marca TPP

Diferenciação osteogênica:

Após tripsinização, as células foram semeadas em placas de seis poços numa concentração de 10^5 células viáveis por poço (em duplicata e amostras controle, nas quais não foram expostas ao meio indutor), inicialmente utilizando 2 mL de meio de cultivo DMEM/F12 suplementado. Após 48 horas (tempo necessário para as células aderirem ao plástico), o meio de cultivo foi substituído por 2 mL de meio indutor osteogênico que foi trocado a cada 48 horas, durante 21 dias. Passado o intervalo necessário de indução, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 minutos seguido de duas lavagens com água destilada e imediatamente coradas com Alizarin Red a 2% pH 4,2²⁰. A constatação da matriz de cálcio foi analisada e fotografada em microscopia invertida. A análise das populações controle, as quais não receberam meio indutor, foram demonstradas após cultura em meio DMEM/F12 suplementado sob as mesmas condições em termos de tempo de cultivo e coloração.

Diferenciação adipogênica

Para o processo de indução adipogênica as células foram cultivadas e plaqueadas com a mesma metodologia aplicada à indução osteogênica. Após 48 horas de cultivo, o meio DMEM/F12 suplementado foi substituído por 2 mL de meio indutor adipogênico comercializado²¹. As trocas de meio foram realizadas a cada 48 horas durante 14 dias. Posteriormente o período de diferenciação, as placas foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído durante 30 minutos e coradas com Oil Red O²² para a visualização de gotículas de gordura e Hematoxilina & Eosina (HE) para coloração dos núcleos celulares. Após coloração, as placas foram analisadas e fotografadas no microscópio invertido²³. A análise das populações controle, as quais não receberam o meio indutor, foi demonstrada após cultura em meio DMEM/F12 suplementado sob as mesmas condições em termos de tempo de cultivo e coloração.

²⁰ Corante marca Sigma - Aldrich

²¹ StemPro adipogenesis Kit, GIBCO, USA

²² Sigma

²³ Nikon

Diferenciação condrogênica:

Nesse ensaio, as células foram inicialmente cultivadas (como já descrito acima) em frascos de 75 cm³ e assim que atingirem 70% de confluência, foram removidas a partir de tratamento enzimático com tripsina. A suspensão celular será aspirada e transferida para um tubo cônico de 15 mL, centrifugada durante 10 minutos a 400 x g. O botão celular foi re-suspendido em meio de cultivo DMEM/F12 suplementado e as células foram contadas em câmara de Neubauer, com início do processo de indução condrogênica em aproximadamente 2×10^6 células viáveis. As células foram cultivadas nos tubos cônicos com capacidade para 15 mL, onde 2 mL do mesmo meio de cultivo foi adicionado e permaneceu por 48 horas. Após esse período, o meio foi removido e o processo de diferenciação condrogênica com meio indutor comercial²⁴ foi iniciado. As células foram mantidas no fundo do tubo cônico, para originar esferoides e a troca de meio indutor foi realizada a cada 48 horas, no decurso de 21 dias. O esferoide obtido após o processo de indução de diferenciação condrogênica foi lavado com PBS e fixado em paraformaldeído 4% durante 24 horas. Posterior à fixação, foram confeccionadas lâminas histológicas, coradas com azul de toluidina e alcian blue. O resultado de diferenciação será verificado e retratado em microscopia óptica²⁵.

Avaliação fenotípica por citometria de fluxo:

A análise fenotípica das células foi realizada para caracterizá-las com marcadores de superfície, os quais são utilizados para estabelecer uma possível fonte de MSCs. As células foram descongeladas, centrifugadas e lavadas com PBS.

O total de 10^5 células foram utilizadas e re-suspendidas em tubos de plástico descartável próprio para citometria. O concentrado celular foi re-suspendido em 100 µL de PBS dando início à caracterização propriamente dita. Os anticorpos utilizados foram titulados e testados anteriormente, para definição da concentração ideal de anticorpo.

²⁴ StemPro chondrogenesis differentiation kit – Thermo Fisher Scientific

²⁵ Nikon eclipse E800

Para a fenotipagem em citometria de fluxo os seguintes anticorpos foram analisados: anti-CD44²⁶, anti-CD90²⁷, anti-CD105²⁸ para caracterização de células de origem mesenquimal, anti-CD34 para identificar possíveis células de origem hematopoiética. Para calibração do citômetro as células foram marcadas com isotipo controle anti-IgG1 PE e anti-IgG1 FITC.

A fluorescência utilizada (FITC e PE) permitiu que as análises fossem realizadas em tubos em comum, sendo assim: anti-CD44 (FITC) juntamente com anti-CD90 (PE) e anti-CD105 (PE) analisado concomitante ao anti-CD34 (FITC), desta forma, as avaliações destas populações celulares foram analisadas como duplamente positivas.

Ao término da marcação com os anticorpos, os tubos foram incubados a 4°C (geladeira) por 40 minutos. Transcorrido o tempo de incubação, os tubos foram centrifugados e lavados com PBS, fixados com paraformaldeído²⁹ e retornaram à geladeira durante mais 15 minutos, seguido de nova lavagem com PBS para leitura no citômetro. Foram adquiridos 5000 eventos no aparelho FACSCalibur³⁰ e analisados através do programa FlowJow.

Resultados:

Todas a diferenciações foram positivas no qual observou-se a formação de cálcio na matriz confirmando a linhagem osteogênica; presença de gotículas lipídicas intracitoplasmáticas confirmando a linhagem adipogênica e a diferenciação condrogênica com a presença da matriz hialina. Os painéis abaixo ilustram as diferenciações:

²⁶ AbD Serotec, A Bio Rad Company, USA

²⁷ BD Pharmingen, USA

²⁸ AbD Serotec, A Bio-Rad Company, USA

²⁹ Marca Sigma - Aldrich

³⁰ Becton – Dickinson, CA, USA

Figura 1: Diferenciação da MSCs de ovinos na terceira passagem. MSCs corada com Alizarin Red após a indução, demonstrando a formação de matriz com cálcio em vermelho (A); MSCs sem o meio indutor corada com Alizarin Red (B); MSCs corada com Oil Red O, após a indução evidenciando gotículas adipogênicas intracitoplasmáticas (C); MSCs sem o meio indutor corada com orada com Oil Red O (D); MSCs corada com azul de toluidina após a indução condrogênica demonstrando a matriz hialina, em azul (E e F).

APÊNDICE C

Valores mínimo, máximo, mediana e desvio padrão da frequência cardíaca (bpm) durante o pós-operatório - São Paulo - 2020

Frequência cardíaca	GC	BIO	CT
Mínima	52	60	56
Máxima	115	140	128
Mediana	80 ($\pm 12,8$)	88 ($\pm 13,9$)	86 ($\pm 12,1$)

GC= Grupo Controle; BIO = Grupo com Biomaterial; CT = Grupo com biomaterial associado à célula-tronco. Referência de normalidade: 70-80 bpm (PUGH, 2005)

Valores mínimo, máximo, mediana e desvio padrão da frequência respiratória (mpm) durante o pós-operatório - São Paulo - 2020

Frequência respiratória	GC	BIO	CT
Mínima	16	16	16
Máxima	120	60	48
Mediana	49 ($\pm 24,1$)	24 ($\pm 6,5$)	24 ($\pm 5,9$)

GC= Grupo Controle; BIO = Grupo com Biomaterial; CT = Grupo com biomaterial associado à célula-tronco. Referência de normalidade: 12-20 mpm (PUGH, 2005)

Valores mínimo, máximo, mediana e desvio padrão de movimentos ruminais (3min) durante o pós-operatório - São Paulo - 2020

Movimentos ruminais	GC	BIO	CT
Mínima	1	1	1
Máxima	4	3	3
Mediana	3 ($\pm 0,2$)	2 ($\pm 0,6$)	2 ($\pm 0,7$)

GC= Grupo Controle; BIO = Grupo com Biomaterial; CT = Grupo com biomaterial associado à célula-tronco. Referência de normalidade: 2 mov/min (PUGH, 2005)

Valores mínimo, máximo, mediana e desvio padrão de temperatura corporal ($^{\circ}\text{C}$) durante o pós-operatório - São Paulo - 2020

Temperatura corporal	GC	BIO	CT
Mínima	38	38	37
Máxima	39,8	39,8	39,9
Mediana	39 ($\pm 0,2$)	38,9 ($\pm 0,3$)	39 ($\pm 0,4$)

GC= Grupo Controle; BIO = Grupo com Biomaterial; CT = Grupo com biomaterial associado à célula-tronco. Referência de normalidade: 38,5 $^{\circ}\text{C}$ - 40 $^{\circ}\text{C}$ (PUGH, 2005)

Referência:

PUGH, D.V. **Clínica de caprinos e ovinos**. São Paulo: Roca, 2005. p258

APÊNDICE D

DADOS DA ESTATÍSTICA

1. Histogramas da densitometria digital e convencional (C e D) antes (A e C) e após (B e D) a transformação numérica pela inversa

Referência: Dohoo, I. R., Martin, W.,; Stryhn, H. **Veterinary epidemiologic research** (No. V413 DOHv). Charlottetown, Canada: AVC Inc., 2003.

2. Classificação da concordância pelo teste Kappa

<0,2	Concordância leve
0,2-0,4	Concordância razoável
0,4-0,6	Concordância moderada
0,6-0,8	Concordância substancial
>0,8	Concordância quase perfeita

Referência: Dohoo, I. R., Martin, W.,; Stryhn, H. **Veterinary epidemiologic research** (No. V413 DOHv). Charlottetown, Canada: AVC Inc., 2003.

3. Histogramas das temperaturas máxima, mínima e média da termografia antes e após a transformação pela inversa

APÊNDICE E**IMAGENS ULTRASSONOGRÁFICAS**

Para ilustração do exame ultrassonográfico completo, segue abaixo três estudos completo, um de cada grupo: grupo controle (Figura 1), grupo biomaterial (Figura 2) e grupo biomaterial associada a célula-tronco (Figura 3).

Figura 1 - Estudo completo das imagens ultrassonográficas do grupo controle

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Imagens ultrassonográficas de um animal do grupo controle. Exame pré-operatório no qual a seta de cor azul indica a superfície óssea da tíbia (A). Pós-operatório imediato (B, C, D). 15° dia de pós-operatório (E, F, G). 30° dia de pós-operatório (H, I, J). 60° dia de pós-operatório (K, L, M). 90° dia de pós-operatório (N, O, P). Nas imagens, destaca-se o conteúdo da falha óssea com chave vermelha (B, E, H, K, N); o bordo ósseo cranial (seta azul) e o conteúdo da falha (seta vermelha) (C, F, I, L, O); e o bordo ósseo caudal (seta azul) e o conteúdo da falha óssea (seta vermelha) (D, G, J, M, P).

Figura 2 - Estudo completo das imagens ultrassonográficas do grupo biomaterial

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Nota: Imagens ultrassonográficas de um animal do grupo com biomaterial. Exame pré-operatório no qual a seta de cor azul indica a superfície óssea da tíbia (A). Pós-operatório imediato (B, C, D). 15° dia de pós-operatório (E, F, G). 30° dia de pós-operatório (H, I, J). 60° dia de pós-operatório (K, L, M). 90° dia de pós-operatório (N, O, P). Nas imagens, destaca-se o biomaterial no defeito ósseo com chave de cor verde (B, E, H, K, N); o bordo ósseo cranial (seta azul) e o biomaterial (seta verde) (C, F, I, L, O); e o bordo ósseo caudal (seta azul) e o biomaterial (seta vermelha) (D, G, J, M, P).

Figura 3 - Estudo completo das imagens ultrassonográficas do grupo biomaterial associado à célula-tronco

Fonte: (PARETSIS, N.F., 2020).

Legenda: Imagens ultrassonográficas de um animal do grupo com biomaterial associado à célula-tronco. Exame pré-operatório no qual a seta de cor azul indica a superfície óssea da tíbia (A). Pós-operatório imediato (B, C, D). 15º dia de pós-operatório (E, F, G). 30º dia de pós-operatório (H, I, J). 60º dia de pós-operatório (K, L, M). 90º dia de pós-operatório (N, O, P). Nas imagens, destaca-se o biomaterial com célula-tronco no defeito ósseo com chave de cor amarela (B, E, H, K, N); o bordo ósseo cranial (seta azul) e o biomaterial (seta amarela) (C, F, I, L, O); e o bordo ósseo caudal (seta azul) e o biomaterial (seta amarela) (D, G, J, M, P).

CARACTERIZAÇÃO DO BIOMATERIAL DE ESTUDO

Material e Método:

Para a obtenção de quitosana utilizou-se gládios de lulas do gênero *Doryteuthis spp* cedidas por Miami Comércio e Exportação de Pescados Ltda. (Cananéia-SP). A hidroxiapatita (HA) foi sintetizada a partir de nitrato de cálcio e fosfato de amônio. Tanto a quitosana quanto a HA foram preparados no Grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos - USP sob a responsabilidade da prof^a. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis. Os Nanotubos de Carbono (NC) utilizados são de parede múltipla e funcionalizados com ácido carboxílico (> 8%) da marca Aldrich, diâmetro médio de 9,5 nm e comprimento de 1,5 μm . Todos os demais reagentes utilizados foram de grau PA.

Preparação dos materiais:

Preparação da Quitosana:

A quitosana foi obtida a partir de gládios de lula e foi resultado de duas etapas básicas de preparo. Primeiramente o gládio foi lavado, seco em estufa a 40°C, triturado. Em seguida foi feita a desproteínização-desmineralização, 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 (Horn et al., 2009).

Preparação da Hidroxiapatita (HA):

A síntese da hidroxiapatita foi feita seguindo o método de JARCHO et al (1976). Preparou-se uma solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 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 N₂.

Após este tempo, deixou-se a suspensão foi decantada com posterior remoção do sobrenadante e o sólido resultante foi lavado com água deionizada até que o pH do sobrenadante se tornasse constante. A suspensão de HA formada foi centrifugada a 4000 rpm por 15 min a 20°C, filtrada e seca em estufa à 90°C durante um período de 24 h. 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 por suspensão de 10 mg de nanotubos de carbono (NC) em ácido acético 1%. A quitosana (200 mg) foi então adicionada lentamente sob agitação a 2000 rpm por 24h sendo que nas primeiras 2h essa agitação foi feita em um banho de ultrassom (40 kHz), para dissolução completa. Após esse período foi adicionada a hidroxiapatita (3,6 g) voltando-se a repetir o mesmo procedimento para que toda a mistura ficasse bem homogênea. A proporção final dos materiais foi de 1:20:180 de NC: quitosana: HA.

Caracterização:

Os materiais foram caracterizados nos equipamentos da Central de Análises Químicas Instrumentais do IQSC/USP.

Quitosana:

Grau de acetilação da quitosana: a quitosana foi caracterizada quanto a seu GA por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) sendo utilizado o método proposto e validado por Lavertu et al. (2003). Os espectros de RMN ¹H das amostras de quitosana foram obtidos no espectrômetro com transformada de Fourier da marca Agilent Technologies, modelo 500/54 Premium Shielded a 70°C, acumulando 64 varreduras.

Hidroxiapatita:

Difração de raio-x: os difratogramas da HA foram obtidos em um difratômetro Bruker D8 Advance Instrument, com radiação monocromática de CuK α (λ =1,5418 Å) com potência de 40 kV, 40 mA, operado em modo de varredura. A amostra teve a

varredura de 2θ entre 5 - 65° utilizando-se um passo de 0,03° e tempo de 0,4 s por passo.

Energia Dispersiva por raio-x (EDX): A análise foi feita em um equipamento EDX LINK ANALYTICAL, (Isis System Series 200), com detector de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II (Atmosphere Thin Window), de resolução de 133 eV à 5,9 keV, acoplado a um microscópio eletrônico LEO 440 (LEO Electron Microscopy Ltd), com um detector Oxford (Oxford Instruments Inc.). Utilizou-se padrão de cobalto para calibração, feixe de elétrons de 20 kV, distância focal de 25 mm, “dead time” de 30 %, corrente de 2,82 A e I “probe” de 950 pA.

Matriz:

Microscopia eletrônica de varredura (MEV): as fotomicrografias foram obtidas na superfície matriz colada em stubs por fita condutora de carbono e recoberta com uma fina camada de ouro de 6 nm de espessura em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) com pressão na câmara de $2,00 \times 10^{-2}$ mbar, corrente de 60 mA e taxa de deposição de $0,60 \text{ nm s}^{-1}$, possibilitando a análise de suas estruturas. Utilizou-se o equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV. Imagens com elétrons restroespalhados foram obtidas utilizando *four quadrant backscattered electron detector* (QBSD) type 400, operando com feixe de elétrons de 20 kV, corrente de 2,82 A e I probe de 1500 nA.

Resultados

A quitosana foi caracterizada por espectroscopia de RMN ^1H determinando-se o grau de desacetilação de 93,5% (Horn et al., 2009; Torres et al., 2005).

O padrão de difração de raio-X para HA seca a 90°C (Figura 2A) mostra os picos em 2θ de 26,1°, 31,9°, 32,3°, 33,1°, 34,2°, 46,9° e 49,7° 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 1,89, caracterizando uma HA rica em cálcio (Ramesh et al., 2007). Os elementos encontrados nesta análise foram o carbono (0,2 keV), oxigênio (0,5 keV), cálcio (3,7 e 4,0 keV), e fósforo (2,0 keV), como mostrado na Figura 2B

Figura 2. Espectro de difração de raio-X (A) e dispersão de raio-X (B) para a HA obtida.

As matrizes obtidas são compactas e com uma coloração cinza devido à presença dos nanotubos de carbono (Figura 3).

Figura 3. Fotografia digital das matrizes de 70 e 100 mm de diâmetro

As fotomicrografias por MEV obtidas para as matrizes estão mostradas na Figura 4.

Figura 4. Fotomicrografia por MEV para a matriz quitosana/nanotubo de carbono/hidroxiapatita. (A) detector de espalhamento (SE) e (B) detector QBSD

Referências

HORN, M.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G. Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 239, 2009.

JARCHO, M. et al. Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form. **Journal Materials Science**, p.2027-2035, 1976.

LAVERTU, M.; XIA, Z.; SERREQUI, A. N.; BERRADA, M.; RODRIGUES, A.; WANG, D.; BUSCHMANN, M. D.; GUPTA, A. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 6, p. 1149-1158, 2003.

RAMESH S.; TANB C. Y.; HAMDY M.; SOPYAN I.; TENG W. D. The influence of Ca/P ratio on the properties of hydroxyapatite bioceramics. **Proceedings of SPIE** **2007**; v. 6423, p. 64233A-1.

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.

ANEXO B**PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA****1. Processamento para MEV do grupo controle (GC)**Fixação:

As amostras foram trazidas em soro fisiológico 0,9%, após serem fixadas em formol 4%. Lavagem por 10 minutos em tampão fosfato. Realizar este procedimento por seis vezes.

Processamento:

Com auxílio um bisturi nº 22 e apoiado em superfície dura, bater no cabo do bisturi para fraturar a amostra.

Para a remoção do material orgânica, colocar em imersão por três horas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5 %. Com o auxílio da lupa, avaliar o material e se necessário manter o material imerso por mais tempo. Após a remoção completa, lavar a amostra com água destilada.

Desidratação:

Esta etapa deve ser feita de forma gradual com diferentes concentrações de etanol: 30% por cinco minutos; 50% por cinco minutos; 70% por cinco minutos; 80% por cinco minutos; 90% por cinco minutos; 95% por cinco minutos e a 100%, três vezes, por 10 minutos.

Secagem:

Encostar a espécime suavemente em papel absorvente para remover o excesso de álcool (não secar completamente) e mergulhar em uma placa de hexametildisilazano (HMDS) por 10 minutos. Deixar o material secar em capela de exaustão e colocar na estufa 37°C em um frasco bem fechado de armazenamento até que sejam colocados nos stubs.

Montagem das amostras para análise:

Identificar os stubs na base, após desidratá-los em etanol absoluto e secá-los em estufa. Posicionar o espécime sobre o stubs, usando a fita carbonada dupla-face. Aguardar a metalização em estufa de armazenamento.

Metalização:

As amostras foram encobertas com uma camada de aproximadamente 25nm de ouro em um aparelho Balzers SDC 050 (oerlikon, Balzers, Liechtenstein).

A seguir, foram examinados e fotografados em microscópio de varredura LEO (LEO – Germany) operando a 10-15Kv.

2. Processamento MEV com Sacarose utilizado nos grupos que apresentavam o biomaterial (BIO e CT)

Fixação:

As amostras foram trazidas em soro fisiológico 0,9%, após serem fixadas em formol 4%. Lavagem em água destilada 3x por 10 min; na sacarose 10% por duas horas e manter na sacarose 30% *overnight*.

Processamento:

Com auxílio de uma pinça, congelar no N₂ líquido por aproximadamente 10 segundos; após o congelamento, com auxílio um bisturi n° 22 e apoiado em superfície dura, bater no cabo do bisturi para fraturar a amostra.

Após fraturado, colocar os fragmentos novamente em 30% na sacarose por duas horas e sacarose 10% por uma hora. Após este procedimento, lavar em água destilada seis vezes por 10 minutos.

Desidratação:

Esta deve ser feita de forma gradual com diferentes concentrações etanol: 30% por cinco minutos; 50% por cinco minutos; 70% por cinco minutos; 80% por cinco minutos; 90% por cinco minutos e a 100%, duas vezes por 10 minutos.

Secagem:

Encostar a espécime suavemente em papel absorvente para remover o excesso de álcool (não secar completamente) e mergulhar em uma placa de hexametildisilazano (HMDS) por 10 minutos. Deixar o material secar em capela de exaustão e colocar na estufa 37°C em um frasco bem fechado de armazenamento até que sejam colocados nos stubs.

Montagem das amostras para análise:

Identificar os stubs na base, após desidratá-los em etanol absoluto e secá-los em estufa. Posicionar o espécime sobre o stubs, usando a fita carbonada dupla-face. Aguardar a metalização em estufa de armazenamento.

Metalização:

As amostras foram encobertas com uma camada de aproximadamente 25nm de ouro em um aparelho Balzers SDC 050 (oerlikon, Balzers, Liechtenstein).

A seguir, foram examinados e fotografados em microscópio de varredura LEO (LEO – Germany) operando a 10-15Kv.