CÍNTIA LIMA LHAMAS

**Avaliação por densitometria óssea e microtomografia computadorizada 3D de
(compósito) manta óssea à base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno, como
reparo de falhas ósseas induzidas experimentalmente em tíbias de ovinos**

São Paulo
2016

CÍNTIA LIMA LHAMAS

**Avaliação por densitometria óssea e microtomografia computadorizada
3D de (compósito) manta óssea à base de quitosana, hidroxiapatita e
colágeno, como reparo de falhas ósseas induzidas experimentalmente em
tíbias de ovinos**

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. André Luís do Valle De Zoppa

São Paulo

2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3390
FMVZ

Lhamas, Cíntia Lima

Avaliação por densitometria óssea e microtomografia computadorizada 3D de (compósito) manta óssea à base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno, como reparo de falhas ósseas induzidas experimentalmente em tíbias de ovinos / Cíntia Lima Lhamas. -- 2016.

86 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

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

1. Biomaterial. 2. Densidade mineral óssea. 3. Microtomografia computadorizada. 4. Ovelhas. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação por densitometria óssea e microtomografia computadorizada 3D de (compósitos) mantas ósseas à base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno, como reparo de falhas ósseas induzidas experimentalmente em tíbias de ovinos", protocolada sob o CEUA nº 1813080614, sob a responsabilidade de **André Luís do Valle de Zoppa e equipe; Cínthia Lima Lhamas** - 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 15/10/2014.

We certify that the proposal "Use of (composites) bone blankets based of chitosan, hydroxyapatite and collagen in the repair of bone defects induced experimentally in ovine tibiae: evaluation by Bone Densitometry and 3D Computed Microtomography", utilizing 6 Ovines (6 females), protocol number CEUA 1813080614, under the responsibility of **André Luís do Valle de Zoppa and team; Cínthia Lima Lhamas** - 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 10/15/2014.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2014** a **11/2014**

Área: **Clínica Cirúrgica Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Ovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **a**

N: **06**

Linhagem: **Santa Inês**

Peso: **a**

Resumo: As fraturas ósseas estão entre os problemas médicos mais comuns, pois podem ocorrer em pessoas e animais domésticos de todas as idades. Os cuidados com as fraturas concentram-se na identificação do tipo e da extensão do trauma e na criação de um ambiente biológico que maximize os processos normais de reparação do osso. Atualmente alguns métodos são utilizados para corrigir defeitos ósseos, tanto em ortopedia humana quanto em ortopedia veterinária, porém os resultados muitas vezes não são satisfatórios. Isso ocorre principalmente quando se trata de defeitos irregulares e extensos, nos quais o processo de remodelamento ósseo resulta na formação de um tecido cicatricial com características indesejáveis, quando comparado ao tecido original. Com o objetivo de maximizar a reparação óssea em diversas situações e minimizar possíveis desvantagens e complicações com a utilização de enxertos ósseos autógenos, foi desenvolvida uma grande variedade de substitutos ósseos, dentre eles os biomateriais. A produção de biomateriais está crescendo a cada ano e há muitas razões clínicas para o seu desenvolvimento, principalmente quando se trata de tecido ósseo em que é necessário o preenchimento de defeitos extensos. A quitosana, um biopolímero natural derivado da quitina, é um polissacarídeo encontrado em abundância na natureza e tem demonstrado ser uma alternativa como substituto ósseo, pois apresenta um perfil favorável, auxiliando na formação de tecido ósseo. A combinação de quitosana com hidroxiapatita ou outros derivados de fosfato de cálcio tem liderado pesquisas nas áreas de ortopedia e substituições ósseas nas últimas décadas, pois demonstram maximização da capacidade osteogênica in vivo, permitindo o crescimento ósseo interno celular no compósito. Várias técnicas de diagnóstico são usadas atualmente para avaliar a qualidade do tecido ósseo, sejam elas invasivas ou não invasivas. Dentre as técnicas não invasivas, a densitometria óssea e a microtomografia computadorizada são usadas principalmente nas áreas de medicina humana e a microtomografia computadorizada principalmente ainda no âmbito de pesquisa. Densitometria óssea radiográfica utiliza a imagem mineral óssea em um filme radiográfico padrão como um indicador da absorção de fóton pelo osso, e então mede indiretamente o conteúdo mineral ósseo. A microtomografia computadorizada (μ CT) é uma técnica de ensaio não destrutivo, frequentemente utilizada no estudo da estrutura interna de ossos, com uma resolução espacial da ordem de microns. Ela possui os mesmos embasamentos da tomografia computadorizada (TC) e é um avanço nas técnicas de inspeção por raios X por ser um procedimento não invasivo, com alto poder de resolução, apresentando alta produção de radiação e boa estabilidade da energia máxima do tubo de raios X. O diferencial dessa técnica está relacionado ao tamanho do foco desses tubos. Ambos os métodos de diagnóstico por imagem partem do princípio da geração de imagem através de Raios-X e são considerados métodos não invasivos. O crescente interesse pela

utilização de biomateriais tem gerado a necessidade por mais estudos quanto às características e possibilidades de uso destes como substitutos ósseos, além de respostas positivas do uso da quitosana em humanos. Desta forma, objetiva-se com o presente estudo aprofundar os conhecimentos do seu uso em ortopedia veterinária e explorar a aplicabilidade desses compósitos em animais. Sendo assim, serão estudados biomateriais naturais sob a forma de uma manta óssea a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno avaliando seu comportamento em falhas ósseas induzidas experimentalmente nas tíbias de ovinos.

Local do experimento:

São Paulo, 09 de agosto de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LHAMAS, Cínthia Lima

Título: Avaliação por densitometria óssea e microtomografia computadorizada 3D de (compósito) manta óssea à base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno, como reparo de falhas ósseas induzidas experimentalmente em tíbias de ovinos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico este trabalho à minha mãe, Meire, e à minha irmã, Cibele por vocês
existirem em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus pela oportunidade de concluir o mestrado, um sonho antigo e que agora vejo tornar-se realidade.

Agradeço também à todos que estiveram presentes nessa fase tão importante da minha vida.

Ao meu orientador, Professor André Zoppa, por ter me dado a oportunidade de entrar no seu grupo de pesquisa, por ter me dado um voto de confiança quando conversamos pela primeira vez sobre o mestrado, e pelo apoio que me deu e tem me dado durante todo esse período.

À toda minha família, pelo amor e união, além da compreensão ao meu trabalho. Ao meu irmão, Thiago, à minha sobrinha, Lavínia, à minha mãe, Meire, e à minha irmã, Cibeles que sempre me apoiaram e me deram bons conselhos. Cibeles, seguimos caminho profissional bastante parecido, e sou muito grata por ter uma irmã e amiga como você. Obrigada pelas suas cobranças. Mãe, agradeço pelos conselhos e pelo seu exemplo de força. Tenho a sorte de ter você como uma grande amiga.

Ao meu namorado, amigo e companheiro, César. Obrigada pelos conselhos, pelo apoio e compreensão durante a confecção da minha dissertação, pela sua parceria constante, e por estar sempre disposto a me ajudar. Te amo e te admiro muito.

À minha segunda família, Dona Elza, Sr. Régis, Letícia e Priscilla. Vocês são muito especiais.

Às minhas amigas de longa data Bruna, Aline e Patrícia pelos bons momentos, por sempre me ouvirem e terem ajudado a tornarem os momentos mais leves, vocês são muito especiais. Às novas amigas que fiz nesse período, Nicole, Danielle, Natália e Tathiane, agradeço a compreensão, aos momentos de risadas e descontração, e saibam que as nossas conversas sempre me foram muito úteis.

Aos meus queridos colegas de mestrado: Geissiane, Nicole, Danielle e Luis Eduardo. Geissiane, agradeço pelas conversas e por ter me recebido tão bem em São Paulo. Nicole e Danielle, compartilhamos vários momentos juntas nesses dois anos e a amizade de vocês quero levar para toda a vida.

Agradeço também à Dra. Fernanda Nóbrega por sempre ajudar a mim e aos colegas do grupo e à Msc. Mariana Baroni Selim por ter se disponibilizado a me ajudar com a densitometria óssea. Foram de grande valia as ajudas de vocês.

À Simone Ferreira e ao Ricardo Gonçalves Mendes que me ajudaram com a parte de microtomografia computadorizada. Agradeço a paciência e a disponibilidade.

Aos funcionários e residentes da FMVZ – USP que contribuíram com o nosso projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao projeto durante todo o período do mestrado (Processo de auxílio pesquisa: 2012/23629-9. Processo de bolsa de mestrado: 2014/17084-5).

E, finalmente, mas não menos importante, às seis ovelhas deste estudo, sem as quais essa pesquisa não poderia ter sido realizada.

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim, em cada lago a lua toda
brilha, porque alta vive.”*

Ricardo Reis – Fernando Pessoa

RESUMO

LHAMAS, C. L. **Avaliação por densitometria óssea e microtomografia computadorizada 3D de (compósito) manta óssea à base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno, como reparo de falhas ósseas induzidas experimentalmente em tíbias de ovinos.** [Evaluation by bone densitometry and 3D micro-computed tomography of chitosan, hydroxyapatite and collagen composite as bone substitute in bone defect experimentally induced in the tibia of sheep]. 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A ocorrência de fraturas em animais e, especialmente nas espécies de grande porte, geram preocupação quanto ao custo do tratamento e a ocorrência de sequelas, pois há a possibilidade de complicações pela carga excessiva que esses animais exercem sobre os membros. Dessa forma é importante a imobilização imediata do membro e de maneira adequada, e avaliar se há necessidade de se realizar cirurgia para estabilização da fratura. Em algumas fraturas pode haver falhas ósseas, principalmente em fraturas cominutivas com extensa lesão de tecidos adjacentes, o que dificulta e prolonga o tempo de consolidação. Por essas razões vem sendo estudado, há alguns anos, o uso de substitutos ósseos na forma de cimentos ou mantas ósseas para reparar esses defeitos. O estudo com biomateriais como substitutos ósseos tem tido grande evolução nos últimos anos, e aqueles à base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno apresentam grande vantagem, pois a quitosana estimula a regeneração óssea, a hidroxiapatita confere a dureza que o material exige, e o colágeno fornece maleabilidade. O presente projeto teve por objetivo avaliar o reparo ósseo após implante de compósito à base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno, em falhas ósseas de tíbias de ovinos induzidas experimentalmente. Foram utilizados os métodos de imagem por densitometria ótica radiográfica e microtomografia computadorizada 3D para avaliar o grau e o tempo de reparo ósseo, assim como a densidade mineral óssea durante a cicatrização. As falhas ósseas foram confeccionadas nas tíbias de ovelhas, em ambos os membros, onde foi implantado o biomaterial em um deles, e o membro contralateral mantido como controle. Posteriormente, os animais foram submetidos a exames radiográficos, quinzenalmente, até 90 dias de pós-operatório. Após este período, os animais foram submetidos à eutanásia e

fragmentos das tíbias foram colhidos para avaliação por microtomografia computadorizada 3D. Observou-se, pelos resultados qualitativos das imagens radiográficas e dos dados estatísticos, que houve absorção gradativa do biomaterial, e que não houve diferença estatística em relação à densidade mineral óssea entre os dois grupos estudados, embora a DMO tenha sido maior nos membros com o biomaterial. Este método mostrou-se prático e eficaz, além de ser uma técnica não invasiva. A microtomografia computadorizada 3D revelou importantes informações quanto à porosidade óssea e volume ósseo entre os dois grupos. As imagens em 3D mostraram detalhes do osso que não eram possíveis de visualizar por meio das radiografias. Dessa forma é uma técnica bastante eficaz e detalhada, mas é necessária padronização de todas as amostras para poder quantificar os valores adequadamente. O estudo estatístico não mostrou diferenças entre os grupos com biomaterial e controle para os parâmetros de volume ósseo, grau de porosidade e porcentagem de volume ósseo. Porém, pelas imagens em 3D observa-se nitidamente maior quantidade de poros nas amostras controle em relação às amostras com biomaterial. Conclui-se com este estudo que as técnicas de densitometria óssea por raios-X e μ CT 3D são bastante eficazes para avaliar a cicatrização óssea em ovinos.

Palavras-chave: Biomaterial. Densidade mineral óssea. Microtomografia computadorizada. Ovelhas.

ABSTRACT

LHAMAS, C. L. Evaluation by bone densitometry and 3D micro-computed tomography of chitosan, hydroxyapatite and collagen composite as bone substitute in bone defect experimentally induced in the tibia of sheep. [Avaliação por densitometria óssea e microtomografia computadorizada 3D de (compósito) manta óssea à base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno, como reparo de falhas ósseas induzidas experimentalmente em tíbias de ovinos]. 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The occurrence of fractures in animals and, especially, in large animals are conditions that generate concern about the cost of treatment and the occurrence of future complications because there is the possibility of complications due to excessive load that these animals receive in their limbs. Thus, it is important the limb immobilization immediately and appropriately and assess whether it is necessary to perform surgery to stabilize the fracture. In some kinds of fractures, it might have large bone defects, mainly in comminuted fractures with extensive damage to surrounding tissue, which makes it more difficult and prolongs the consolidation time. For these reasons, scientists have been studied the use of bone substitutes in the form of bone cements to repair these defects. The study of biomaterials as bone substitutes has had great progress in last years, and those based on chitosan, hydroxyapatite and collagen had great advantage because chitosan stimulates bone regeneration, hydroxyapatite confers the hardness that the material requires, and collagen provides flexibility to the material. This project aims to assess bone repair after deploying a composite of chitosan, collagen and hydroxyapatite in bone defects experimentally induced in sheep tibiae. For assessing the degree and the time of bone healing, it was used imaging techniques like radiographic bone densitometry and 3D micro-computed tomography. Bone defects were made in the sheep tibiae in both limbs where the biomaterial was deployed in one of them, and the control was the contralateral limb. After the surgeries, the animals were submitted to radiographic exams every two weeks until 90 days postoperatively. After this period, the animals were euthanized and harvested tibiae fragments for evaluation by 3D micro-computed tomography. Through the

qualitative results of images and statistical data, it was observed, radiographically, that there was a gradual absorption of the biomaterial, and also that there was no statistical difference in relation to bone mineral density between the two groups. The method of determining the X-ray BMD proved to be practical and effective, and it is a noninvasive technique. 3D micro-computed tomography revealed important information about bone porosity and bone volume between the two groups. The 3D images showed bone details that were not possible to visualize through radiographs. Thus it is a highly effective and detailed technique, but it requires patterning of all the samples in order to quantify the amounts properly. Statistical analysis showed no differences between the groups for bone volume parameters, degree of porosity and percentage of bone volume. However in the 3D images, it can be observed clearly larger amount of pores in the control samples in comparison to those with biomaterial. It is concluded from this study that the techniques of bone densitometry X-ray and 3D μ CT are very effective to evaluate bone healing in sheep. Bone mineral density was higher in limbs with biomaterial and there was a higher bone volume and lower degree of porosity in the samples with biomaterial compared to the control group.

Keywords: Biomaterial. Bone mineral density. Micro-computed tomography. Sheep.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Biomaterial a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno após esterilização - São Paulo - 2016.....	41
Figura 2 - Realização de falha óssea de 5mm de diâmetro e implantação do biomaterial em tíbia de ovino (face medial) - São Paulo - 2016.....	41
Figura 3 - Penetrômetro de alumínio utilizado como referencial densitométrico - São Paulo - 2016	44
Figura 4 - Microtomógrafo de raios-X SkyScan 1176 (Bruker) - São Paulo - 2016.....	46
Figura 5 - Amostras ósseas no interior de tubo Falcon de 50 mL, antes se serem colocadas no microtomógrafo - São Paulo - 2016.....	46
Figura 6 - Interface do software CTAn (Bruker, Bélgica) - São Paulo - 2016	47
Figura 7 - Fragmento tibial com falha óssea em sua face cortical - São Paulo - 2016.....	51
Figura 8 - Imagens radiográficas nos momentos D0, D45 e D90 para realização de densitometria óssea - São Paulo - 2016	52
Figura 9 - Visualização através de μ CT em 3D e poros do biomaterial utilizado no experimento - São Paulo - 2016.....	56
Figura 10 - Fragmento tibial em 3D, obtido por meio de μ CT - São Paulo - 2016	57
Figura 11 - Microtomografia das amostras membro controle (A) e membro com biomaterial (B) aos 90 dias - São Paulo - 2016	58
Figura 12 - Visualização em 3D de amostras ósseas controle e com biomaterial, respectivamente – São Paulo - 2016	59
Figura 13 - Imagens em 3D de amostras controle e com biomaterial evidenciando a presença de poros - São Paulo - 2016.....	60
Figura 14 - Porosidade através dos softwares CTVox (acima) e CTVol (abaixo) de amostras controle e com biomaterial referentes ao mesmo animal - São Paulo - 2016	60
Figura 15 - Amostra óssea com biomaterial, visualizada pelo software DataViewer - São Paulo - 2016	61

Gráfico 1 - Gráfico boxplot comparativo ao longo do tempo do membro tratado com biomaterial ao longo dos dias – São Paulo - 2016	54
Gráfico 2 - Gráfico boxplot comparativo do membro controle ao longo dos dias – São Paulo - 2016	54
Gráfico 3 - Gráfico de mediana ao longo dos dias, comparando membro tratado com biomaterial e membro controle quanto a DMO – São Paulo - 2016.....	55
Gráfico 4 - Volume ósseo em mm ³ das amostras com biomaterial e controle. São Paulo – 2016	62
Gráfico 5 - Porcentagem de poros das amostras com biomaterial e controle no D90 - São Paulo - 2016	63
Quadro 1 - Dados analisados por meio de μ CT, com suas respectivas siglas, unidades de medida e descrições - São Paulo - 2016	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias de exames físicos nos sete dias de pós-operatório - São Paulo - 2016.....	50
Tabela 2 - Tabela comparativa da densidade mineral óssea (mm de Alumínio) dentro e entre os grupos - São Paulo - 2016	53
Tabela 3 - Tabela comparativa dos grupos biomaterial e controle nas avaliações por μ CT - São Paulo - 2016.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BV/TV	Porcentagem de volume ósseo
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetros
DMO	Densidade mineral óssea
DOR	Densitometria ótica radiográfica
FAPESP	Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo
FC	Frequência cardíaca
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FR	Frequência respiratória
HA	Hidroxiapatita
HU	Hounsfield
IB	Instituto de Biociências
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
kg	Quilogramas
kV	Quilovolts
mAs	Miliampère-segundo
mg.kg ⁻¹	Miligramas por quilo
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mmAl	Milímetros de Alumínio
MR	Movimentos ruminais
NaCl	Cloreto de sódio
TC	Tomografia computadorizada
TCP-β	Tricálcio fosfato β
TPC	Tempo de preenchimento capilar
TR	Temperatura retal
USP	Universidade de São Paulo
VOI	Volume de interesse

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μA	Microamperes
μCT	Microtomografía computadorizada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	OVINO COMO MODELO EXPERIMENTAL	24
2.2	TECIDO ÓSSEO E ENGENHARIA TECIDUAL	25
2.3	BIOMATERIAIS	26
2.3.1	Quitosana	29
2.3.2	Hidroxiapatita	30
2.3.3	Colágeno	31
2.3.4	Mantas ósseas à base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno	32
2.4	MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA	33
2.5	DENSITOMETRIA ÓSSEA	34
3	JUSTIFICATIVA	36
4	OBJETIVOS	37
4.1	OBJETIVOS GERAIS	37
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5	MATERIAL E MÉTODO	38
5.1	ANIMAIS (MANEJO NUTRICIONAL E SANITÁRIO)	38
5.2	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO (PRÉ-OPERATÓRIO)	39
5.2.1	Avaliação Física	39
5.2.2	Avaliação Radiológica com aparelho digital	39
5.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO (ANESTESIA E CIRURGIA)	40
5.4	AVALIAÇÕES PÓS-OPERATÓRIAS	42
5.5	EUTANÁSIA E COLETA DOS FRAGMENTOS ÓSSEOS	43
5.6	AVALIAÇÕES POR DENSITOMETRIA ÓSSEA	44
5.7	AVALIAÇÕES POR MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA 3D (μ CT)	45
5.8	MÉTODO ESTATÍSTICO	49
6	RESULTADOS	50
7	DISCUSSÃO	65
7.1	OVINO COMO MODELO EXPERIMENTAL	65
7.2	BIOMATERIAIS COMO SUBSTITUTOS ÓSSEOS	66

7.3	DENSITOMETRIA ÓSSEA POR RAIOS-X	67
7.4	MICROTOMOGRFIA COMPUTADORIZADA 3D.....	68
8	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO	81

1 INTRODUÇÃO

As fraturas ósseas estão entre os problemas médicos mais comuns, pois podem ocorrer em pessoas e animais domésticos de todas as idades. Os cuidados com o manejo das fraturas concentram-se na identificação do tipo e da extensão do trauma e na criação de um ambiente biológico que maximize os processos normais de reparação do osso. Um dos principais objetivos do tratamento é evitar as muitas complicações que podem acompanhar a lesão musculoesquelética (DE MARVAL et al., 2011).

Atualmente alguns métodos são utilizados para corrigir defeitos ósseos, tanto em ortopedia humana quanto veterinária, porém os resultados muitas vezes não são satisfatórios. Isso ocorre principalmente quando se tratam de defeitos irregulares e extensos, nos quais o processo de reparo ósseo resulta na formação de um tecido cicatricial com características indesejáveis, quando comparado ao tecido original (VERTENTEN et al., 2010). Com o objetivo de maximizar a reparação óssea em diversas situações e minimizar possíveis desvantagens e complicações com a utilização de enxertos ósseos autógenos, foi desenvolvida uma grande variedade de substitutos ósseos, dentre eles os biomateriais (PEREZ-SANCHEZ et al., 2010). Segundo Chim e Gosain (2009), biomateriais são definidos como quaisquer substâncias, naturais ou sintéticas, que abrangem o todo, ou uma parte de uma estrutura viva ou um dispositivo biomédico que executa, complementa ou substitui uma função natural. Estes devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos receptores (KAWACHI et al., 2000).

Apesar da existência de grande variedade de biomateriais, ainda há poucos estudos a respeito de suas características, propriedades e interação entre implante e tecido receptor, tanto *in vitro* como *in vivo*, o que dificulta o desenvolvimento de um material adequado (BEDZIN'SKI et al., 2010; VAN LIESHOUT et al., 2011). A produção de biomateriais está crescendo a cada ano, e há muitas razões clínicas para o seu desenvolvimento, principalmente quando se trata de tecido ósseo em que é necessário o preenchimento de defeitos extensos. Nesse contexto, é cada vez mais estudado o desenvolvimento de implantes que são submetidos a forças mecânicas

extremas, com finalidade ortopédica. Atualmente, a engenharia de tecidos busca o desenvolvimento de material que tenha composição, nanoestrutura e resposta biológica semelhante ao tecido ósseo natural. Adicionalmente, tal material deve apresentar características semelhantes ao osso, tais como forma, tamanho, topografia, porosidade, propriedades mecânicas e bioquímicas (KIKUCHI et al., 2001).

Os biomateriais podem ser metálicos, cerâmicos, polímeros (sintéticos e biógenos), além de compósitos (BURG et al., 2000; ITOH et al., 2002). As biocerâmicas de fosfato de cálcio natural ou sintético, como por exemplo, os cimentos ósseos de fosfato de cálcio, são amplamente utilizados como substitutos ósseos há muitos anos. Esses materiais são osteocondutores (têm habilidade de servir como arcabouço para crescimento e formação óssea), mas não são osteoindutores (habilidade de formar osso quando implantados em locais não ósseos) (AMARAL, 2006).

Polímeros de origem sintética também estão sendo utilizados na área de engenharia de tecidos. A grande desvantagem da utilização destes é desencadear respostas inflamatórias e falhas em promover sinais de reconhecimento celular. Esses problemas podem ser minimizados por meio da utilização de polímeros extraídos de fontes naturais, tais como o colágeno e a hidroxiapatita natural. Compósitos à base desses polímeros estão sendo desenvolvidos com o intuito de melhorar as propriedades mecânicas e biológicas, não encontradas em outros biomateriais, pois mostram baixa irritabilidade tecidual, permitindo, assim, evolução reparadora do tecido ósseo (KIKUCHI et al., 2001; ITOH et al., 2002).

A quitosana, outro biopolímero natural derivado da quitina, é um polissacarídeo encontrado em abundância na natureza, e tem demonstrado ser uma alternativa como substituto ósseo por auxiliar na formação de tecido ósseo (HUANG et al., 2005; WAN et al., 2005; JUNG et al., 2007; COUTINHO et al., 2008). Adicionalmente, esse biopolímero apresenta comprovada atividade antibacteriana (GOY et al., 2009). A combinação de quitosana com hidroxiapatita ou outros derivados de fosfato de cálcio tem liderado pesquisas nas áreas de ortopedia e a produção de substitutos ósseos nas últimas décadas, pois demonstram maximização da capacidade osteogênica *in vivo*, permitindo o crescimento ósseo (THEIN-HAN; MISRA, 2009).

As propriedades biomecânicas do tecido ósseo podem variar de acordo com a idade, sexo, espécie, porosidade, densidade, mineralização, função e fatores hormonais. Testes biomecânicos do tecido ósseo, de implantes ortopédicos e da interface osso-implante vêm sendo realizados há alguns anos. O aumento da popularidade dos implantes ortopédicos para correção de fraturas levou a um crescente interesse pelas avaliações mecânicas desses implantes, tanto para uso em medicina humana quanto na veterinária (AN; DRAUGHN, 2000).

Várias técnicas de diagnóstico são utilizadas atualmente para avaliar a qualidade do tecido ósseo, sejam elas invasivas ou não invasivas. Dentre as técnicas não invasivas, a densitometria óssea radiográfica e a microtomografia computadorizada têm ganhado importância na pesquisa veterinária, e já são bastante difundidos na pesquisa em medicina humana e odontologia.

Ambos os métodos utilizam radiação ionizante, sendo que na densitometria óssea (DMO) uma fonte de radionuclídeos ou um tubo de raios-X são usados para gerar um feixe de radiação que é absorvido parcialmente pelo tecido ósseo. Um sistema detector avalia a quantidade de radiação absorvida e os dados coletados são computadorizados e comparados com padrões internacionais obtidos de uma população com DMO normal (KREIPE, 1992).

A densitometria óssea radiográfica utiliza a imagem mineral óssea em um filme radiográfico padrão como um indicador da absorção de fóton pelo osso, e então mensura indiretamente o conteúdo mineral ósseo. A densidade óptica, sob condições ideais, deve ser proporcional ao conteúdo mineral ósseo e não a densidade mineral óssea, como é algumas vezes suposto. O grau de clareamento do filme é mensurado por um densitômetro. A calibração de cada filme é realizada por exposição simultânea a uma escala de alumínio que tem a absorção de raios-X semelhante à do osso (CRANAGE, 1984).

A microtomografia computadorizada (μ CT) de raios-X é uma variante da tomografia de raios-X convencional, e surgiu com a necessidade de se inspecionar amostras com estruturas muito pequenas, da ordem de micrômetros (VIDAL, 2011). É uma técnica de ensaio não destrutivo, frequentemente utilizada no estudo da estrutura interna de ossos, com uma resolução espacial da ordem de microns (VIDAL, 2011). Esta técnica possui os mesmos embasamentos da tomografia computadorizada (TC), e é um avanço

nas técnicas de inspeção por raios-X, por ser um procedimento não invasivo, com alto poder de resolução, apresentando alta produção de radiação e boa estabilidade da energia máxima do tubo de raios-X. O diferencial dessa técnica está relacionado ao tamanho do foco desses tubos (LIMA et al., 2007).

Como μ CT e TC são técnicas que utilizam o mesmo princípio, a ideia básica da tomografia computadorizada é a mensuração de várias projeções, retendo a informação geométrica total sobre um objeto. As projeções são inversamente projetadas de volta para o espaço objeto, e o resultado combinado é uma função de objeto pesquisado bidimensionalmente (em uma fatia). Quanto mais projeções são coletadas e retroprojetadas, mais soluções exatas para a função objeto são obtidas (SALES, 2010).

O crescente interesse pela utilização de biomateriais tem aumentado o número de estudos que avaliem as características e possibilidades do uso destes como substitutos ósseos, além de respostas positivas do uso da quitosana em humanos (DALLAN et al., 2006).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OVINO COMO MODELO EXPERIMENTAL

Há muitos anos as ovelhas vêm sendo utilizadas como modelos experimentais para estudos em ortopedia, e seu uso com esse fim continua crescendo (NUSS et al., 2006; POTES et al., 2008; MARTINI et al., 2011). Em ortopedia humana, utilizam-se ovelhas devido às similaridades com humanos com relação ao tamanho, estrutura óssea e cartilaginosa, e regeneração óssea.

Os estudos na área de osteoporose humana também demonstram que a utilização de ovelhas, como modelos experimentais apresenta vantagens em relação a outras espécies animais (KAYMAKCI; WARK, 1994). Esses autores relataram que o animal ideal para a pesquisa em osteoporose deve ser grande o suficiente para facilitar amostragens em séries e procedimentos experimentais, possuir metabolismo mineral e estrutura óssea similar aos dos humanos. Além de ser rapidamente adaptável ao ambiente laboratorial e estarem disponíveis a preços razoáveis.

Apesar de os camundongos serem bem mais baratos e dispensarem a necessidade de grandes áreas para alojamento, eles apresentam muitas diferenças em relação à morfologia óssea (NUSS et al., 2006). No entanto, é necessário considerar que alguns fatores, como a dieta e alterações hormonais, podem modificar o metabolismo ósseo em ovelhas, mas esses fatores podem ser facilmente controlados quando se usa esse modelo animal em ortopedia (MARTINI et al., 2001).

Esses animais estão sendo utilizados com sucesso em estudos que avaliam a biocompatibilidade de vários biomateriais como substitutos ósseos, tanto em ortopedia, como em odontologia. Esse modelo animal facilita as avaliações de diferenças entre indivíduos e no próprio indivíduo, melhorando a acurácia estatística (NUSS et al., 2006; POTES et al., 2008).

Ademais, as ovelhas foram escolhidas como animais de experimentação para o presente estudo devido à ausência da fíbula, o que proporciona a

incidência da carga exclusivamente sobre a tíbia, facilitando na interpretação dos resultados (KRISCHAK et al., 2002).

2.2 TECIDO ÓSSEO E ENGENHARIA TECIDUAL

O osso é composto por componentes orgânicos (principalmente colágeno) e inorgânicos (hidroxiapatita nanocristalina), com uma estrutura hierárquica atingindo desde a nano até a macroescala. Sua função inclui fornecimento de suporte mecânico e transmissão de suporte físico-químico e mecânico-químico. O reparo clínico e reconstrução dos defeitos ósseos têm sido feitos usando-se tecidos autólogos e alogênicos, e materiais aloplásticos, com limitações funcionais (MCMAHON et al., 2013).

É um tecido de sustentação altamente especializado, complexo, vascularizado, que apresenta como características teciduais a rigidez e dureza. O tecido ósseo é também altamente dinâmico e versátil, com funções inerentes como apoio mecânico, possibilitar locomoção, proteger órgãos e agir como um reservatório de minerais, principalmente o cálcio (KÖNIG; LIEBICH, 2002; REIS, 2007; ROSCHGER et al., 2008).

Este tecido é constantemente remodelado, reabsorvido e neoformado. Este processo é conduzido por células e consiste basicamente na reabsorção do osso existente por osteoclastos, seguida pela deposição de osteócitos recém-formados de osteoblastos. A ativação do remodelamento inicia-se por estímulos de ordem mecânica ou hormonal, que atuam como fatores desencadeadores para iniciar o ciclo de remodelação óssea (ROSHGER et al., 2008).

Quando lesões induzidas por trauma ou uso de implantes ocorrem, desencadeia-se uma reação vascular provocada pela ruptura de vasos. Fluidos, proteínas e componentes celulares sanguíneos são atraídos para as áreas lesionadas e, como consequência, ocorre uma série de processos com a finalidade de promover o reparo ósseo (BARRETO, 2006).

Entretanto, nem sempre tais processos de reparação podem ocorrer em sua totalidade. São muito frequentes situações patológicas nas quais a perda tecidual é excessiva, e a capacidade de regeneração óssea limitada. Como consequência, seu reparo pode resultar na formação de um tecido conjuntivo cicatricial eventualmente com comprometimento funcional (MIGUEL et al., 2003).

Quando essa dificuldade de regeneração do tecido ósseo acontece, esses defeitos são chamados de críticos. Segundo Schmitz e Hollinger (1986) defeitos ósseos definidos como críticos são aqueles que apresentam determinadas características morfológicas de extensão e largura que impedem a regeneração óssea durante a vida do animal, a não ser que algum biomaterial com potencial osteogênico seja implantado. A abordagem empregada pela bioengenharia tecidual tem seu fundamento na possibilidade de restaurar e reconstruir a função de tecidos comprometidos estrutural e funcionalmente (POUND et al., 2007).

A bioengenharia tecidual óssea tem seu fundamento baseado na necessidade de que os implantes ortopédicos sejam mecânica e biologicamente mais adequados, e na busca de biomateriais que possam ser utilizados na reconstrução de grandes defeitos ósseos. Há a procura de materiais que possam servir de biomatriz, cuja finalidade é induzir a formação óssea de tecido circundante ou agir como transportador ou modelo para implantar células ósseas ou outros agentes (DI MARTINO, 2005).

2.3 BIOMATERIAIS

Os biomateriais são definidos como materiais utilizados na área médica ou biomédica, objetivando a interação com o tecido receptor, sendo, muitas vezes, uma alternativa efetiva para a substituição de tecidos, incluindo o ósseo, pois não apresentam riscos de transmissão de doenças ou rejeição imunológica (WILLIAMS; BLAYNEY, 1987; SPIN NETO, 2008).

O biomaterial deve possuir algumas características para que sua função biológica seja executada com sucesso e para que o mesmo possa ser utilizado

em íntimo contato com o tecido receptor. Essas características são: biocompatibilidade, previsibilidade, aplicabilidade clínica, ausência de riscos transoperatórios e sequelas pós-operatórias mínimas, além de aceitação pelo paciente. É importante também que o biomaterial não seja carcinogênico ou pirogênico, apresente estabilidade química e biológica, resistência mecânica e elástica adequada e tenha baixo custo. Há uma grande variedade de biomateriais substitutos ósseos que são acompanhados por avanço crescente no seu desenvolvimento e aperfeiçoamento, porém, ainda não existe um biomaterial que preencha todos esses quesitos (WILLIAMS; BLAYNEY, 1987).

Pode-se classificar algumas reações teciduais características: biodegradação, que é a diminuição gradual do material mediada por atividade biológica ou bioquímica específica; biorreabsorção e absorção, que é o processo de remoção do material mediado por atividade celular (diretamente por fagocitose ou indiretamente por ação enzimática contínua do material quando colocado em meios biológicos); e bioatividade, que é o comportamento do material bioativo capaz de induzir uma reação biológica específica, podendo se integrar com o tecido ósseo (AMARAL, 2006; NAVARRO et al., 2008; TABATA, 2009).

Na literatura há alguns trabalhos em que defeitos ósseos são produzidos experimentalmente e preenchidos com biomateriais. Porém, há alguns pontos críticos nesses trabalhos, por exemplo, o fato de que um biomaterial para implante ósseo, de origem não autógena, deve ser esterilizável, não tóxico, não induzir resposta imunológica e que possa estar disponível em quantidades suficientes. Além disso, este biomaterial deve ser capaz de induzir a diferenciação de células em osteoblastos, sendo ao mesmo tempo absorvível gradualmente, fornecendo um suporte condutivo para a formação de um osso novo. O material também deve funcionar como uma barreira mecânica para o crescimento de tecido fibroso ou invaginação de tecido muscular para dentro do defeito (AMARAL, 2006; CARVALHO, 2008; SPIN NETO, 2008).

Os biomateriais podem ser classificados para enxertia e implante de acordo com sua origem em quatro famílias: Autólogos, Homólogos, Aloplásticos e Xenogênicos. O biomaterial autólogo é obtido de áreas doadoras do próprio indivíduo. O homólogo é obtido de indivíduos de mesma espécie do receptor; os xenogênicos são obtidos de indivíduos de espécies diferentes do

receptor, sendo mais comumente obtidos de bovinos e, finalmente, os aloplásticos podem ser de natureza metálica, cerâmica ou polimérica (AMARAL, 2006; SPIN NETO, 2008).

São classificados como biomateriais metálicos aqueles que apresentam, quando na forma sólida, ligações metálicas em sua composição. Já os cerâmicos são aqueles obtidos pelo cozimento ou queima de minerais não metálicos, enquanto que os poliméricos são compostos formados pela combinação de unidades menores, unidas por ligações covalentes, formando macromoléculas, tais como a quitosana (SPIN NETO, 2008).

Os biomateriais podem também ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação, em osteogênicos (capacidade de levar consigo células viáveis), osteoindutores (induzem células mesenquimais indiferenciadas a se diferenciarem em osteoblastos, iniciando o processo de remodelação óssea) e osteocondutores (servem de arcabouço para a remodelação óssea, permitindo a migração celular, para o interior do defeito, e a proliferação de vasos sanguíneos, formando uma nova matriz óssea) (NAVARRO et al., 2008; TABATA, 2009).

Atualmente o enxerto autógeno é considerado como padrão ouro e é largamente empregado quando há necessidade de aumento do volume ósseo, visto que é o biomaterial que mais se aproxima das propriedades desejáveis como osteogênese, osteocondução e osteoindução, simultaneamente. Além disso, por ter origem no mesmo indivíduo que irá receber o enxerto, a aceitação do procedimento pelo organismo torna-se facilitada, sem risco de rejeição. Contudo, inconvenientes desta técnica podem ser descritos, como a necessidade de criação de uma segunda área cirúrgica, maior período de convalescença, susceptibilidade a infecções nos sítios doadores e, ainda, reabsorção progressiva e constante (AMARAL, 2006; CARVALHO, 2008; SPIN NETO, 2008).

Esses principais fatores movimentam pesquisas em busca de biomateriais não autógenos, capazes de contornar essas dificuldades e ao mesmo tempo trazer o máximo de vantagens desse biomaterial quando for possível (TABATA, 2009).

2.3.1 Quitosana

A quitosana é um biopolímero hidrofílico obtido a partir da quitina, um polissacarídeo abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose em quantidade produzida anualmente (BORSCHIVER et al., 2008). A quitina, segundo polímero mais abundante na natureza, é um polissacarídeo constituído por uma sequência linear de açúcares monoméricos, possuindo assim, estrutura semelhante à das fibras de celulose (SILVA et al., 2006; AZEVEDO et al., 2007).

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

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

O uso da quitosana como biomaterial é baseado em várias propriedades como biocompatibilidade e atoxicidade; biodegradabilidade, hidrólise enzimática por quitosanase e lisozima; bioadesividade; agente bacteriostático e antimicrobiano; hemostático; capacidade de formar barreiras; arcabouço para a proliferação celular e capacidade de ser suporte para a liberação de fármacos,

BMP (proteína óssea morfogenética) e células (SENEL; MCCLURE, 2004; AMARAL, 2006; SPIN NETO et al., 2008; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

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

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

2.3.2 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) faz parte de um grupo de minerais chamados apatitas, sendo caracterizada pela baixa solubilidade em sistemas aquosos e

bastante solúveis em ácidos halogenídricos. Ela pode ser obtida por meio da desproteinização do tecido ósseo ou por tratamento hidrotérmico de corais. Pode ser obtida também por processos sintéticos, tais como a precipitação de soluções aquosas ou reações de estado sólido (AMARAL, 2006).

A HA densa, porosa, particulada e de revestimento tem sido um importante biomaterial de reparo e preenchimento de tecido ósseo, tendo sido reportado com sucesso em alguns casos clínicos. O fosfato de cálcio, presente na superfície da hidroxiapatita, recruta células produtoras de osso, como osteoblastos, que se proliferam e diferenciam-se produzindo matriz extracelular composta de fosfato de cálcio e colágenos biológicos. Assim, a HA apresenta uma fase mineral superficial semelhante à fase mineral óssea, o que estabelece uma integração química bastante íntima com o osso (KIM, 2003; AMARAL, 2006).

Em estudo recente, avaliou-se a interação óssea com quatro biomateriais diferentes: hidroxiapatita, tricálcio fosfato- β (TCP- β), composto de hidroxiapatita/TCP- β 60/40 e nanocompósito hidroxiapatita/alumina 5%. Foram utilizadas oito ovelhas em que foram realizadas três falhas ósseas em cada membro. Ao final de 60 e 90 dias os animais foram submetidos à eutanásia e as tíbias separadas para avaliação por microscopia eletrônica de varredura e análise histológica por microscopia óptica. Nas falhas ósseas onde foram implantadas HA, observou-se, aos 90 dias, boa osteointegração e boa formação de tecido ósseo neoformado. Porém nas falhas em que foram preenchidas com composto HA e TCP- β , a qualidade do tecido ósseo formado foi superior àquela observada com a HA isolada (COSTA et al., 2015).

2.3.3 Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo, podendo ser encontrado em quase todo o organismo animal. As propriedades do tecido conjuntivo diferem devido às diversas organizações das fibras de colágeno. Sua principal característica é a formação de fibras insolúveis com alta força

elástica. O colágeno é responsável pela modulação das forças externas e internas exercidas no organismo. Além de seu papel estrutural nos tecidos, apresenta também a função de orientar os tecidos em desenvolvimento, fato altamente favorável na sua utilização como biomaterial (LEE, 2001; AMARAL, 2006).

Adicionalmente este material possui características importantes, tais como baixo índice de irritabilidade e alergenicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, interação com plaquetas ativando o processo de coagulação do sangue (agente hemostático), habilidade em promover crescimento celular e ainda é susceptível a modificações químicas (LEE, 2001; AMARAL, 2006).

Em virtude dessas propriedades, o colágeno possui uma posição privilegiada como biomaterial em diversas aplicações, como reconstrução de tecidos moles, revestimento de queimaduras e outras lesões, suporte para o crescimento de nervos periféricos, e agente hemostático. A grande vantagem da sua utilização, além de sua biocompatibilidade, é a possibilidade da alteração de suas propriedades superficiais por modificações químicas, resultando em matrizes colagênicas carregadas positiva ou negativamente. Por esses fatores, o colágeno vem sendo amplamente utilizado como matriz extracelular natural, ou seja, atuando como sítio de ancoragem e servindo como suporte tridimensional para o crescimento de um novo tecido (AMARAL, 2006).

2.3.4 Mantas ósseas à base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno

Compósitos com constituições distintas podem apresentar porosidades diferentes. No entanto as precipitações de fosfato de cálcio sobre matrizes poliméricas como o colágeno e a quitosana podem ser semelhantes aos tecidos naturais, o que pode favorecer a biocompatibilidade e crescimento celular interno (ITOH et al., 2002).

Mantas à base de quitosana, HA e colágeno apresentam estímulo vasculogênico que favorece o crescimento tecidual e osteocondução, devido a

estímulos provenientes dessas substâncias. Este compósito não estimula inflamação crônica, o que é um bom parâmetro de biocompatibilidade, e apresenta reabsorção facilitada em ratos em decorrência da matriz orgânica e da hidroxiapatita em partículas pequenas (AMARAL, 2006).

2.4 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

A microtomografia computadorizada (μ CT) é técnica de ensaio não destrutivo, frequentemente utilizada no estudo da estrutura interna de ossos, com uma resolução espacial da ordem de microns (VIDAL, 2011). Ela possui os mesmos embasamentos da TC e é um avanço das técnicas de inspeção por raios-X, por ser um procedimento não invasivo, com alto poder de resolução, apresentando alta produção de radiação e boa estabilidade da energia máxima do tubo de raios-X. O diferencial dessa técnica está relacionado ao tamanho do foco do tubo de raios-X (LIMA et al., 2007).

Primeiramente apresentada por Feldkamp e colegas no final dos anos 1980, a μ CT se tornou o “padrão ouro” para avaliação da morfologia e microarquitetura óssea em ratos e outros modelos animais de pequeno porte *ex vivo* (BOUXSEIN et al., 2010).

O pequeno diâmetro do foco deste tubo é um atributo muito importante do ensaio de μ CT. Isso ocorre porque quanto menor for esse parâmetro, melhor se dará a focalização das estruturas inspecionadas, o que está intimamente relacionado com a qualidade da imagem adquirida no ensaio microtomográfico (LIMA et al., 2007).

Portanto, esta técnica permite a visualização de centenas de cortes não destrutivos, a visualização tridimensional de porções específicas e quantificações automatizadas nas amostras (REIS-NETO et al., 2011).

A imagem 3D de um objeto é um mapeamento 3D da absorção local de raios-x no objeto. A reconstrução através de múltiplas projeções fornece informação da absorção de raios-x em cada voxel do volume escaneado. A intensidade em níveis de cinza de cada voxel da imagem não tem relação direta com a medida de densidade volumétrica. O parâmetro primário é a

absorção de raios-x definida como coeficiente de atenuação linear (AC). A microtomografia com cone de radiação, produzida por fontes focais de raios-x, calcula o coeficiente de atenuação para cada voxel do objeto escaneado.

O conhecimento de que a absorção dos raios-x é dominada por um material específico permite relacionar o coeficiente de atenuação à densidade daquele material. A calibração da DMO é um exemplo. Assume-se que a atenuação do raio-x nos tecidos mineralizados, como osso, dentina e esmalte dentário, é dominada pela atenuação da hidroxiapatita de cálcio. *Phantoms* com concentrações conhecidas dessa substância são utilizados na calibração. A calibração nos microtomógrafos da Bruker® (Bélgica, Holanda) resulta em uma equação que relaciona a DMO com o coeficiente de atenuação ou com unidades de densidade expressas em *Hounsfield* (HU), cujo valor varia de -1000 para o ar e zero para a água (PAOLILLO, 2013).

Diversos trabalhos têm usado a μ CT para avaliação da qualidade óssea quanto à porosidade, número de trabéculas e DMO, podendo predizer o risco de fraturas, na Medicina Humana e Odontologia (ALENCAR; FIGUEIREDO; ESTRELA, 2008; LIMA et al., 2009; ROQUE et al., 2012), porém, ainda há poucos estudos com essa técnica em Medicina Veterinária. Deve-se considerar também que a maioria dos trabalhos com μ CT foram realizados para avaliar osso trabecular.

Cipitria et al. (2013) realizaram estudo com falhas ósseas segmentares em tíbia de ovinos e avaliaram por μ CT, radiografias, histologia e testes biomecânicos, comparando e relacionando os diferentes métodos. As avaliações feitas por μ CT foram feitas do osso inteiro, e, dessa maneira, outros parâmetros foram avaliados.

2.5 DENSITOMETRIA ÓSSEA

A densitometria ótica radiográfica (DOR) é um método para mensuração da DMO que, por meio da ação fotoquímica da luz sobre emulsões sensíveis, determina a relação existente entre a quantidade de luz recebida em uma película sensível e a quantidade de sal de prata que será reduzida por

enegrecimento direto ou por revelador (LOBEL; DUBOIS, 1973). Por se tratar de uma técnica recente, a DOR é ainda pouco empregada na Medicina Veterinária (VULCANO et al., 2008).

Em trabalho de revisão, Grier et al. (1996) ressaltaram a importância da mensuração do conteúdo mineral ósseo no estudo de doenças metabólicas ósseas, nos processos de consolidação de fraturas, em implantes metálicos e no efeito de fármacos sobre o metabolismo ósseo.

Jimenez (2009) avaliou durante quatro meses, por meio de DOR, os metacarpianos de 14 ovinos sadios da raça Santa Inês, machos, castrados, de aproximadamente um ano de idade. Apesar dos resultados não terem apresentado diferenças entre as idades estudadas, pôde-se concluir que a técnica pode ser instituída como rotina na clínica desses animais, além de ter sido de fácil execução, precisa, não invasiva e de custo reduzido.

Selim (2013) também estudou, por meio de DOR, o reparo ósseo e valores de DMO após a realização de ostectomia em terceiro metacarpiano de equinos, com a implantação de biomaterial à base de polímero de mamona. Foram feitas avaliações radiográficas até o 120º dia de pós-operatório, e pôde-se concluir que houve preenchimento significativo das falhas ósseas, a partir do D90, tanto na presença quanto na ausência do biomaterial. No entanto, este processo ocorreu em velocidades diferentes em cada grupo, sendo mais lento naquele que foi preenchido com o polímero.

3 JUSTIFICATIVA

O presente estudo visa à validação de duas técnicas por imagens radiológicas como meio de avaliação da regeneração óssea em ovinos, frente à utilização de um novo substituto ósseo, nunca antes estudado nesta espécie. A densitometria ótica radiográfica é empregada para determinar a regeneração óssea de forma sequencial por meio de densidade mineral óssea e, por ser técnica minimamente invasiva e de baixo custo; é importante avaliar se a mesma traz benefícios para o estudo de substitutos ósseos e não apenas para os estudos com metabolismo ósseo como vem sendo utilizada nas pesquisas da área de ortopedia.

A técnica de microtomografia computadorizada 3D, por ser mais atual e com maior acurácia, vem se tornando de extrema importância pela sua capacidade de avaliar o remodelamento ósseo por meio de imagens na ordem de microns. Ademais, o aumento da relevância desta técnica na pesquisa em ortopedia nos últimos anos, justifica a necessidade de avaliar, neste estudo, o remodelamento ósseo na espécie ovina e determinar o tempo de cicatrização ideal para esta espécie.

Desta forma, este trabalho fornece bases para pesquisadores da área de medicina veterinária e de outras áreas que utilizem a espécie ovina como modelo animal para projetos de pesquisa na área de ortopedia, quanto ao padrão da cicatrização óssea nesta espécie, no que se refere ao uso de um novo biomaterial. Além disso, visa proporcionar conhecimento a respeito das técnicas de diagnóstico por imagem propostas, ao mesmo tempo em que considera se as mesmas são capazes de avaliar adequadamente a cicatrização óssea em um período de 90 dias.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a interação osso/implante da manta óssea à base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno, no reparo de falhas ósseas induzidas experimentalmente em tíbias de ovinos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar valores de densidade mineral óssea para, assim, estimar o padrão de cicatrização óssea nos membros com biomaterial em relação aos controles.

Avaliar se os métodos de diagnóstico (Densitometria Óssea por raios-X e Microtomografia Computadorizada 3D) utilizados são capazes de responder quanto ao grau de reparo ósseo em ovinos ao longo 90 dias de pós-operatório.

5 MATERIAL E MÉTODO

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP) para avaliação, sendo aprovado sob protocolo número 1813080614.

A fase experimental do projeto de pesquisa foi realizada no segundo semestre de 2014.

5.1 ANIMAIS (MANEJO NUTRICIONAL E SANITÁRIO)

O projeto de pesquisa propôs a utilização de seis ovinos, fêmeas, não prenhes, adultas, híginas, da raça Santa Inês, com peso corporal dentre 25 kilogramas (kg) a 40kg. No transcorrer do estudo, os animais foram mantidos em regime de estabulação e receberam água e feno de tifton (*Cynodon nlemfuensis*) *ad libitum*, além de alimento concentrado comercial peletizado calculado com base no peso vivo, levando-se em consideração uma dieta de manutenção. Os animais também receberam, semanalmente, sal mineral comercial para ovinos.

Após serem alojados no Hospital Veterinário FMVZ-USP, no Serviço de Cirurgia de Grandes Animais, os ovinos foram identificados e vacinados contra clostridiose¹ (primeira dose e reforço após 30 dias). Exames laboratoriais (hemograma completo, perfil hepático, perfil renal, e coproparasitológico) foram realizados. Os ovinos foram também vermifugados de acordo com o peso vivo com moxidectina².

¹ Sintoxan Polivalente T[®], Merial Saúde Animal, Paulínia- SP, Brasil.

² Ripercol[®], Fort Dodge, Campinas- SP, Brasil.

5.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO (PRÉ-OPERATÓRIO)

5.2.1 Avaliação Física

Realizou-se exame físico completo, diariamente, do qual foram aferidos: frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), tempo de preenchimento capilar (TPC), coloração de mucosas, temperatura retal (TR) °C e movimentação ruminal (MR).

Antes de serem submetidos ao procedimento cirúrgico, todos os animais foram avaliados fisicamente e em movimento, para determinação do grau de claudicação, que foi pontuado de um a cinco. Determinou-se que se algum animal apresentasse claudicação no exame pré-cirúrgico, este seria substituído. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram reavaliados semanalmente até completados os 90 dias de pós-operatório.

5.2.2 Avaliação Radiológica com aparelho digital

Os animais tiveram suas tíbias radiografadas no período pré-cirúrgico (exame radiográfico de controle), transcirúrgico, para orientação do local onde seria realizada a ostectomia, no pós-cirúrgico imediato e quinzenalmente até 90 dias de pós-operatório. Com o objetivo de realizar a documentação, as radiografias foram sempre realizadas nas projeções crânio-caudal e látero-medial dos dois membros pélvicos.

A técnica radiológica utilizada foi de 74 quilovolts (kV) e 0,06 miliampère-segundo (mAs). Foi padronizada distância de um metro entre o emissor e o membro radiografado.

O aparelho de raios-X utilizado é composto por emissor portátil³ e por painel digital⁴ e foi adquirido com recursos financeiros de Auxílio à Pesquisa

³ Min X Ray. Northbrook, IL, USA

vinculado à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

5.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO (ANESTESIA E CIRURGIA)

Os animais foram submetidos a jejum alimentar e hídrico por 48 e oito horas, respectivamente, anteriores ao procedimento cirúrgico. Na data da cirurgia foi realizada tricotomia em ambos os membros pélvicos e colocação de cateter venoso na jugular.

No centro cirúrgico, o animal foi posicionado na mesa cirúrgica em decúbito lateral direito. Os membros pélvicos foram radiografados antes do início do procedimento cirúrgico, nas projeções látero-medial e crânio-caudal, em ambas as tíbias, para a identificação exata do local de realização da falha óssea. Também foi utilizada, como referência, régua de inox para determinar a localização da falha óssea, esta determinada a sete centímetros (cm) do côndilo medial da tíbia.

As ovelhas foram submetidas à anestesia geral inalatória, seguindo o protocolo descrito a seguir: medicação pré-anestésica com cloridrato de xilazina⁵ {(0,05 mg.kg⁻¹, via intravenosa (IV)), indução anestésica com propofol⁶ (6 mg.kg⁻¹, IV), e manutenção anestésica com isoflurano⁷ vaporizado em oxigênio a 100%.

Realizou-se a antisepsia dos membros e localizou-se a região da falha óssea, na face dorso-medial, a sete cm do côndilo medial da tíbia. Após a identificação do local da falha óssea, o membro foi radiografado novamente, para confirmação e documentação do local desta. Foi realizada incisão de cinco cm de pele, em meia-lua, seguida da divulsão do tecido subcutâneo subjacente, e incisão do periósteo no mesmo padrão da pele. O periósteo foi rebatido do osso e, em seguida, foi realizada a ostectomia com serra trefina de

⁴ Sound Eklín. Carlsbad, CA, USA

⁵Rompum[®], Bayer Saúde Animal, São Paulo, S.P., Brasil.

⁶Propovan[®], Cristália, Itapira, S.P., Brasil.

⁷Isoforine[®], Cristália, Itapira, S.P., Brasil.

cinco milímetros (mm) de diâmetro acoplada a perfuradora elétrica, sob irrigação constante com solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%.

Em um dos membros, escolhido aleatoriamente, foi implantado o biomaterial à base de quitosana, HA e colágeno (Figuras 1 e 2), no local da falha óssea, sendo que o membro contralateral serviu como controle de remodelamento ósseo. O biomaterial utilizado neste estudo foi desenvolvido e cedido pela Professora Ana Maria de Guzzi Plepis e sua equipe do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo (Anexo A).

Figura 1 - Biomaterial a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno após esterilização - São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C. L., 2016)

Legenda: Dois fragmentos de biomaterial a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno após esterilização e embalagem, prontos para serem implantados nas falhas ósseas.

Figura 2 - Realização de falha óssea de 5mm de diâmetro e implantação do biomaterial em tíbia de ovino (face medial) - São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C. L., 2016)

Legenda: Falha óssea circular de 5 mm de diâmetro na tíbia (1a) e implantação do biomaterial a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno visualizado no interior da falha (1b)

Os implantes foram recobertos pelo periósteo que foi suturado com fio poliglecaprone 25 nº 2.0, sendo o subcutâneo aproximado em padrão *Cushing* com o mesmo tipo de fio de sutura, e a dermorrafia foi realizada com fio *mononylon* nº 2.0 no padrão isolado simples. Os procedimentos cirúrgicos foram sempre realizados pelo mesmo cirurgião e auxiliar.

Após o término do procedimento, foi realizado curativo das feridas cirúrgicas por meio de higienização com gaze embebida em solução de NaCl a 0,9% e aplicação de Rifamicina *spray*, e proteção com fita Micropore®.

O protocolo analgésico utilizado empregou sulfato de morfina⁸ na dose de 0,05 mg.kg⁻¹, diluído em 10 mL de solução fisiológica, administrada via cateter epidural aproximadamente trinta minutos antes do término do procedimento; o fármaco foi administrado a cada 24 horas e o cateter retirado após 48 horas. Também foi administrado fenilbutazona⁹ (4 mg.kg⁻¹, IV) a cada 24 horas durante três dias, além de cloridrato de ranitidina¹⁰ (2 mg.kg⁻¹, IV) a cada 24 horas, pelo mesmo período. A terapia antimicrobiana foi realizada com sulfadoxina com trimetoprima¹¹ {(30 mg.kg⁻¹, via intramuscular (IM)) uma vez ao dia por cinco dias. O curativo da ferida cirúrgica foi feito diariamente da mesma maneira realizada no pós-cirúrgico imediato.

5.4 AVALIAÇÕES PÓS-OPERATÓRIAS

Os animais foram acompanhados nos pós-cirúrgico com exames físicos diários, nos quais foram mensurados: frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal (TR) °C e frequência de movimentos ruminais (MR).

Os curativos das feridas cirúrgicas também foram realizados diariamente, e, assim, observavam-se as características da ferida cirúrgica nos 14 dias da realização destes, até a retirada dos pontos. As feridas cirúrgicas foram avaliadas quanto à presença de deiscência da sutura, infecção (avaliada

⁸ Dimorf Solução Injetável®, Cristália, Itapira, S.P., Brasil.

⁹ Equipalazone Injetável®, Marcolab, Duque de Caxias, R.J., Brasil.

¹⁰ Cloridrato de Ranitidina®, Novafarma, Anápolis, G.O., Brasil.

¹¹ Borgal®, Intervet do Brasil, Cotia, S.P., Brasil.

pela presença de secreção purulenta) e reação inflamatória (avaliada pela presença de dor e edema).

As radiografias simples foram realizadas nesse período para determinação da densidade mineral óssea (DMO), nos momentos D0 (dia zero), D15 (dia 15), D30 (dia 30), D45 (dia 45), D60 (dia 60), D75 (dia 75) e D90 (dia 90).

5.5 EUTANÁSIA E COLETA DOS FRAGMENTOS ÓSSEOS

Após esse período de avaliações (90 dias), os animais foram submetidos à eutanásia e, imediatamente, coletadas as tíbias. O protocolo de eutanásia utilizado foi: sedação com cloridrato de xilazina¹² (0,1 mg.kg⁻¹, IV) e, após 5 minutos, indução anestésica com tiopental sódico¹³ (12,5 mg.kg⁻¹, IV) e cloreto de potássio 19,1%¹⁴ (aproximadamente 100 mL ou mais, considerando-se a quantidade suficiente para a parada cardiorrespiratória). Após o óbito e a coleta dos fragmentos das tíbias, as carcaças foram encaminhadas ao Sistema de Descarte de Carcaças da FMVZ-USP.

As eutanásias foram realizadas conforme Resolução CFMV nº1000/2012, de 11 de maio de 2012.

As tíbias foram dissecadas para que fragmentos de um cm de comprimento fossem coletados, com a falha óssea localizada ao centro. Um corte longitudinal foi realizado para a obtenção apenas da cortical-*cis*, não havendo necessidade do diâmetro total do osso.

Os fragmentos ósseos foram envoltos em gaze umedecida com solução fisiológica a 0,9%, para então serem depositados, individualmente, em coletores universais preenchidos com solução de NaCl 0,9%. Os mesmos foram acondicionados sob congelamento a -20°C.

¹²Rompum®, Bayer Saúde Animal, São Paulo, S.P., Brasil

¹³Thiopentax®, Cristália, Itapira, S.P., Brasil.

¹⁴Cloreto de Potássio®, Halex Istar, Goiânia, G.O., Brasil.

5.6 AVALIAÇÕES POR DENSITOMETRIA ÓSSEA

O acompanhamento radiográfico pós-operatório foi realizado quinzenalmente. As radiografias ocorreram nos momentos D0, D15, D30, D45, D60, D75 e D90.

Para a obtenção das imagens radiográficas utilizou-se o aparelho de Raios-X portátil, digital, da *Sound EKLIN*. A técnica de exposição radiográfica utilizou 74 kV (Quilovolts), e tempo de exposição de 0,06 mAs (Miliampères por segundo). A projeção utilizada para mensuração da DMO foi a látero-medial, com distância focal de um metro entre o aparelho e o membro radiografado.

Para a padronização da técnica e interpretação da densidade mineral óssea foi utilizado um programa computacional especialmente desenvolvido para a medida de densidade óptica em imagens radiográficas, que contém a imagem radiográfica das tíbias. Também foi utilizada escala de alumínio de 25 degraus, o penetrômetro (Figura 3), usada como referencial densitométrico, permitindo a medida da DMO correspondente ao valor em milímetros da escala. O programa computacional que avaliou as imagens por DMO foi o *ImageJ®* (*Image Processing and Analysis in Java*).

Figura 3 - Penetrômetro de alumínio utilizado como referencial densitométrico - São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C. L., 2016)

Legenda: Penetrômetro de alumínio utilizado como referencial densitométrico na realização das radiografias digitais.

As imagens radiográficas foram salvas em formato JPEG para processamento no *Software ImageJ*[®].

5.7 AVALIAÇÕES POR MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA 3D (μ CT)

O descongelamento das amostras foi realizado em temperatura ambiente, 12 horas antes das avaliações por μ CT, e estas foram armazenadas em solução fisiológica a 0,9% para que fossem encaminhadas ao Instituto de Biociências (IB) da Universidade de São Paulo, para avaliações no microtomógrafo.

As avaliações microtomográficas foram realizadas no Laboratório de Microtomografia Computadorizada, localizado no Instituto de Biociências (IB) da USP, sob supervisão da técnica responsável Simone Gomes Ferreira.

Os ossos foram escaneados em Microtomógrafo modelo 1176 (SkyScan, Bélgica) (Figura 4) com rotação de 360°, tamanho de voxel de 9 μ c, utilizando-se um filtro de Cobre + Alumínio, com voltagem de 80 kV e corrente 300 μ A (microampères). As amostras foram fotografadas duas vezes a cada 0,3° de rotação até completarem 360° de rotação da fonte. O “*beam hardening*” aplicado foi de 19% para todas as amostras.

Figura 4 - Microtomógrafo de raios-X SkyScan 1176 (Bruker) - São Paulo - 2016

Fonte: www.ib.usp.br

Legenda: Modelo de microtomógrafo utilizado durante os escaneamentos das amostras 90 dias após os procedimentos cirúrgicos.

Antes de serem escaneados, cada fragmento foi encaixado entre duas pastilhas de espuma floral umedecida e, então, colocado no interior de tubos Falcon de 50 ml, de maneira que ficassem fixados os ossos às espumas florais, e estas aos tubos (Figura 5).

Figura 5 - Amostras ósseas no interior de tubo Falcon de 50 mL, antes se serem colocadas no microtomógrafo - São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C.L., 2016)

Legenda: Três amostras ósseas no interior de tubo Falcon de 50 mL, separadas entre si com espuma floral, prontas para serem colocadas no microtomógrafo.

O *software* utilizado para reconstituir as imagens escaneadas foi o *Bruker - MicroCT N-Recon*, utilizando-se o algoritmo de *Feldkamp* (1984). O *software* que realizou as análises das imagens foi o *CTAn* (versão 1.16.1.0) (Figura 6). Para a visualização em 3D das amostras foi utilizado o *software* *CTVox* (versão 3.1.2) e para a visualização dos ossos transparentes e seus poros foi utilizado o *software* *CTVol* (versão 2.3.2.0). Os quatro *softwares* utilizados são da SkyScan (Bruker, Bélgica).

Foram coletados seis dados diferentes para estudar as amostras aos 90 dias, os quais estão descritos no Quadro 1.

Figura 6 - Interface do *software* *CTAn* (Bruker, Bélgica) - São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C. L.; MENDES, R. G., 2016)

Legenda: Interface do *software* *CTAn* (Bruker – Bélgica) evidenciando fragmento ósseo sendo analisado e curva de escalas de cinza.

Quadro 1 - Dados analisados por meio de μ CT, com suas respectivas siglas, unidades de medida e descrições - São Paulo - 2016

Dados analisados	Sigla (*)	Unidade	Descrição
Volume Tecidual	TV	mm ³	Volume total do volume de interesse
Volume Ósseo	BV	mm ³	Volume total de objetos binarizados dentro do volume de interesse
Porcentagem de Volume Ósseo	BV/TV	%	Proporção de volume de interesse ocupado por objetos sólidos binarizados. Parâmetro relevante se o volume estudado completamente contido dentro de uma região bifásica bem definida de sólido e espaço
Superfície Tecidual	TS	mm ²	Área de superfície do VOI, medida em 3D
Superfície Óssea	BS	mm ²	Área de superfície de todos os objetos sólidos dentro do VOI, medida em 3D
Superfície de Intersecção	i.S	mm ²	Parâmetro utilizado para avaliar o crescimento ósseo em um limite definido – por exemplo, a uma distância fixa de um implante ortopédico

Fonte: *Bruker* μ CT – CT Analyzer

Legenda: Dados analisados para as amostras desse estudo através de μ CT, unidades de medidas e suas respectivas descrições.

(*): The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR)

Dentre os seis parâmetros analisados, o de maior relevância para o presente estudo é a porcentagem de volume ósseo (BV/TV), pois este indica a fração de um determinado volume de interesse (VOI) que é preenchida por osso mineralizado. Este parâmetro pode ser usado para avaliar as mudanças relativas na densidade de volume ósseo na sequência de determinado tratamento. Espera-se, portanto, que o grupo com biomaterial possua valores de BV/TV superiores ao do grupo controle.

Da mesma maneira foi calculado o BV/TV do biomaterial e, nesse caso, considera-se esse parâmetro como grau de porosidade do mesmo.

Para determinação da porosidade óssea a escala de cinzas foi padronizada para todas as amostras.

Os dados sobre DMO e μ CT dos membros com biomaterial e controle dos seis animais foram tabulados e submetidos ao tratamento estatístico mais adequado para o estudo.

5.8 MÉTODO ESTATÍSTICO

Foi descrita a densidade mineral óssea em mm de Alumínio pela média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo. Para a determinação da DMO através de imagens radiográficas foi utilizado o teste estatístico de Friedman para comparar as suas mudanças ao longo do tempo e, depois, para as comparações múltiplas. Para comparar os dados em cada tempo entre cada grupo foi utilizado o teste de Wilcoxon. Foi considerado um nível de significância de 5%.

Para o estudo estatístico da μ CT, foram descritas as variáveis estudadas pela média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo. Para comparar os dados entre o grupo biomaterial e controle foi utilizado o teste de Wilcoxon. Foi considerado um nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS

Com base na avaliação do exame de claudicação e no exame físico diário, a evolução clínica do procedimento pôde ser acompanhada. Além disso, o acompanhamento radiográfico, quinzenal, proporcionou minuciosa avaliação do grau da evolução da falha óssea, da interação com o biomaterial e da estabilidade dos implantes no leito receptor.

Os animais não apresentaram alterações nos exames físicos no período pós-operatório, conforme visualizado na Tabela 1, assim como não apresentaram nenhum grau de claudicação ou fraturas nesse período. Porém, três ovelhas apresentaram seroma na ferida cirúrgica, por volta do 14º dia de pós operatório, que foram drenados, sem que fossem observadas outras complicações.

Tabela 1 - Médias de exames físicos nos sete dias de pós-operatório - São Paulo - 2016

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
FC	71	67	71	73	84	76	73
FR	19	19	21	21	27	25	25
TR (°C)	38,4	38,5	37,9	38,4	38,0	37,9	38,0
MR	2/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3

Fonte: (LHAMAS, C. L., 2016).

Legenda: Médias de exames físicos entre os seis animais, nos sete dias de pós-operatório. FC: Frequência cardíaca por minuto. FR: Frequência respiratória por minuto. TR°C: Temperatura retal em graus Celsius. MR: Movimentos ruminais em três minutos.

Na coleta dos fragmentos tibiais após as eutanásias obsevou-se que, aos 90 dias, em alguns animais houve dificuldade em localizar a região da falha óssea, porém em outros, observava-se nitidamente tais falhas (Figura 7). No local de implantação não se observavam resquícios do biomaterial implantando.

Figura 7 - Fragmento tibial com falha óssea em sua face cortical - São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C. L., 2016)

Legenda: Fragmento tibial com falha óssea (seta – 1B) na face cortical 90 dias após a confecção da mesma. 1A: Vista lateral da face medial da tibia, com regiões cortical e medular. 1B: Vista frontal da face medial da tibia.

Os membros radiografados juntamente com as escalas de alumínio, foram analisados através do programa computacional *ImageJ*[®] para determinar a DMO. Na análise qualitativa das imagens radiográficas, pode-se sugerir que não houve reação óssea em contato com o biomaterial, como proliferação de periósteo ou osteólise. Também pôde-se inferir que, em todos os animais, houve absorção gradativa do biomaterial implantado.

Porém, em duas amostras ósseas referentes ao mesmo animal (ovelha 6), ou seja, membro com biomaterial e membro controle, observou-se por meio das radiografias, presença de fragmento ósseo na região medular, próximo a região das falhas ósseas. Tais fragmentos dificultaram a delimitação circular da região da falha óssea pelo *software ImageJ*[®] para mensuração da DMO.

A Figura 8 mostra as imagens radiográficas dos membros com biomaterial e membros controle no pós-operatório imediato (D0), 45 dias e 90 dias após a cirurgia. As imagens radiográficas são referentes ao mesmo animal nos diferentes estágios mencionados.

Figura 8 - Imagens radiográficas nos momentos D0, D45 e D90 para realização de densitometria óssea - São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C.L., 2016)

Legenda: Imagens radiográficas em projeção látero-medial dos membros com biomaterial (1a; 1b; 1c) e controle (2a; 2b; 2c) nos momentos D0, D45 e D90 respectivamente.

Observou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas, com exceção dos dados no D15, nos quais os membros tratados com biomaterial tinham valores maiores que os membros controle. Os outros momentos foram iguais estatisticamente, conforme visualizado na Tabela 2.

Tabela 2 - Tabela comparativa da densidade mineral óssea (mm de Alumínio) dentro e entre os grupos - São Paulo - 2016

	Biomaterial					Controle					P*
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	
Pré	8,83	9,00	1,17	7,00	10,00	9,00	9,00	2,10	6,00	12,00	0,832
D0	7,00	7,00	1,41	5,00	9,00	4,67	5,00	1,63	2,00	7,00	0,078
D15	8,17	8,00	1,17	7,00	10,00	4,67	5,00	1,51	2,00	6,00	0,027
D30	6,50	6,00	1,22	5,00	8,00	5,67	5,00	1,51	4,00	8,00	0,276
D45	6,50	6,00	3,08	3,00	11,00	7,33	7,00	4,13	3,00	14,00	0,416
D60	7,17	7,00	3,66	3,00	12,00	6,33	6,50	2,25	4,00	10,00	0,498
D75	7,50	7,00	2,59	5,00	11,00	5,83	5,00	2,40	4,00	10,00	0,139
D90	7,33	6,50	3,08	4,00	12,00	5,50	5,50	2,66	2,00	10,00	0,223
P											
Tempo**	0,184					0,026					

Fonte: (LHAMAS, C. L., 2016).

* Teste de Wilcoxon

** Teste de Friedman

Após esse momento, todos os momentos subsequentes foram iguais estatisticamente. Ao compararmos dentro do membro ao longo dos dias não detectamos diferença no grupo com biomaterial, onde apesar de apresentar uma queda ao longo dos dias, esta não foi estatisticamente significativa. Já no membro controle detectamos diferenças estatisticamente significativas do pré para os tempos D0, D15, D75 e D90. Também diferiram os tempos D0 e D45 e por último os tempos D15 e D45. Essas informações estão demonstradas nos gráficos a seguir (Gráficos 1, 2 e 3).

Gráfico 1 - Gráfico boxplot comparativo ao longo do tempo do membro tratado com biomaterial ao longo dos dias – São Paulo - 2016

Gráfico 2 - Gráfico boxplot comparativo do membro controle ao longo dos dias – São Paulo - 2016

Gráfico 3 - Gráfico de mediana ao longo dos dias, comparando membro tratado com biomaterial e membro controle quanto a DMO – São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C. L., 2016)

Legenda: (*) Mostra tempo diferente estatisticamente.

Os escaneamentos para as microtomografias computadorizadas foram realizados em todas as amostras e as imagens foram reconstruídas através do *software* NRecon[®]. Também foi realizado o escaneamento do biomaterial, o qual foi avaliado quanto ao grau de porosidade pelo *software* CTAn. O biomaterial em 3D pode ser visualizado na Figura 9. Anteriormente ao início do experimento foi escaneado fragmento de tíbia de ovino, íntegro, para visualização da imagem em 3D (Figura 10).

Figura 9 - Visualização através de μ CT em 3D e poros do biomaterial utilizado no experimento
- São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C. L., 2016).

Legenda: Renderização de μ CT 3D de biomaterial a base de quistosana, hidroxiapatita e colágeno utilizado no experimento. 1a: visualização 3D; 1b: Poros em 3D.

O grau de porosidade do biomaterial (BV/TV) foi de 8,51%. O volume total (TV) e o volume de conteúdo mineralizado (BV) foram de $99,75 \text{ mm}^3$ e $8,49 \text{ mm}^3$, respectivamente. Não é possível comparar os valores do biomaterial com as amostras ósseas, pois após 90 dias de implantação destes, eles já foram em grande parte reabsorvidos no processo de cicatrização óssea. Além de haver a presença da falha óssea em todas as amostras aos 90 dias, com ausência de preenchimento ósseo completo.

Figura 10 - Fragmento tibial em 3D, obtido por meio de μ CT - São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C. L., 2016)

Legenda: Fragmento tibial íntegro em 3D em diferentes ângulos, obtido por meio de μ CT.

Os ossos mineralizados neoformados nas tíbias de ovinos foram quantificados por meio da avaliação de imagens geradas por μ CT *ex vivo* e, comparados aos seus respectivos controles.

Nas imagens reconstruídas em 3D dos membros com biomaterial e membros controle foi possível observar o local da falha óssea no D90. Não é possível diferenciar as amostras com biomaterial dos controles através da simples visualização das imagens.

Os resultados de μ CT demonstraram que não houve diferença estatística quanto a volume ósseo entre os membros com biomaterial e os membros controle.

Nas amostras ósseas é possível visualizar, por meio das imagens em 3D, maior quantidade de poros ao redor das áreas com falhas ósseas, tanto nas amostras com biomaterial quanto nos seus respectivos controles. Porém, em todos os animais do experimento, as amostras controles revelaram maior quantidade de poros em relação às amostras com biomaterial (Figura 11).

Figura 11 - Microtomografia das amostras membro controle (A) e membro com biomaterial (B) aos 90 dias - São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C. L., 2016)

Legenda: Renderização de μ CT 3D de amostra controle (A) e com biomaterial (B) por meio de μ CT, em diferentes ângulos. Visualmente, há maior quantidade de poros na amostra controle (5A). Nota-se a presença do canal da falha óssea na amostra controle (seta; 5A).

A visualização do canal da falha óssea observada em um dos cortes na imagem 5A da Figura 11 está evidente na amostra controle. No entanto, nos demais animais, é possível visualizar o canal também nas amostras com biomaterial. É importante ressaltar aqui que os cortes dos fragmentos ósseos, por serem de animais diferentes, não são padronizados, embora o cuidado tivesse sido tomado para que as falhas ósseas fossem exatamente na mesma posição de todos os membros dos animais estudados.

Em algumas amostras foi possível visualizar nitidamente a mudança no tom de cinza na região ao redor da falha óssea, isto é, mudança na atenuação de raios-X. Tal mudança sugere diferença na densidade mineral óssea na região das falhas quando comparado com o osso pré-existente (cinza claro), conforme é visto da Figura 12.

Figura 12 - Visualização em 3D de amostras ósseas controle e com biomaterial, respectivamente – São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C. L., 2016)

Legenda: Renderização de μ CT 3D de amostras ósseas controle (A) e com biomaterial (B). O círculo em vermelho evidencia a alteração nos tons de cinza entre as regiões de osso pré-existente (externo ao círculo) e osso neoformado (interno ao círculo).

A presença de poros ao redor das falhas ósseas pôde ser melhor visualizada através do *software* CTVol, no qual evidenciou, como já descrito, a maior presença de poros nas amostras controles para cinco dos seis animais estudados (Figura 13). Na Figura 14 é possível visualizar, também, os poros em duas amostras com os dois *softwares* utilizados e pôde-se notar maior concentração de poros ao redor da falha óssea da amostra controle.

Figura 13 - Imagens em 3D de amostras controle e com biomaterial evidenciando a presença de poros - São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C. L.; MENDES, R., 2016)

Legenda: Renderização de μ CT 3D de amostras óssea transparentes e com seus poros. Membro controle (1a; 1b). Membro com biomaterial (2a; 2b)

Figura 14 - Porosidade através dos softwares CTVox (acima) e CTVol (abaixo) de amostras controle e com biomaterial referentes ao mesmo animal - São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C. L.; MENDES, R. G., 2016)

Legenda: Renderização de μ CT 3D amostras controle (1A; 2A) e com biomaterial (1B; 2B). Observa-se o grau de porosidade das duas amostras nos diferentes *softwares*: CTVox e CTVol, respectivamente.

De maneira semelhante, também foi possível observar o grau de absorção de raios-X por meio de outro *software*, o DataViewer. A região onde

há menor absorção (cores amarelo e verde) de raios-X sugere osso com maior grau de porosidade, isto é, osso neoformado. Na Figura 15 observa-se a cicatrização de amostra com biomaterial.

Figura 15 - Amostra óssea com biomaterial, visualizada pelo software DataViewer - São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C. L.; MENDES, R. G., 2016)

Legenda: Renderização de CT 3D de amostra óssea com biomaterial no software DataViewer. As regiões em amarelo e verde mostram menor absorção de Raios-X, onde há maior grau de porosidade. A região em azul mostra maior absorção de Raio-X, onde é a região de osso pré-existente.

O volume ósseo foi calculado nas amostras com biomaterial e nos seus respectivos controle do fragmento ósseo com a falha na sua região central (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Volume ósseo em mm³ das amostras com biomaterial e controle. São Paulo – 2016

Fonte: (LHAMAS, C. L.; MENDES, R. G., 2016)

Legenda: Representação gráfica do volume ósseo (mm³) das amostras ósseas com biomaterial e controle obtido através do *software* CTAn (Bruker).

O volume ósseo calculado foi feito nas amostras inteiras, incluindo os seus poros. Esperava-se que todos os ossos tivessem valores de volume ósseo semelhantes entre si, pois são amostras de animais padronizados. Porém, como houve certa variação de peso entre os animais, explica-se esta variação de volume ósseo observada entre as amostras.

Como é possível observar no Gráfico 4, apenas duas amostras apresentaram volume ósseo do membro controle superior ao do membro com biomaterial. As demais, apresentaram volume ósseo do membro controle inferior ao dos membros com biomaterial como era o esperado neste estudo, pois o maior volume ósseo sugere cicatrização óssea mais eficaz.

O Gráfico 5 compara a porcentagem de poros presente nas amostras com biomaterial em relação aos seus controles.

Gráfico 5 - Porcentagem de poros das amostras com biomaterial e controle no D90 - São Paulo - 2016

Fonte: (LHAMAS, C. L.; MENDES, R. G., 2016)

Legenda: Porcentagem de poros (%) obtidas através do software CTAn (Bruker) entre os grupos com biomaterial e controle.

Como é possível visualizar no Gráfico 5, com exceção de um animal, todos os demais apresentaram maior ou igual porcentagem de poros nos membros com biomaterial. No entanto, essas diferenças não são estatisticamente relevantes.

A Tabela 3 mostra os resultados quantitativos das amostras com biomaterial e controles para os dados analisados por meio da μ CT. Conforme observado, dentre todos os dados por μ CT analisados, não houve diferença estatística na comparação do grupo com biomaterial e o grupo controle. No entanto, é possível notar que os valores do grupo com biomaterial são superiores em relação ao grupo controle para todos os parâmetros estudados.

Tabela 3 - Tabela comparativa dos grupos biomaterial e controle nas avaliações por μ CT - São Paulo - 2016

	Biomaterial					Controle					P
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	
Volume Tecidual	648,67	695,00	124,72	411,00	737,00	583,17	545,50	102,75	482,00	762,00	0,249
Volume Ósseo	19,50	19,50	8,60	6,00	33,00	15,83	12,00	12,95	5,00	39,00	0,686
Porcentagem de Volume Ósseo	3,33	3,00	1,51	1,00	5,00	2,67	2,50	1,63	1,00	5,00	0,334
Superfície Tecidual	663,17	645,00	117,59	512,00	845,00	580,33	570,00	50,73	509,00	657,00	0,116
Superfície Óssea	574,00	560,00	268,92	196,00	1027,00	439,67	351,50	339,98	178,00	1061,00	0,463
Superfície de Intersecção	14,33	14,00	8,02	5,00	28,00	6,67	6,50	2,16	4,00	10,00	0,080

Dados comparados pelo teste de Wilcoxon.

Fonte: (LHAMAS, C. L.; MENDES, R. G., 2016).

Legenda: Média, mediana, desvio padrão, valores mínimo e máximos das amostras com biomaterial e controle para as análises por μ CT.

É importante mencionar que, se fosse possível realizar as mesmas análises pela μ CT no período pré-operatório ou dos fragmentos ósseos retirados no momento da cirurgia, poderíamos ter valores de referência para cada amostra antes da confecção das falhas ósseas.

7 DISCUSSÃO

7.1 OVINO COMO MODELO EXPERIMENTAL

A escolha por ovelhas como modelo animal neste estudo teve como objetivo principal a avaliação da interação óssea desses animais com o compósito a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno. A mesma avaliação já havia sido realizada com ratos, para estudo da biocompatibilidade óssea (AMARAL, 2006). Como o metabolismo ósseo da espécie ovina apresenta maiores similaridades com o dos humanos (NUSS et al., 2006) e tem sido crescente o número de estudos com biomateriais nessa espécie, (VETTER et al., 2010), esta foi escolhida para validar o presente estudo.

Assim como observado no estudo de Costa et al. (2015), nos fragmentos ósseos coletados aos 90 dias, não foi possível identificar, macroscopicamente, resquícios do biomaterial implantado. Porém, em alguns animais do presente estudo, ao contrário do observado por estes autores, foi possível identificar o local de implantação do biomaterial no período citado. Tal afirmação sugere que a cicatrização óssea em ovinos se dá por volta de 90 dias, no entanto, por variações individuais, esse período pode ser mais prolongado.

No que se refere ao comportamento e a viabilidade da utilização desta espécie para estudos científicos voltados à ortopedia, diversos pesquisadores têm utilizado a espécie ovina para esse propósito devido ao seu tamanho apropriado, rusticidade, docilidade, facilitando o procedimento cirúrgico, manejo e avaliação pós-operatória (WILLIE et al., 2004; SHELTON et al., 2011). No presente estudo ficou nítida a vantagem da utilização destes pelo seu tamanho e rusticidade, porém um viés observado foi em relação ao comportamento de fuga desses animais, o que dificultou nas avaliações pós-operatórias. Uma alternativa proposta para minimizar tal comportamento é a realização de sedação no momento das avaliações radiográficas pós-operatória, em que é necessário que o animal mantenha-se imóvel e tranquilo no momento da realização do exame.

A escolha pela falha óssea do tamanho de cinco milímetros de diâmetro foi devido ao observado pelo estudo piloto realizado anteriormente à execução do experimento. O animal do estudo piloto recuperou-se bem, sem complicações e sem a necessidade de bandagem, devido à localização proximal da falha. Neste sentido, o presente estudo difere dos trabalhos de Nuss et al. (2006) e Costa et al. (2015), onde falhas ósseas circulares em região de tíbia foram de oito e seis milímetros, respectivamente.

No trabalho realizado por Nuss et al. (2006), as falhas ósseas tiveram diâmetros maiores, pois estas foram realizadas em humero e fêmur, e os animais tinham pesos maiores quando comparados aos dos animais deste estudo. Tais pesos eram entre 53 kg a 80 kg.

Costa et al. (2015) realizaram falhas ósseas tibiais de diâmetro mais semelhantes ao do presente estudo, seis milímetros. As ovelhas possuíam peso médio de 28,5 kg, semelhante ao observado nos animais do presente estudo, porém estes autores realizaram bandagem de Robert-Jones modificada, haja vista que eram três falhas ósseas por membro. No presente experimento optamos por não realizar bandagem nos membros por sua localização proximal, o que dificulta a manutenção da mesma, além do estresse aos animais em permanecerem com bandagens em ambos os membros.

7.2 BIOMATERIAIS COMO SUBSTITUTOS ÓSSEOS

A busca por substitutos ósseos ideais em Medicina Veterinária é crescente e, nos últimos anos, há muitos trabalhos científicos que estudam substitutos ósseos xenogênicos (DE LANGE et al., 2014; COSTA et al., 2015; AL HEZAIMI et al., 2016). Em relação aos biomateriais com base nos três componentes utilizados neste estudo, ainda não há pesquisas que tenham utilizados os três num mesmo compósito, apenas a citação com ratos. Mas é possível encontrar quantidade considerável de estudos com um desses compósitos e, para efeito de comparação, foram pesquisados os que utilizaram um desses elementos em testes na espécie ovina.

Conforme observado por Costa et al. (2015) em estudo com quatro ovelhas no qual se avaliou a interação da HA com o tecido ósseo ovino, observou-se que, aos 90 dias, houve boa osteointegração e boa qualidade de tecido ósseo formado. No mesmo estudo, quando avaliou-se a interação da HA com tricálcio B 60/40 também observou-se tecido ósseo maduro, colônias de osteoblastos, com presença de canais de *Havers* e *Volkman*, além de vasos sanguíneos, essenciais ao processo de cicatrização óssea. Este trabalho avaliou a interação óssea com a HA, dentre outros compostos, por outro meio de diagnóstico, a microscopia e, embora o meio de avaliação seja diferente do realizado neste estudo, observou-se igualmente boa interação óssea entre o compósito utilizado, que possui HA, assim como o observado neste trabalho.

Em estudo realizado por Volkmer et al. (2009), avaliou-se a interação de biomaterial a base de hidroxiapatita, quitosana e amido oxidado em regiões intraóssea femoral e subcutânea de ratos. Eles objetivaram avaliar a reabsorbilidade do biomaterial ao longo do tempo. E concluíram que o mesmo exibiu características de reabsorção atrativas além de grau tolerável de reação celular. De maneira semelhante, foi observado no presente estudo, que utilizou compósito de preenchimento ósseo similar e, apesar da diferença entre espécies, o compósito a base de quitosana, HA e colágeno também apresentou características de reabsorção favoráveis ao longo do tempo, por meio das imagens radiográficas e microtomográficas.

7.3 DENSITOMETRIA ÓSSEA POR RAIOS-X

Embora haja outros métodos para determinação da densidade mineral óssea, como já foi descrito na literatura, tais como a absorciometria por dupla emissão de raios-X (DXA) (KAYMAKCI; WARK, 1994), tomografia computadorizada (MACHADO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2012) e tomografia computadorizada de feixe cônico (DE MELO et al., 2009), a avaliação pelo métodos de raios-X mostrou-se prática e eficaz. E, assim como observado por Grossklauss (2011) é técnica de grande aplicabilidade para a mensuração da DMO por ser de baixo custo, fácil manuseio e não-destrutiva.

Apesar dessas vantagens apresentadas, muitos trabalhos na literatura mensuram DMO por meio de outros exames de auxílio diagnóstico, como os já citados e por meio de μ CT, em projetos de pesquisa experimentais (MILANETTI et al., 2011).

Ao pesquisar na literatura científica, nota-se a escassez de trabalhos com avaliação de densidade mineral óssea em ovinos por meio de Densitometria óssea por Raios-X (JIMENEZ, 2009; ARAÚJO et al., 2011). Então, não há valores de referências para DMO nesta espécie, o que seria valioso para estudos posteriores.

Segundo Bontrager (2003), a radiografia convencional pode mostrar tecidos que tenham uma diferença de pelo menos 10% de densidade, já a TC, similarmente ao que ocorre com a μ CT, pode detectar diferenças de densidade entre tecidos de 1% ou menos. Isto pode explicar a escassez de trabalhos científicos que estudam a DMO por meio de Raios-X.

Em estudo realizado com sete coelhos, fêmeas, da raça *New Zealand* na superfície do osso calvária, foram realizados dois defeitos ósseos de dez milímetros de diâmetro para avaliar a interação óssea com cimento granulado a base de fosfato de cálcio e ácido glicólico. Após a realização da eutanásia desses animais, as amostras foram analisadas por densitometria óssea, por meio de *XR-26 Norland Densitometer*. A DMO foi calculada sendo a razão entre o conteúdo mineral ósseo, expresso em gramas, pela área selecionada (cm^2) e, então o valor de DMO foi expresso em g/cm^2 . Os autores concluíram que os animais tratados com os grânulos de cimento ósseo a base de DCPD/TCP/GA apresentaram maiores valores de DMO (MARINÑO et al., 2006). Assim, pode-se perceber que há diferenças em valores de DMO quanto à unidade de medida utilizada, o que dificulta nas avaliações de resultados e na padronização da densidade mineral óssea para determinada espécie.

7.4 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA 3D

Em estudo realizado por Tatara et al. (2014), a avaliação *in vivo* de ossos de ovinos por μ CT não foi possível devido à limitações ao

escaneamento. Os microtomógrafos *in vivo* possibilitam apenas escaneamentos de amostras pequenas, como ratos ou camundongos.

No entanto, conforme mencionado por Milanetti et al. (2011), o uso da μ CT possibilita visualizações 2D e 3D da região fraturada e do tecido de reparo, a análise morfométrica 3D de diferentes parâmetros desse tecido e a densidade mineral volumétrica do mesmo. Porém, vale ressaltar que esses autores realizaram seus estudos em ratos, o que valida esta técnica como eficaz por não ser destrutiva.

Para o estudo com ovinos, como foi aqui proposto, é necessário buscar alternativas para análise óssea por μ CT de uma maneira que seja minimamente invasiva, como por meio de biópsia óssea, por exemplo.

A realização das avaliações por este método aos 90 dias de pós-operatório foi devido aos trabalhos científicos envolvendo a espécie ovina e a interação com biomateriais realizarem as avaliações, seja por μ CT ou por outros métodos de avaliações, aos 90 dias (CIPITRIA et al., 2013; COSTA et al., 2015).

O presente trabalho havia proposto, inicialmente, a realização da densidade mineral óssea absoluta por meio da μ CT. No entanto, não foi possível devido à dificuldade em obter-se um *phantom* de hidroxiapatita com os mesmos padrões de formato que as amostras ósseas desse estudo. Os *phantoms* geralmente são peças cilíndricas, o que não era compatível com as amostras ósseas em formato de “C” obtidas neste estudo.

A dificuldade na visualização de uma área neoformada de tecido ósseo isolada do osso pré-existente ocorreu devido ao fato de o biomaterial utilizado ter composição semelhante ao do tecido ósseo. Dessa maneira, não foi possível quantificar volume ósseo e porosidade óssea somente do tecido neoformado nas amostras com biomaterial. Nas amostras controles também não foi possível delimitar tal separação, pois a cicatrização óssea ocorreu de forma concêntrica e gradativa. O mesmo foi observado no estudo de Almada (2013), no qual avaliou a eficácia de enxerto ósseo em ratos. Portanto, foi realizada avaliação global de cada fragmento ósseo para cada parâmetro estudado. A quantificação de volume ósseo e porosidade óssea do fragmento ósseo inteiro puderam indicar, indiretamente, o grau de cicatrização das amostras ósseas.

Outros autores já relataram a dificuldade em quantificar neoformação óssea no interior dos biomateriais (NIEMEYER et al., 2010; ROOHANI-ESFAHANI et al., 2012) e, assim, seus trabalhos tiveram maior relevância devido às análises qualitativas. O mesmo ocorreu com o presente trabalho no qual as análises qualitativas são mais fidedignas do que as quantitativas.

No entanto, ao contrário do que ocorreu no presente estudo, observou-se nos estudos de Kühl et al. (2010) e De Lange et al. (2014) que foi possível diferenciar o enxerto do tecido ósseo neoformado. Mas é importante destacar que no estudo de Kühl et al. (2010), o osso trabecular que foi estudado, e outros biomateriais foram utilizados, tais como osso autólogo apenas, osso autólogo associado a fosfato tricálcico β (β -TCP), ou osso autólogo associado a mistura de HA com β -TCP.

No trabalho de De Lange et al. (2014) a distinção entre osso novo neoformado e enxerto ósseo foi realizada usando o valor mais alto do grau de mineralização no osso pré-existente, como um ponto de corte. Esse grau de mineralização foi expresso em miligramas de HA por centímetro cúbico (mgHA/cm^3), que foi citado entre os valores de 550 a $1300 \text{ mgHA}/\text{cm}^3$. O limiar (*threshold*) de $550 \text{ mgHA}/\text{cm}^3$ foi usado para diferenciar entre enxerto ósseo, novo osso formado e osso pré-existente.

Portanto, a dificuldade em separar, por meio das imagens microtomográficas, osso neoformado/osso pré-existente/enxerto ósseo ocorreu, provavelmente, devido ao biomaterial ter sido completamente incorporado ao osso neoformado.

Uma outra hipótese é que, aos 90 dias, o biomaterial ainda esteja presente, no entanto este tem a mesma absorção de raios-X do osso neoformado e, por este motivo, não foi possível realizar tal delimitação. Ademais, em algumas amostras foi possível visualizar regiões no local da falha óssea com absorção de raios-X muito similar ao do osso pré-existente, o que sugere avanço no estágio de cicatrização óssea.

Com base nessas informações, pode-se inferir que são necessários novos estudos com a avaliação do tecido ósseo na espécie ovina, a fim de se padronizar técnicas de escaneamento ósseo para as imagens microtomográficas.

Há muitos trabalhos na literatura na área ortopédica que realizam μ CT e relacionam os resultados com análises histológicas, pois ambas as técnicas são capazes de revelar a reabsorção óssea e quantificar, assim, o reparo ósseo (NIEMEYER et al., 2010; CIPITRIA et al., 2014). Sendo assim, foi observado nos estudos de Marcondes (2014) e Paretsis (2016) que na avaliação da interação do mesmo compósito utilizado neste estudo em ovinos, observou-se que este biomaterial possui perfil osteocondutor, não produz reação de corpo estranho e permitiu neoformação óssea. Com essas informações, pode-se acrescentar que na avaliação radiográfica e microtomográfica, há aumento no grau de porosidade e volume ósseo nas amostras que foram submetidas ao enxerto ósseo, além de haver formação de calo ósseo adequado ao longo do período analisado.

8 CONCLUSÕES

Com o presente estudo, é possível concluir que a manta óssea à base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno no tecido ósseo de ovinos aumenta a densidade mineral óssea em relação aos membros controle.

Os métodos de avaliação utilizados são capazes de avaliar a cicatrização óssea aos 90 dias de pós-operatório nesses animais, embora não tenha sido possível diferenciar osso neoformado de osso pré-existente nas imagens por μ CT.

Este estudo atingiu resultados qualitativos em relação à cicatrização óssea na espécie ovina por meio da avaliação das imagens microtomográficas. Além de resultados quantitativos quanto ao volume ósseo e porosidade óssea.

Novos estudos são necessários para padronizar a técnica de escaneamento por μ CT em tecido ósseo de ovinos.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, A. H. G.; FIGUEIREDO, J. A. P.; ESTRELA, C. Microtomografia computadorizada na avaliação do preparo do canal radicular: Análise crítica. **Robrac**, v. 17, n. 44, p. 159-165, 2008.
- AL HEZAIMI, K.; RAMALINGAM, S.; AL-ASKAR, M.; ArREJAIE, A. S.; NOOH, N.; JAWAD, F.; ALDAHMAH, A.; ATTEYA, M.; WANG, C. Real-time-guided bone regeneration around standardized critical size calvarial defects using bone marrow-derived mesenchymal stem cells and collagen membrane with and without using tricalcium phosphate: an *in vivo* micro-computed tomographic and histologic experimente in rats. **International Journal of Oral Science**, v. 8, p. 7-15, 2016.
- ALMADA, B. V. P. **Comparação entre fontes de células-tronco mesenquimais na indução à regeneração óssea**. 2013. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- AMARAL, M. B. **Citotoxicidade *in vitro* e biocompatibilidade *in vivo* de compósitos a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana**. 2006. 98 p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Instituto de Química de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- AN, Y. H.; DRAUGHN, R. A. **Mechanical testing of bone and the bone-implant interface**. New York- CRC Press. 2000. 648 p.
- ARAÚJO, M. J.; MEDEIROS, A. N.; TEIXEIRA, I. A. M. A.; COSTA, R. G.; BARALDI ARTONI, S. M.; MARQUES, C. A. T.; RESENDE, K. T. Femur biometry, densitometry and chemical composition from Moxoto goats supplemented with concentrate in a semiarid region. **Small Ruminant Research**. v. 97, p. 60-66, 2011.
- AZEVEDO, V. C. C. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- BEDZIN'SKI, R.; KRZAK-ROS', J.; STEFAN'SKA, M.; MARUSZEWSK, K. Investigation of the bone tissue and implant surface interactions. **Strain**, v. 46, p. 518-525, 2010.
- BONTRAGER, K. L. **Tratado de técnica radiológica e base anatômica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 805 p.

BOUXSEIN, M. L.; BOYD, S. K.; CHRISTIANSEN, B. A.; GULDBERG, R. E.; JEPSEN, K. J.; MÜLLER, R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, 2010.

BRUKER MICRO CT. **Analysis of bone by micro-CT**: general information. [S.l.]: Bruker, [200-?]. 41 p.

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

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

CHIM, H.; GOSAIN, A. K. Biomaterials in craniofacial surgery: experimental studies and clinical application. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 20, n. 1, p. 29-33, 2009.

CIPITRIA, A.; REICHERT, J. C.; DEVAKAR, R. E.; SAIFZADEH, S.; BERNER, A.; SCHELL, H.; MEHTA, M.; SCHUETZ, M.A.; DUDA, G.N.; HUTMACHER, D. W. Polycaprolactone scaffold and reduced rhBMP-7 dose for the regeneration of critical-sized defects in sheep tibiae. **Biomaterials**, v. 34, p. 9960-9968, 2013.

COSTA, B. D.; CAMARGO, N. H.; OLESKOVICZ, N.; GAVA, A.; DALLABRIDA, A. L.; REGALIN, D.; LIMA, M. P. A.; MORAES, A. N. Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 177-187, 2015.

COUTINHO, D. F.; PASHKULEVA, I. H.; ALVES, C. M.; MARQUES, A. P.; NEVES, N. M.; REIS, R. L. The effects of chitosan on the in vitro biological performance of chitosan poly (butylenes succinates) blends. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 4, p. 1139-45, 2008.

CRANAGE, R. W. A. Film densitometer method of bone scan quantitation. **Brazilian Journal of Radiology**, v. 57, p. 831-832. 1984.

DALLAN, P. R. M.; MOREIRA, P. L.; PETINARI, L.; MALMONGE, S. M.; BEPPU, M. M.; GENARI, S. C.; MORAES, A. M. Effects of chitosan solution concentration and incorporation of chitin and glycerol on dense chitosan

membrane properties. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Materials**, v. 80B , n. 2 , p. 394-405, 2006.

DE LANGE, G. L.; OVERMAN, J. R.; FARRÉ-GUASCH, E.; KORSTJENS, C. M.; HARTMAN, B.; LANGENBACH, G. E. J.; VAN DUIN, M. A.; KLEIN-NULEND, J. A. Histomorphometric and micro-computed tomography study of bone regeneration in the maxillary sinus comparing biphasic calcium phosphate and deproteinized cancellous bovine bone in a human split-mouth model. **Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 117, n. 1, p. 8-22, 2014.

DE MARVAL, C. A.; ALVES, G. E. S.; CASAS, E. B. Las; COSTA, C. G.; SAFFAR, J. M. E.; LAGO, L. A.; CARVALHO, W. T. V.; LEAL, B. B.; FALEIROS, R. R. Análise biomecânica *ex vivo* de um modelo de haste intramedular de polipropileno para osteossíntese em úmeros de bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 273-278, 2011.

DE MELO, A. C. W. R.; CAMPOS, M. J. S.; VITRAL, R. W. F.; RODRIGUES, A. F. Comparação dos valores de densidade mineral óssea nas imagens de TCFC utilizando os programas I-CATVision e ImplantViewer. **HU Revista Juiz de Fora**, v. 35, n. 3, p. 7-12, 2009.

DI MARTINO, A.; SITTINGER, M.; RISBUD, M. V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, v. 26, p. 5983-5990, 2005.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.

GROSSKLAUSS, D. B. B. S. **Estudo da densitometria óssea de cães SRD com as propriedades físicas e químicas**. 2011. **falta n. total de páginas**. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, 2011.

HUANG, Y.; ONYERI, S.; SIEWE, M.; MOSHFEGHIAN, A.; MADIHALLY, S. V. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 36, p. 7616-7627, 2005.

ITOH, S.; KIKUCHI, M.; KOYAMA, Y.; TAKAKUDA, K.; SHINOMIYA, K.; TANAKA, J. Developments of an artificial vertebral body using a novel biomaterial hydroxyapatite/collagen composite. **Biomaterials**, v. 23, n. 19, p. 3919-3926, 2002.

- JIMENEZ, K. N. **Aspectos morfológicos e biométricos da mão e densitométricos do metacarpo de ovinos da raça Santa Inês**. 2009. 49 p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal. Jaboticabal/SP, 2009.
- JUNG, U. W.; SONG, K. I.; KIM, C. S.; LEE, Y. K.; CHO, K. S.; KIM, C. K.; CHOI, S. H. Effects of chitosan membrane coated with polylactic and polyglycolic acid on bone regeneration in rat calvarial defect. **Biomedical Materials**, v. 2, p. 102-105, 2007.
- KAYMAKCI, B.; WARK, J. D. Precise accurate mineral measurements of excised sheep bones using X-ray densitometry. **Bone and Mineral**, v. 25, p. 231-246, 1994.
- KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.
- KIKUCHI, M. E.; ITOH, S.; ICHINOSE, S.; SHINOMIYA, K.; TANAKA, J. Self-organization mechanism in bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposites synthesized *in vitro* and its biological reaction *in vivo*. **Biomaterials**, v. 22, p. 1905-1911, 2001.
- KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. Introdução. Sistema Esquelético. Estudo dos ossos. In: falta autor do livros. **Anatomia dos animais domésticos**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 4-14.
- KREIPE, R. E. Bones of today, bones of tomorrow. **American Journal of Diseases of Children**, v. 146, n. 1, p. 22-25, 1992.
- KÜHL, S.; GÖTZ, H.; HANSEN, T.; KREISLER, M.; BEHNEKE, A.; HEIL, U.; DUSCHNER, H.; D'HOEDT, B. Three-dimensional analysis of bone formation after maxillary sinus augmentation by means of microcomputed tomography: A pilot study. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 25, n. 5, p. 930-938, 2010.
- LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.
- LIMA, I.; APPOLONI, C.; OLIVEIRA, L.; LOPES, R. T. Caracterização de materiais cerâmicos através da Microtomografia Computadorizada 3D. **Revista Brasileira de Arqueometria, Restauração e Conservação**, v. 1, n. 2, p. 022 – 027. 2007.

LIMA, I.; LOPES, R. T.; OLIVEIRA, L. F.; ALVES, J. M. Análise de estrutura óssea através de microtomografia computadorizada 3D. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 2, n. 1, p. 6-10. 2009.

LOBEL, L.; DUBOIS, M. **Manual de densitometria óptica**: la técnica de la medicino de los materiales fotográficos. 2. ed. Barcelona: Ediciones Omega, 1973. p. 238.

MACHADO, P. R. M.; PUERTAS, E. B.; TAGA, E.; NONOSE, N. Utilização da densitometria óssea como método de avaliação dos resultados da utilização de BMP bovina em artrodese de coluna em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 42-45. 2005.

MCMAHON, R. E.; WANG, L.; SKORACKI, R.; MATHUR, A. B. Development of nanomaterials for bone repair and regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 101b, n. 2, p. 387-397, 2013.

MARCONDES, G. M. **Avaliação da interação biológica entre compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita e tecido ósseo ovino**. 2014. 175 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

MARIÑO, F. T.; TORRES, J.; TRESGUERRES, I.; BLANCO JEREZ, R.; LÓPEZ CABARCOS, E. Vertical bone augmentation with granulated brushite cement set in glycolic acid. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 81, Part. A, p. 93-102, 2006.

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

MILANETTI, M. R.; ALVES, J. M.; SILVA, A. H.; INTROINI, S. O. Avaliação do reparo ósseo por microtomografia por raio-X. **Revista Medicina**, (São Paulo). v. 90, n. 2, p. 89-93. 2011.

NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTAÑO, O.; PLANELL, J. A.; CASTAN, O. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 5, p. 1147-1158, 2008.

NIEMEYER, P.; SZALAY, K.; LUGINBÜHL, R.; SÜDKAMP, N. P.; KASTEN, P. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting

for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 900-908, 2010.

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

OLIVEIRA, D. C.; COSTA, L. A. V. S.; TEIXEIRA, M. W.; CARDOSO, M. J. L.; COSTA, F. S. Densitometria óssea em gatos hígidos por tomografia computadorizada quantitativa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 3, p. 593-598, 2012.

PAOLILLO, A. R. **Avaliação por microtomografia de raio-x do reparo ósseo em osteotomia completa de tíbia de ratos após tratamento com ultrassom de baixa intensidade e laser de baixa potência**. 2013. 130 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos/ SP, 2013.

PARETSIS, N. F. **Avaliação histológica e histomorfométrica da regeneração óssea a partir da utilização de mantas ósseas à base de quitosana, hidroxapatita e colágeno como substituto ósseo em falhas ósseas induzidas em tíbias de ovinos**. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

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

POTES, J. C.; REIS, J. C.; CAPELA E SILVA, F.; RELVAS, C.; CABRITA, A. S.; SIMÕES, J. A. The sheep as an animal model in orthopaedic research. **Experimental Pathology and Health Sciences**, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2008.

REIS-NETO, J. M.; FIORI, A. P.; LOPES, A. P.; MARCHESE, C.; PINTO-COELHO, C. V.; VASCONCELLOS, E. M. G.; DA SILVA, G. F.; SECCHI, R. A microtomografia computadorizada de raios x integrada à petrografia no estudo tridimensional de porosidade em rochas. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 41, n. 3, p. 498-508, 2011.

ROOHANI-ESFAHANI, S. I.; DUNSTAN, C. R.; DAVIES, B.; PEARCE, S.; WILLIAMS, R.; ZREIQAT, H. Repairing a critical-sized bone defect. With highly porous modified and unmodified baghdadite scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 4162-4172, 2012.

- SALES, E. S. **Estudo da qualidade óssea através das técnicas de microtomografia e microfluorescência de raios X**. 2010. 194 f. Tese (Doutorado em Engenharia Nuclear) - Faculdade de Engenharia Nuclear, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- SELIM, M. B. **Avaliação estrutural do osso terceiro metacarpiano equino frente à implantação de biopolímero à base de mamona**. 2013. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- SENEL, S.; MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1467-1480, 2004.
- SHELTON, T. J.; BECK, J. P.; BLOEBAUM, R. D.; BACHUS, K. N. Percutaneous osseointegrated prostheses for amputees: Limb compensation in a 12-month ovine model. **Journal of Biomechanics**, v. 44, n. 15, p. 2601-2606, 2011.
- SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R. M.; MARCANTONIO, R. A. C.; MARCANTONIO-JUNIOR, E. Biomateriais a base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, n. 2, p. 155-161, 2008.
- TATARA, M. R.; SZALBESKA, A.; KRUPSKI, W.; TYMCZYNA, B.; LUSZCZEWSKA-SIERAKOWSKA, I.; BIENIAS, J.; OSTAPIUK, M. Morphometric, densitometric and mechanical properties of mandibular deciduous teeth in 5-month-old Polish Merino sheep. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 45, p. , 2014.
- THEIN-HAN, W. W.; MISRA, R. D. K. Three-dimensional chitosan-nano hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomedical Materials and devices**, v. 61, n. 9, p. 41-44, 2009.
- VAN LIESHOUT, E. M. M.; VAN KRALINGEN, G. H.; EL-MASSOUDI, Y.; WEINANS, H.; PATKA, P. Microstructure and biomechanical characteristics of bone substitutes for trauma and orthopaedic surgery. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 12, n. 34, p. 2-14, 2011.
- VETTER, A.; LIU, Y.; WITT, F.; MANJUBALA, I.; SANDER, O.; EPARI, D. R.; FRATZL, P.; DUDA, G. N.; WEINKAMER, R. The mechanical heterogeneity of the hard callus influences local tissue strains during bone healing: A finite element study based on sheep experiments. **Journal of Biomechanics**, v. 44, p. 517-523, 2011.

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

VIDAL, F. V. **Investigação da microestrutura óssea através de microtomografia 3D**. 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias de Materiais) – Instituto Politécnico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Nova Friburgo, 2011.

VOLKMER, E.; HOFFMAN, B.; KOKOTT, A.; DROSSE, I.; NEUNHOEFFER, A.; HAASTERS, F.; SEITZ, S.; STENGELE, M.; ZIEGLER, G.; MUTSCHLER, W.; SCHIECHER, M. A short-term bioresorbable bone filling material based on hydroxyapatite, chitosan, and oxidized starch tested in a novel orthotopic metaphyseal mouse model. **Advanced Engineering Materials**, v. 11, n. 8, p. 114-121, 2009.

VULCANO, L. C.; SANTOS, F. A. M.; GODOY, C. L. Determinação da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio-ulna em gatos: correlação entre peso, sexo e idade. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 124-128, 2008.

WAN, Y.; YU, A.; WU, H.; WANG, Z.; WEN, D. Porous-conductive chitosan scaffolds for tissue engineering: in vitro and in vivo degradation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, p. 1017-1028, 2005.

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

WILLIE, B. M.; BLOEBAUM, R. D.; BIRELEY, W. R.; BACHUS K. N.; HOFMAN, A. A. Determining relevance of a weight-bearing ovine model for bone ingrowth assessment. **Journal of Biomedical Materials Research, part A**, v. 69, p. 567-576, 2004.

ANEXO A

EXPERIMENTAL

Preparação da Quitosana:

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

Preparação do Colágeno

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

Preparação da Hidroxiapatita (HA)

A síntese da hidroxiapatita foi feita seguindo o método de JARCHO et al [3]. Preparou-se uma solução de Ca(NO₃)₂·4H₂O com pH entre 11,0 e 12,0 ajustado com hidróxido de amônio concentrado (Solução I). Preparou-se a seguir uma solução de (NH₄)₂HPO₄ 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 N₂, 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 várias vezes até que o pH

do sobrenadante se tornasse constante. A suspensão de HA formada foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos a 20°C, filtrada e seca em estufa à 90°C durante um período de 24 horas. Após este período a HA foi triturada e separada em peneira obtendo-se partículas menores que 0,2 mm. O rendimento total do processo foi de 95%.

Preparação das matrizes

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

Figura 1. Fotografia Digital do molde utilizado

Caracterização:

Os materiais foram caracterizados por:

Quitosana: grau de desacetilação por análise condutimétrica, análise termogravimétrica

Colágeno: Calorimetria exploratória diferencial, análise termogravimétrica.

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

Matriz: Microscopia eletrônica de varredura.

RESULTADOS

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

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

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

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

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

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

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

B

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

REFERÊNCIAS

- [1] HORN, M.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G., **Carbohydr. Polym.**, v. 77, p. 239, 2009.
- [2] BATISTA, T.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G. Thermal behavior of in vitro mineralized anionic collagen matrices. **J. Therm Anal. Calorim.**, v.95(3), p. 945-949, 2009.
- [3] JARCHO, M. et al. Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form, **J. Mat. Sci.**, p.2027-2035, 1976.
- [4] TORRES, M. A.; VIEIRA R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente, **Polímeros: ciência e Tecnologia**, v.15, n.4, p.306-312, 2005.
- [5] FLANDIN, F.; BUFREVANT, C.; HERBAGE, D. Differential scanning calorimetry analysis of the age-related changes in the thermal stability of rate skin collagen. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 791, p. 205-211, 1984.
- [6] MARKOVIC, M.; FOWLER, B. O.; TUNG, M. S. J. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. **J. Research of the National Institute of Standards and Technology**, v. 109, p. 553-568, 2004.