OLICIES DA CUNHA

**Interação biológica de membranas poliméricas bioativas em falhas
ósseas induzidas em tíbias de coelhos**

São Paulo

2012

OLÍCIAS DA CUNHA

**Interação biológica de membranas poliméricas bioativas em falhas
ósseas induzidas em tíbias de coelhos**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno

São Paulo

2012

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

8/

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

27/4/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2570
FMVZ

Da Cunha, Olícius

Interação biológica de membranas poliméricas bioativas em falhas
ósseas induzidas em tíbias de coelhos / Olícius da Cunha. -- 2012.
158 f.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno.

1. Bioativo. 2. Consolidação. 3. Copolímeros. 4. Morfometria. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Interação biológica de membranas poliméricas bioativas em tibia de coelhos: Análise morfométrica, histológica e imunoistoquímica", protocolado sob o nº 1763/2009, utilizando 48 (quarenta e oito) coelhos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 24/11/2010.

We certify that the Research "Biological interaction bioactive polymeric membranes in rabbit tibia: Morphometric, histological and immunohistochemistry analyze", protocol number 1763/2009, utilizing 48 (forty-eight) rabbits, under the responsibility Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/24/2010.

São Paulo, 25 de novembro de 2010.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

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

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DA CUNHA, Olicies

Título: Interação biológica de membranas poliméricas bioativas em falhas ósseas induzidas em tíbias de coelhos

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

Data: ____ / ____ / ____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatórias

DEDICATÓRIAS

"Eu espero que eu sempre possua firmeza e virtude suficientes para manter o que eu considero o mais invejável de todos os títulos, o caráter de um homem honesto."

George Washington

"É um amor pobre aquele que se pode medir."

William Shakespeare

Aos meus pais
Miguel e Dirce

Pelo exemplo de caráter,
imenso amor e compreensão.

"O caráter de um homem é formado pelas pessoas que escolheu para conviver."

Sigmund Freud

"Quando fala o amor, a voz de todos os deuses deixa o céu embriagado de harmonia."

William Shakespeare

À
Betina

Pelo amor,
por estar comigo toda esta jornada,
entender minhas ausências
e fazer parte da minha vida.

E aos seus pais
Sérgio e Elizabeth

Por me acolherem
como membro da família.

"Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor."

Johann Goethe

"A força não provém da capacidade física e sim de uma vontade indomável."

Mahatma Gandhi

Ao
Professor Cássio Ricardo Auada Ferrigno

Pelo exemplo de determinação,
por proporcionar a obtenção do meu título,
por permitir minha participação na impressionante
rotina ortopédica da FMVZ-USP e
pela confiança em meu trabalho.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas bençãos diárias e por conceder mais uma realização pessoal e profissional.

Ao meu orientador professor Dr Cássio Ricardo Auada Ferrigno, pela orientação, oportunidades no grupo *Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen* (AO), ensinamentos em ortopedia e por proporcionar a vivência prática diária na rotina clínica ortopédica do Laboratório de Traumatologia e Ortopedia Comparada (LOTCC) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

À professora Dra Luciana Corrêa da Faculdade de Odontologia (FO-USP) pela ajuda incondicional na avaliação histológica e sugestões na elaboração deste documento. Professora, sem sua ajuda eu não teria conseguido. Muito obrigado!

À técnica da empresa Bioactive, Flavia Rosin, pela imensurável ajuda na realização das análises histológicas e pelo incentivo. Flávia, agradeço com toda sinceridade. Sua presença foi imprescindível!

Aos amigos anestesistas Ewaldo, que defendeu sua tese de doutoramento recentemente, e Bruno. Além de participarem do meu experimento, participaram da minha formação na FMVZ-USP. Foram boas horas de conversas na faculdade e no bar do Serginho.

Danielle Tiemi, agradeço toda ajuda na primeira fase do experimento. Seus cuidados com nossos coelhos foram imprescindíveis, além disso, sua ajuda durante as cirurgias, pós operatórios e organização dos dados deram-me tranquilidade, pois sou meio desorganizado. Não menos importante foi o trabalho paralelo que desenvolveu na sua Iniciação Científica, demonstrando precoce aptidão para pesquisa.

Agradeço à amiga Tathiana Olegario pelo auxílio em todas as cirurgias do experimento. Sua organização, a exemplo da Danielle, deu fluência ao estudo.

Ao Dr Walter Israel Rojas Cabrera pela produção e disponibilização dos biomateriais. Devo agradecer imensamente por ter me apresentado à Dra Luciana e à técnica Flavia.

Aos meus amigos do LOTC - FMVZ-USP que me acolheram em 2009 e aos que chegaram depois. Em ordem cronológica de permanência no serviço:

- Marcos, o membro mais experiente do grupo, prudência em todos os casos, boas conversas na copa do Hospital Veterinário (HOVET) da FMVZ-USP ou em mesas de bares. Juntamente com a Kelly, guiaram meus primeiros passos na nova casa.
- Kelly, sinônimo de competência e diversão garantida todos os dias. Suas patacoadas e ensinamentos serão lembrados para sempre.
- Vanessa e nossos atendimentos aos silvestres. Aprendi bastante com você.
- Daniela Izquierdo, competência e pró-atividade são marcas registradas. Uma amiga sensata com quem aprendo constantemente.
- Tatiana Mariani, que muito me corrigiu no início de minhas atividades.
- Tive a oportunidade de acompanhar o ingresso dos pós-graduandos Márcio, gaúcho de Porto Alegre, que desponta como excelente pesquisador e cirurgião; Jaqueline França e mais recentemente Adriana Valente, desempenham papel fundamental no nosso laboratório, com boas experiências clínico-cirúrgicas vêm-se apropriando das técnicas ortopédicas com bastante desenvoltura. O experiente e simpático Denis Prata trouxe alegria e a promessa de manter o profissionalismo no laboratório.
- Alexandre Navarro. Foi incorporado ao grupo recentemente e têm permitido o desenvolvimento de novas linhas de pesquisa. Obrigado por fazer parte da minha formação.
- Quanto ao Renato, que está ultimando os detalhes para juntar-se ao grupo, seja bem-vindo. Constituímos uma boa amizade na época da sua residência e devo-lhe agradecer também a oportunidade de orientá-lo na pós-graduação *lato sensu* da Anclivepa - SP.

Ao professor Dr Angelo Stopiglia pelos ensinamentos, por ceder o centro cirúrgico para as cirurgias do meu experimento e pelas sugestões no exame de qualificação.

À professora Dra Silvia Cortopassi. Sempre com palavras de estímulo e energia positiva que transborda por onde passa.

Aos amigos Giuliano Lesnau e Greyson, egressos da mesma Universidade nos encontramos na USP e estreitamos nossos laços de amizade. Foram muitas conversas, churrascos e conselhos compartilhados. Vou sentir falta disso e de vocês.

Reencontrar em São Paulo minha amiga Thais Costa foi motivo de muita alegria. Tive a oportunidade de conviver dois anos com esta pessoa iluminada e de caráter inquestionável. Seus conselhos na minha vida particular sempre foram levados muito a sério.

A Thais Macedo e Larissa também fazem parte do meu círculo de amizade em São Paulo. Devo agradecimentos por mostrar "táticas de sobrevivência" na cidade grande.

Aos funcionários Lelis, Jesus e Otávio, pela paciência, profissionalismo, ensinamentos e dedicação ao trabalho. Também foram boas horas de conversas neste período.

As doutoras Viviane, Sandra, Andressa, Tatiana, Patrícia, Patrícia Flor e Geni. Companheiras de trabalhos que muito me ensinaram nestes três anos.

Aos meus pais pelo exemplo de vida, amor, apoio e por minha formação pessoal.

À minha noiva Betina pelo amor e por me trazer luz e paz em momentos difíceis.

Aos meus irmãos Gonçalo, Wanda e Marilço com suas respectivas famílias. Sei que posso contar com vocês para qualquer coisa que preciso.

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

À Universidade Federal do Paraná - Campus Palotina, representada pelos meus iguais, pelo afastamento concedido e por entender que a qualificação do profissional agrega valores à instituição.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Estudo concedida durante o doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo "Auxílio Pesquisa" para execução do projeto.

Ao Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP) pelo apoio financeiro inicial para compra de materiais de consumo.

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

Finalmente não poderia deixar de agradecer meus pacientes experimentais. Foram 54 coelhos submetidos ao estudo. Espero que os frutos deste trabalho auxilie no tratamento de milhões de pacientes humanos e animais em uma compensação concreta.

Epígrafe

"Toda arte é imitação da natureza."

Lucius Annaeus Seneca

"Prefiro os que me criticam, porque me corrigem,
aos que me adulam, porque me corrompem."

Santo Agostinho

RESUMO

DA CUNHA, O. **Interação biológica de membranas poliméricas bioativas em falhas ósseas induzidas em tíbias de coelhos.** [Biological interaction of polymeric bioactive membranes in rabbit tibial defects]. 2012. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O reparo de falhas ósseas tem sido motivo de preocupação e estudos em ortopedia. O enxerto esponjoso autógeno é consagrado e definido como padrão ouro, porém, o leito doador é limitado e a colheita pode causar grande morbidade. Tem sido proposto, ao longo dos anos, o uso de materiais naturais, sintéticos e fatores de crescimento com resultados promissores. O desenvolvimento de membranas e matrizes tridimensionais, baseado em biomateriais reabsorvíveis e biocompatíveis, tem demandado estudos voltados à síntese e avaliação. O objetivo do estudo foi avaliar o processo de reparação óssea por meio do uso de três polímeros bioativos em falhas ósseas em tíbias de coelhos. Foram estudados 48 coelhos machos, adultos jovens, distribuídos em quatro tempos experimentais (três, sete, 14 e 30 dias). Cada tíbia constituiu uma unidade experimental, de modo que foram confeccionados dois defeitos ósseos monocorticais em região proximal medial de cada tíbia. Cada tempo experimental contemplou quatro grupos: controle - sem adição de biomaterial; M1 - orifícios protegidos com Poli L Lactide co Policaprolactone / Poli Glicol Etilênico; M2 - Poli L Lactide co Policaprolactone / Poli Glicol Etilênico / β Fosfato Tricálcico e M3 - Poli L Lactide co Policaprolactone / Poli Glicol Etilênico / nano Hidroxiapatita. Ao final de cada período os indivíduos foram submetidos à eutanásia e obtidos cortes histológicos das tíbias, corados com técnica de HE, TRAP e Masson. Foram feitas análises histomorfológicas descritivas e histomorfométricas, com mensuração do tecido ósseo neoformado, porcentagem da área de trabéculas ósseas, número de osteoclastos e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos. Os dados foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os resultados mostraram absorção incompleta da membrana e ausência de toxicidade. Para os períodos de 14 e 30 dias, o grupo controle exibiu matriz óssea no interior do defeito e nos grupos M1, M2 e M3, o calo ósseo formou-se no interior e em grande quantidade na superfície do defeito e no periósteo. Aos

30 dias, o grupo controle exibiu calo ósseo com maturação mais avançada que nos grupos com membranas. Aos 14 e 30 dias, a área de calo ósseo do grupo controle foi significativamente menor em relação aos grupos com membranas ($p=0,001$ e $p=0,003$ respectivamente). As lâminas dos grupos com membranas exibiram sinais de remodelação ativa tanto aos 14 como aos 30 dias, denotando o potencial osteoindutor e osteocondutor destes biomateriais. Aos 14 dias a neoformação óssea no grupo M3 (com nano-HA) foi superior ao M2 (com β -TCP), o que pode indicar que o potencial osteoindutor e osteocondutor do material M3 foi superior ao M2 nesta fase da reparação. Os resultados permitiram concluir que apesar dos biomateriais testados no experimento estimularem a neoformação óssea, a remodelação foi mais tardia.

Palavras-chave: Bioativo. Consolidação. Copolímeros. Morfometria.

ABSTRACT

DA CUNHA, O. **Biological interaction of polymeric bioactive membranes in rabbit tibial defects.** [Interação biológica de membranas poliméricas bioativas em falhas ósseas induzidas em tíbias de coelhos]. 2012. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Bone gap repairs are a major concern in orthopedics. Autologous cancellous bone graft is considered the golden standard technique, but donation site is limited and it's grafting is related to greater morbidity. The use of natural and synthetic materials, as well as growth factors, has been proposed with promising outcomes. The development of membranes and tridimensional matrixes based in reabsorbable and biocompatible materials require more studies targeting their synthesis and evaluation. The aim of the present study was to evaluate the bone repair process using three osteoinductive polymers in circular bone gaps in rabbit's tibias. Forty eight young adult male rabbits were divided into four experimental moments (three, seven, fourteen and thirty days). Each tibia was considered one experimental unit, in which two monocortical bone defects were made in the proximal medial region of the bone. Each experimental time was used in the following four groups: control - without biomaterial; M1 - defects protected with Poli L Lactide co Policaprolactone / Poly Ethylene Glycol; M2 - Poli L Lactide co Policaprolactone / Poly Ethylene Glycol / β Tricalcium Phosphate and M3 - Poli L Lactide co Policaprolactone / Poly Ethylene Glycol / Hydroxyapatite. At the end of each period the animals were euthanized and histological sections were stained with HE, TRAP and Masson techniques. Histomorphologic and histomorphometric analysis were made and consisted in the measuring of new bone tissue formation, percentage of trabecular area, number of osteoclast and percentage of trabeculae with osteoclasts. Data were analyzed with Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test. Results showed an incomplete absorption and no toxicity of membranes. At 14 and 30 days, control group showed bone callus in the defect, and groups M1, M2 and M3 showed bone callus in the defect and around the surface of the defect. At 30 days, the control group showed bone callus in a more mature phase in comparison to the groups with membranes. At 14 and 30 days, the bone callus area in the control group ($p=0.001$) was significantly smaller than the

membrane groups ($p=0.003$). The groups with membranes exhibited signs of active remodeling at 14 and 30 days, demonstrating that the biomaterials have greater osteoinduction and osteoconduction potential. At 14 days, we found more bone formation in group M3 (nano-HA) relative to group M2 (β -TCP), which may indicate that the osteoinductive / osteoconductive potentials of M3 in this bone repair phase was superior in relation to M2. The biomaterials tested in the study stimulate bone formation, but caused delayed in bone remodeling.

Key words: Bioactive. Bone healing. Copolymers. Morphometry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação esquemática da formação e função dos osteoclastos. O M-CSF induz a formação de pré-osteoclastos a partir das CFU-M. O RANKL liga-se ao receptor RANK na membrana dos precursores dos osteoclastos. A OPG bloqueia a interação do RANK com RANKL, constituindo antagonista da diferenciação dos osteoclastos - São Paulo - 2012.....	44
Figura 2 -	Procedimento anestésico. A - Manutenção anestésica com isoflurano por sonda orotraqueal e aferição de pressão arterial pelo método invasivo na artéria auricular. B - Monitor multiparamétrico que inclui oximetria, ECG, capnografia e análise de gases - São Paulo - 2010.....	69
Figura 3 -	Material utilizado para perfuração óssea. A - Motor, micromotor, contra ângulo e broca com <i>KIT</i> de irrigação. B - Detalhe da perfuração óssea com irrigação contínua - São Paulo - 2010.....	70
Figura 4 -	Cirurgia de implantação das membranas poliméricas bioativas em defeitos provocados em tibia de coelho. A - Incisão do periósteo. B - Elevação de retalho de periósteo com elevador tipo Molt. C - Observe orifícios de 2,8 mm de diâmetro com espaçamento de 1cm entre eles. D - Detalhe da membrana durante o posicionamento sobre os defeitos. E - Membranas sobre os orifícios. F - Sutura do periósteo sobre os orifícios - São Paulo - 2010.....	71
Figura 5 -	Exame radiográfico da tibia no pós-operatório imediato. A - Incidência craniocaudal com localização dos orifícios na cortical "trans". B - Incidência mediolateral - São Paulo - 2010.....	72
Figura 6 -	Corte do espécime no sentido "longo eixo" do osso. Observe os dois espectrais com dois defeitos cada e membranas recobrimdo os orifícios. Abaixo de cada peça, observe a identificação em etiqueta que será usada até o final do processamento - São Paulo - 2011.....	75
Figura 7 -	Representação esquemática do espécime em corte longitudinal do osso com observação de dois defeitos com espaçamento de 1 cm entre eles. Observe os campos escolhidos para morfometria através da mensuração das áreas em mm ² de osso neoformado. 1 - Campo correspondente à região do defeito ósseo. 2 - Região imediatamente abaixo do defeito. 3 - Região acima do defeito. 4 e 5 - Regiões laterais ao defeito - São Paulo - 2011.....	79

Figura 8 -	Representação da tabela usada para obtenção da média da área em mm ² do calo ósseo (CO) de cada espécime. 1A, 2A e 3A referem-se a cortes do espectral "14C16A" e 1B, 2B e 3B referem-se a cortes do espectral "14C16B" - São Paulo - 2011.....	79
Figura 9 -	Equipamento usado para análise morfométrica. Microscópio de luz convencional acoplado em câmera tipo CCD e <i>software</i> de morfometria digital ImageLab2000® - São Paulo - 2011.....	80
Figura 10 -	Interface do programa ImageLab2000®. A - Calo ósseo exibido em tela. B - Área de calo ósseo delimitado em azul - São Paulo - 2011..	80
Figura 11 -	Localização dos campos, em lâmina de tecido ósseo corada em HE, aumento de 40X, para contagem de osteoclastos e porcentagem de área de trabéculas ósseas - São Paulo - 2011.....	81
Figura 12 -	Representação da tabela usada para obtenção das médias da porcentagem de área de trabéculas ósseas (M - Trabec), número de osteoclastos (M - Clastos) e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos [(C/T)*100] - São Paulo - 2011.....	82
Figura 13 -	Interface do programa ImageLab2000® com visualização do calo. O sistema de subtração RGB foi usado para quantificar a porcentagem de área de trabéculas ósseas - São Paulo - 2011.....	82
Figura 14 -	Lâminas de tecido ósseo, em aumento de 40X, dos espécimes dos grupos com tempo experimental de três dias em coloração HE. Observe defeito ósseo com coágulo interposto (setas). Nas lâminas dos espécimes com polímeros é possível observar espaço entre o defeito e o periósteo (círculos) - São Paulo - 2011..	87
Figura 15 -	Lâmina de tecido ósseo, em aumento de 100X, de um espécime do grupo com polímero e nano-HA com tempo experimental de sete dias em coloração Masson. Observe presença de condrócitos (seta) entre matriz óssea (círculo) - São Paulo - 2011.....	88
Figura 16 -	Lâminas de tecido ósseo, em aumento de 40X, dos espécimes dos grupos com tempo experimental de sete dias em coloração HE. Observe defeito ósseo com matriz óssea interposta (setas). Nas lâminas dos espécimes com membranas é possível observar espaço entre o defeito e o periósteo (círculos) - São Paulo - 2011..	89
Figura 17 -	Lâmina de tecido ósseo, em aumento de 400X, de um espécime do grupo controle com tempo experimental de 14 dias em coloração TRAP. Observe osteoclastos (setas) - São Paulo - 2011..	90

Figura 18 -	Lâminas de tecido ósseo, em aumento de 40X, do espécimes dos grupos com tempo experimental de 14 dias em coloração HE. Observe defeito com matriz óssea interposta (setas). Nas lâminas dos espécimes com membranas é possível observar espaço entre o defeito e o perióstio (círculos) - São Paulo - 2011.....	91
Figura 19 -	Lâminas de tecido ósseo, em aumento de 40X, dos espécimes dos grupos com tempo experimental de 30 dias em coloração HE. No grupo controle é possível observar calo ósseo maduro (seta branca). No grupo polímero com nano-HA verifica-se calo ósseo exuberante composto por tecido ósseo com espaços medulares de tamanho maior que o grupo controle porém menor que os grupos com os outros polímeros (setas escuras). Nas lâminas dos espécimes com membranas é possível observar espaço entre o defeito e o perióstio (círculos) - São Paulo - 2011.....	92
Figura 20 -	Lâminas de tecido ósseo do período experimental de 14 dias em aumento de 40X. Observe calo no interior do defeito (setas brancas), sobre a membrana (seta vermelha), perióstio (círculos brancos) e membrana (círculo vermelho) em coloração de Masson - São Paulo - 2011.....	93
Quadro 1 -	Distribuição e estratificação da amostra por tempo experimental e por tratamento analisado M1 - (PLLA-co-PCL/PEG); M2 - (PLLA-co-PCL/PEG/ β -TCP); M3 - (PLLA-co-PCL/PEG/nano-HA) - São Paulo - 2010.....	67
Quadro 2 -	Ficha para análise macroscópica dos espécimes. MB - membrana; MO - medula óssea - São Paulo - 2011.....	77
Gráfico 1 -	Representação da área de calo ósseo formada nos períodos experimentais de 14 e 30 dias, contendo média e desvio padrão - São Paulo - 2012.....	97
Gráfico 2 -	Representação da porcentagem de área de trabéculas ósseas para cada tratamento nos períodos experimentais de sete, 14 e 30 dias com média e desvio padrão - São Paulo - 2012.....	99
Gráfico 3 -	Número de osteoclastos para cada tratamento nos períodos experimentais de sete, 14 e 30 dias com média e desvio padrão - São Paulo - 2012.....	100
Gráfico 4 -	Porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos para cada tratamento nos períodos experimentais de sete, 14 e 30 dias com média e desvio padrão - São Paulo - 2012.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise estatística das médias da área do calo (CO) ósseo em mm^2 dos espécimes de cada tratamento nos tempos experimentais de 14 e 30 dias - São Paulo - 2011.....	96
Tabela 2 -	Valores de "p" obtidos pelo teste de Mann-Whitney dos parâmetros porcentagem de área de trabéculas ósseas (T), osteoclastos (C) e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos $(C/T)*100$, para os tempos experimentais de sete, 14 e 30 dias - São Paulo - 2012.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -TCP	β Fosfato Tricálcico
BMP	Proteína Óssea Morfogenética
BMU	Unidade Multicelular Básica
BPs	Bifosfonatos
CFU-M	Unidade Formadora de Colônia de Macrófago
CO	Calo ósseo
C	Osteoclastos
C/T	Porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo
FO-USP	Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo
HA	Hidroxiapatita = $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
HOVET	Hospital Veterinário
HE	Hematoxilina Eosina
I	Indivíduo
IGF	Fator de Crescimento <i>Insulin-like</i>
IL	Interleucina
LCCT	Laboratório de Cirurgia Cárdio-Torácica
LOTC	Laboratório de Traumatologia e Ortopedia Comparada
MC	Matriz cartilaginosa
M-CSF	Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos
MMPs	Metaloproteinases de matriz
M1	Membrana 1
M2	Membrana 2
M3	Membrana 3
NF- κ B	Fator Nuclear κ B

OPG	Osteoprotegerina
PCL	Policaprolactone
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PEG	Poli Glicol Etilênico
PG	Prostaglandina
PIGF	Fator de Crescimento Placentário
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLLA	Poli L Lactide
PLLA-co-PCL	O Poli L Lactide copolimerizado com Policaprolactone
PTH	Paratormônio
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear <i>Kappa</i>
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear <i>Kappa</i>
ROG	Regeneração Óssea Guiada
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
TGF	Fator de Crescimento Transformador
T	Porcentagem de área de trabéculas ósseas
TRAP	Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TTA	Avanço da Tuberosidade Tibial
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A -	Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm ² dos espécimes do grupo controle no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011.....	130
Apêndice B -	Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm ² dos espécimes do grupo M1 no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011.....	132
Apêndice C -	Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm ² dos espécimes do grupo M2 no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011.....	134
Apêndice D -	Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm ² dos espécimes do grupo M3 no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011.....	136
Apêndice E -	Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm ² dos espécimes do grupo controle no tempo experimental de 30 dias - São Paulo - 2011.....	138
Apêndice F -	Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm ² dos espécimes do grupo M1 no tempo experimental de 30 dias - São Paulo - 2011.....	140
Apêndice G -	Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm ² dos espécimes do grupo M2 no tempo experimental de 30 dias - São Paulo - 2011.....	142
Apêndice H -	Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm ² dos espécimes do grupo M3 no tempo experimental de 30 dias - São Paulo - 2011.....	144
Apêndice I -	Análise estatística das médias da área do calo ósseo (CO) em mm ² dos espécimes de cada tratamento no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011.....	146
Apêndice J -	Análise estatística das médias da área do calo ósseo (CO) em mm ² dos espécimes de cada tratamento no tempo experimental de 30 dias - São Paulo - 2011.....	147
Apêndice L -	Quantificação morfométrica da área de matriz cartilaginosa (MC) em mm ² dos espécimes do grupo controle no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011.....	148

Apêndice M -	Quantificação morfométrica da área de matriz cartilaginosa (MC) em mm ² dos espécimes do grupo M1 no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011.....	149
Apêndice N -	Quantificação morfométrica da área de matriz cartilaginosa (MC) em mm ² dos espécimes do grupo M2 no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011.....	151
Apêndice O -	Quantificação morfométrica da área de matriz cartilaginosa (MC) em mm ² dos espécimes do grupo M3 no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011.....	153
Apêndice P -	Análise estatística das médias da área de matriz cartilaginosa (MC) em mm ² dos espécimes de cada tratamento do tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011.....	155
Apêndice Q -	Média e desvio padrão (DP) do número de osteoclastos (C), porcentagem de área de trabéculas ósseas (T) e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos (C/T) nos espécimes do tempo experimental sete dias. Observe indivíduos (I) dos grupos: Controle, M1, M2 e M3 com respectiva análise estatística - São Paulo - 2011.....	156
Apêndice R -	Média e desvio padrão (DP) do número de osteoclastos (C), porcentagem de área de trabéculas ósseas (T) e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos (C/T) nos espécimes do tempo experimental 14 dias. Observe indivíduos (I) dos grupos: Controle, M1, M2 e M3 com respectiva análise estatística - São Paulo - 2011.....	157
Apêndice S -	Média e desvio padrão (DP) do número de osteoclastos (C), porcentagem de área de trabéculas ósseas (T) e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos (C/T) nos espécimes do tempo experimental 30 dias. Observe indivíduos (I) dos grupos: Controle, M1, M2 e M3 com respectiva análise estatística - São Paulo - 2011.....	158

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
2 REVISÃO DE LITERATURA	35
2.1 Reparo ósseo.....	35
2.1.1 Aspectos gerais da reparação óssea	37
2.1.2 Fase inflamatória.....	38
2.1.3 Formação do tecido de granulação	39
2.1.4 Formação do calo	39
2.1.5. Remodelação óssea	42
2.2 Biomateriais	46
2.2.1 Composição química	46
2.2.2 Comportamento biológico.....	49
2.2.3 Considerações gerais sobre biomateriais	50
2.3 Aplicações clínicas e experimentais	53
3 OBJETIVOS	60
4 HIPÓTESES	62
5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	64
6 MATERIAL E MÉTODO	66
6.1 Indivíduos.....	66
6.2 Grupos experimentais	66
6.3 Cirurgia de implantação das membranas	67
6.3.1 Procedimento pré-cirúrgico e anestésico	68
6.3.2 Procedimento cirúrgico	69
6.3.3 Procedimento pós-operatório	72
6.4 Colheita e acondicionamento das amostras	73
6.5 Fase laboratorial.....	74
6.5.1 Preparo das lâminas	74
6.5.2 Avaliação macroscópica	76
6.5.3 Avaliação microscópica	77
6.5.4 Morfometria	78
6.6 Testes estatísticos	83

7 RESULTADOS	85
7.1 Descrição macroscópica	85
7.2 Descrição microscópica e análise semiquantitativa	86
7.2.1 Descrição microscópica	86
7.2.2 Análise semiquantitativa microscópica	93
7.3 Morfometria	95
7.3.1 Quantificação do calo ósseo	96
7.3.2 Contagem de osteoclastos e porcentagem de área de trabéculas ósseas	98
8 DISCUSSÃO	103
8.1 Da metodologia	103
8.2 Dos resultados	107
8.2.1 Descrição macroscópica	107
8.2.2 Descrição microscópica	107
8.2.3 Morfometria	112
8.3 Considerações finais	116
9 CONCLUSÕES	118
REFERÊNCIAS	120
APÊNDICES	130

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O elevado número de acidentes, a longevidade e melhor qualidade de vida das pessoas e dos animais de companhia exigem e estimulam o desenvolvimento de substitutos viáveis para a recuperação e manutenção dos tecidos e órgãos. Na área de ortopedia, inúmeras situações podem resultar em falhas ósseas e, na Medicina Veterinária, frequentemente o ortopedista é desafiado a preencher defeitos ósseos de grandes proporções. O reparo retardado ou ausência de reparo destas lesões interferem e comprometem a função do aparelho locomotor por limitação mecânica e/ou dor (RAGETLY; GRIFFON, 2011).

As principais situações que resultam em defeitos ósseos críticos são os traumas (fraturas) causados por acidentes automobilísticos e processos osteolíticos em resposta ao aparecimento de neoplasias, infecções e atrito gerado por implantes metálicos soltos utilizados para estabilização de fraturas. É frequente também a ocorrência de falhas causadas por técnicas cirúrgicas como as osteotomias corretivas para desvios angulares em ossos longos, alongamentos ósseos para corrigir defeitos congênitos ou adquiridos e avanço da tuberosidade tibial (TTA) para tratamento de ruptura de ligamento cruzado cranial.

O tecido ósseo possui excelente habilidade de reparo com a mesma alta organização estrutural original, porém, a capacidade é limitada pelo tamanho e complexidade da falha. Sabe-se também que doenças endócrinas, metabólicas, degenerativas, neoplásicas, infecciosas, auto-imune, entre outras, podem dificultar ou impedir o reparo. O enxerto ósseo esponjoso autólogo é considerado "padrão ouro" para o preenchimento de falhas ou estímulo em áreas "inativas" como não uniões; contudo, o leito doador é limitado e a colheita causa grande morbidade incluindo dor e fraturas.

Dessa forma, para o reparo de grandes defeitos ósseos, têm sido propostos tratamentos baseados em diferentes princípios de biologia óssea, dentre eles, a osteoindução e osteocondução. A osteoindução é a propriedade de uma substância induzir células indiferenciadas a diferenciarem-se em células osteoprogenitoras e estas em osteoblastos, com subsequente formação de novo tecido ósseo. A osteocondução é a propriedade de um material preencher e servir como arcabouço para a proliferação e migração de células osteoprogenitoras e a sua posterior

diferenciação terminal em osteoblastos (FARDIN et al., 2010; RAGETLY; GRIFFON, 2011).

O desenvolvimento e aplicação de biomateriais osteoindutores / osteocondutores são práticas já utilizadas e que apresentam futuro promissor. Desta forma, a engenharia tecidual constitui-se em uma ciência voltada para o desenvolvimento de métodos biotecnológicos utilizados na manipulação do crescimento celular. Apesar de serem empregados desde a antiguidade, só após a Segunda Guerra Mundial, com o conhecimento da ciência dos materiais e melhor entendimento do metabolismo ósseo, é que houve grande avanço no desenvolvimento de biomateriais.

Nos últimos anos, a ciência tem demonstrado grande esforço na produção de novas tecnologias na produção de biomateriais. A sua inerente multidisciplinaridade demanda a integração de áreas como: biologia, medicina, veterinária, odontologia, engenharia, química, materiais e física. Nesse contexto, a interação entre essas áreas facilita o aprimoramento e o desenvolvimento de matrizes tridimensionais, assim como rotas de síntese, processamento em formas variadas, qualidade clínica e resposta do tecido hospedeiro (DENG et al., 2005). Os polímeros são suportes (*scaffolds*) para semeadura e crescimento das células, usados amplamente na produção de biomateriais (OLIVEIRA et al., 2010).

Os polímeros bioativos são compostos químicos que exercem potente atividade biológica e o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento com os mesmos faz-se necessário, uma vez que resulta em melhora na qualidade de vida das pessoas e animais, representada por aumento na expectativa de vida, na saúde em geral e no bem-estar. Alguns estudos demonstraram bioatividade dos polímeros isolados ou copolimerizados e / ou mediante a inclusão de aditivos como as biocerâmicas β -TCP e nano-HA. Esta bioatividade traduz-se por capacidade de sinalização celular, osteoindução e osteocondução (BIOMATERIAIS, [200-?]; HENCH; WILSON, 1993; WOLKMER, 2006; NANDI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

A Regeneração Tecidual Guiada (RTG) e a Regeneração Óssea Guiada (ROG) estão entre as técnicas mais empregadas na tentativa de regeneração de tecidos. Diversos estudos demonstraram excelentes resultados na regeneração óssea associada ao uso de matrizes ou membranas obtidas mediante uso de polímeros e

cerâmicas (BECKER; BECKER, 1990; SERVICE, 2000; CASTNER; RATNER, 2002; KRUYT et al., 2006).

Após a caracterização e o desenvolvimento de um biomaterial osteoindutor / osteocondutor, os primeiros testes são realizados *in vitro*. Os testes *in vivo* são feitos na sequência e o coelho, como modelo experimental, apresenta as vantagens técnicas de fácil manejo e maior porte em relação aos ratos, camundongos e cobaias, o que permite a execução de falhas maiores. Após testes *in vitro* e *in vivo* que constatem vantagens clínicas e ausência de toxicidade ou potencial mutagênico, o biomaterial é liberado para uso clínico, onde os resultados frequentemente continuam sendo avaliados para sustentar seu uso nas diversas situações onde a estimulação do reparo é desejada.

O tema motivou a avaliação *in vivo* de três membranas poliméricas bioativas, aplicadas em defeitos produzidos em tíbias de coelhos, quanto à interação tecidual e capacidade osteoindutora / osteocondutora, para que os dados obtidos possam subsidiar novas pesquisas e uso clínico em situações que exijam aceleração do reparo ósseo.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

O escopo da revisão abrange descrição com base em literatura atualizada sobre reparo ósseo, biomateriais e estudos clínicos / experimentais. Desta forma, o assunto será abordado em tópicos.

2.1 Reparo ósseo

O osso é um tecido de natureza mesenquimal, onde a matriz extracelular é mineralizada conferindo-lhe rigidez com certo grau de elasticidade. Além da função de suporte, o osso é a maior reserva primária de cálcio do organismo. O tecido apresenta grande capacidade de remodelação, renovando-se constantemente para atender as necessidades mecânicas e metabólicas do organismo (NAKAHAMA, 2010; ROSENBERG, 2010).

A matriz óssea é constituída de uma parte orgânica e outra inorgânica. A orgânica é formada principalmente de colágeno tipo I (95%). Os 5% restantes incluem proteoglicanas e proteínas não colágenas. Cristais de hidroxiapatita, sais de cálcio e fosfato constituem a parte inorgânica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Existem três tipos de células especializadas no osso, com atividades diferentes: *osteoblastos*, *osteócitos* e *osteoclastos* (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ROSENBERG, 2010).

Os **osteoblastos** são células cuboides organizadas sobre a camada não mineralizada de matriz (osteoide), que recobre a superfície óssea mineralizada. Estas células são responsáveis pela osteogênese, ou seja, pela síntese, secreção, maturação e mineralização da matriz orgânica. Além de sintetizar e excretar colágeno tipo I, também produz as outras proteínas não colágenas encontradas na matriz, como: sialoproteína óssea, osteopontina, osteonectina, osteocalcina, proteína óssea morfogenética (BMP), proteoglicanas e outras (MARKS; ODGREN, 2002). Estas células possuem receptores para hormônios sistêmicos (paratormônio, estrógenos, glicocorticoides, insulina, hormônios tireoidianos), vitamina D3 e fatores locais prostanoídes como prostaglandina E e F2 α (PGE, PGF2 α), citocinas como

fator de crescimento transformador (TGF- β), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento *insulin-like* 1 (IGF-1) fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), BMPs e interleucinas (IL). Alguns fatores são de regulação como IL-6, PGE, IGF-1, TGF- β e outros são secretados pelo próprio osteoblasto (RAISZ; RODAN, 1998). Os osteoblastos se diferenciam a partir de células mesenquimais indiferenciadas, as quais podem também dar origem a fibroblastos, condroblastos, mioblastos e adipócitos. Pesquisas sugerem que o gene CBFA1 é extremamente importante para a diferenciação do osteoblasto e que as BMPs podem induzir a expressão deste gene *in vitro* (DUCY; SCHINKE; KARSENTY, 2000; ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008).

Os **osteócitos** são osteoblastos incorporados à matriz óssea mineralizada, durante a osteogênese. Apresentam longas projeções citoplasmáticas que delimitam canalículos intercomunicantes constituindo uma rede de comunicação entre as células e a superfície óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ROSENBERG, 2010). Os **osteoclastos** são células grandes, multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleares. Possuem capacidade de fagocitose de matriz óssea, e assim, é a principal célula responsável pela remodelação óssea. A sobrevivência desta célula é de aproximadamente três a quatro semanas sendo que, provavelmente, morre por apoptose (HUGHES et al., 1995). As células ósseas osteócitos, osteoblastos e osteoclastos, principalmente o binômio osteoblasto-osteoclasto, atuam juntas para controlar a formação e reabsorção óssea, criando uma unidade funcional conhecida como "unidade multicelular básica" (BMU), do inglês *Basic Multicellular Unit* (ROSENBERG, 2010). A interação da atividade destas duas células é a responsável pela remodelação óssea, ou seja, a reabsorção e a neoformação óssea contínua que ocorre em todos os ossos. Desta forma, os osteoblastos produzem fatores que vão influenciar a diferenciação e função dos osteoclastos, alguns destes são depositados e armazenados na matriz e outros secretados localmente em resposta a hormônios ou fatores locais (MARTIN; GOOI; SIMS, 2009; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

2.1.1 Aspectos gerais da reparação óssea

O reparo ósseo acontece de forma semelhante aos eventos que ocorrem no reparo de tecidos não ósseos (ROSENBERG, 2010). O processo envolve uma complexa interação de células, fatores de crescimento e matriz extracelular. A reparação é convencionalmente dividida em quatro etapas, caracterizadas por um conjunto específico de eventos celulares e moleculares (PAPE et al., 2010). As etapas são definidas como: inflamação, formação de tecido de granulação, formação do calo e remodelação (ROZEN et al., 2007). Na prática, não há delimitação clara dos acontecimentos, e muitas vezes há significativa sobreposição entre as diferentes fases do reparo. Os eventos celulares contam com células inflamatórias, células vasculares, progenitores osteocondrais e os osteoclastos. Em termos moleculares, a reparação é conduzida por três principais classes de fatores: citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, fatores pró-osteogênicos e fatores angiogênicos (SCHINDELER et al., 2008; PAPE et al., 2010).

Sobre as fases do reparo, há situações onde a deposição de matriz mineral pode ocorrer sem a deposição de matriz cartilaginosa intermediária. Quando não existe contato direto dos fragmentos ósseos, ocorre deposição de colágeno e a matriz mineral é precedida pela formação de matriz cartilaginosa (ossificação endocondral). Em situações onde o contato ósseo e a estabilidade dos fragmentos é rígida e estável, a formação do tecido ósseo ocorre por deposição direta da matriz óssea, sem formação de tecido cartilaginoso intermediário, processo conhecido como ossificação intramembranosa (SHAPIRO, 2008; PAPE et al., 2010).

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

2.1.2 Fase inflamatória

A fratura causa interrupção vascular e distorção da arquitetura medular. O extravasamento de sangue no local da fratura é contido pelos tecidos circunvizinhos e forma-se o hematoma. Fatores de degranulação plaquetárias, macrófagos, granulócitos e monócitos infiltrados no hematoma e entre os fragmentos fraturados, combatem agentes infecciosos e secretam citocinas e fatores de crescimento que avançam a coagulação para um trombo fibrinoso (PAPE et al., 2010). Com a evolução, capilares sanguíneos invadem o coágulo e são reorganizados em tecido de granulação. Macrófagos, células gigantes e outras células fagocíticas removem células degeneradas e outros debris (SCHINDELER et al., 2008; ROSENBERG 2010).

O período inflamatório ocorre nos primeiros três dias após a fratura. A rede vascular e a permeabilidade aumentada favorece a difusão de proteínas plasmáticas e fibrina na fratura (ROZEN et al., 2007; PAPE et al., 2010). A resposta celular é coordenada por uma vasta gama de citocinas e fatores de crescimento incluindo TGF- β , PDGF, FGF-2, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), IL 1 e IL 6, proteína óssea morfogenética (BMP) e fator de necrose tumoral (TNF). Estes fatores facilitam o recrutamento de células inflamatórias adicionais em *feedback* positivo e a migração e invasão de células-tronco mesenquimais multipotentes, além de induzir angiogênese (PAPE et al., 2010). Sabe-se ainda que o FGF-2 e fator de crescimento placentário (PIGF), um homólogo do VEGF, induzem a proliferação das células mesenquimais multipotentes após o recrutamento. As células-tronco originárias do periósteo, da medula óssea, circulação e dos tecidos moles circundantes atuam como contribuintes no processo de formação e reparação ósseas (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008).

2.1.3 Formação do tecido de granulação

Esta fase tem duração média de quatro dias (aproximadamente do 3º e 6º dias), mediada principalmente por TGF- β 1 que é liberado a partir da degranulação de plaquetas e macrófagos. O TGF- β 1 exerce quimiotaxia para macrófagos, estimula a mitose das células tronco mesenquimais, osteoblastos e condroblastos (ROZEN et al., 2007). Também tem a função de regular a produção dos componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, fibronectina, proteoglicanos e inibir enzimas proteolíticas que poderiam destruir o tecido recém-formado (ROZEN et al., 2007; HENRIKSEN et al., 2009).

2.1.4 Formação do calo

Os calos ósseos, cartilaginoso e mineralizado, formam-se em média entre o 4º e 14º dias e a quantidade de cada um depende da estabilidade no foco de fratura (ROZEN et al., 2007). Clinicamente, a maioria dos casos de estabilização de fraturas exhibe algum nível de instabilidade mecânica entre os fragmentos fraturados; assim, o reparo passa por um processo de ossificação endocondral, onde o calo ósseo é precedido por um modelo cartilaginoso (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008).

Formação do calo fibrocartilaginoso

Esta fase é mediada principalmente por células como condrócitos e fibroblastos, que formam um calo semi-rígido capaz de proporcionar suporte mecânico para a fratura e que servirá de suporte para o calo ósseo mineralizado que formará mais tardiamente. O calo cartilaginoso é essencialmente avascular, embora sua substituição por osso envolva invasão capilar (SCHINDELER et al., 2008).

O tecido começa a se desenvolver principalmente sob o perióstio que é a principal fonte de células osteoprogenitoras. Os fibroblastos, ricos em células osteoprogenitoras, preenchem o foco de fratura. O processo avança com

proliferação e diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos acompanhada da síntese da matriz extracelular e proteínas ósseas até a mineralização da matriz. Parte dos osteoblastos sofrem apoptose e o restante transforma-se em osteócitos presos na matriz mineralizada. O TGF- β 1 está envolvido em toda a fase do processo osteogênico e seus níveis teciduais são diretamente proporcionais à formação óssea (ROZEN et al., 2007).

Os condrócitos, derivados de progenitores mesenquimais, proliferam e sintetizam matriz cartilaginosa até que todo tecido de granulação seja substituído por cartilagem. Nas fases finais da formação do calo cartilaginoso, os condrócitos sofrem hipertrofia e mineralização antes que ocorra apoptose (SCHINDELER et al., 2008; RAGGATT, 2010).

A proliferação e diferenciação dos fibroblastos e condrócitos são estimulados e coordenados por fatores de crescimento incluindo TGF- β 2 e β 3, FGF-1 e IGF. Além disso, as BMP-2, -4, -5 e -6 ajudam na promoção da proliferação celular e condrogênese. Em resposta a estes fatores, condrócitos são capazes de gerar proteínas da matriz extracelular, particularmente colágeno tipo II ou colágeno tipo X para hipertrofia de condrócitos (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008; RAGGATT, 2010).

A invasão do calo cartilaginoso por células endoteliais vasculares, angiogênese e crescimento capilar é estimulada por fatores pró-angiogênicos incluindo o VEGF, BMPs, FGF-1 e TGF- β 2. O VEGF é expresso por células osteogênicas e dependente do CBFA1/RUNX2. Além disso, angiopoietina I e II regulam a morfogênese vascular (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008). A vascularização inadequada está associada a déficits de consolidação (ROZEN et al., 2007).

O calo cartilaginoso passa por remodelamento entre os estágios dois e três do modelo de reparação em quatro estágios. Este processo envolve a remoção gradual da fibrocartilagem e, tradicionalmente, acredita-se que esta função cabe ao osteoclasto. Contudo, evidências recentes sugerem que esta célula pode não estar envolvida na remodelação do calo fibrocartilaginoso; assim, é mais provável que o mecanismo envolva processos catabólicos não específicos com contribuição de vários tipos celulares (SCHINDELER et al., 2008).

Um grupo de proteases conhecidas como metaloproteinases de matriz (MMPs) tem sido implicado como uma classe fundamental de collagenases e gelatinases

responsáveis pela degradação da matriz extracelular. A secreção de MMPs tem sido demonstrada em pré-osteoblastos, osteoblastos maduros, condrócitos hipertróficos, células vasculares e perivasculares. A formação de novos vasos, estimulada por MMPs, pode permitir a invasão de células adicionais a partir da circulação para contribuir para remodelação da fibrocartilagem (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008; PAPE et al., 2010).

Formação do calo ósseo mineralizado

O processo representa o período de osteogênese mais ativo e é caracterizado por níveis elevados de atividade dos osteoblastos e formação de matriz óssea mineralizada. O calo cartilaginoso é gradualmente removido, concomitante com a revascularização. O osso novo é conhecido como o calo rígido e é tipicamente irregular e sub-remodelado (SCHINDELER et al., 2008; ROSENBERG, 2010). O calo duro pode se formar em ausência de um modelo de cartilagem em um processo conhecido como ossificação intramembranosa. O evento ocorre em condições de rígida estabilidade mecânica com diferenciação direta dos osteoprogenitores em osteoblastos (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008) ou durante o desenvolvimento embrionário pela diferenciação direta de células mesenquimais em osteoblastos. Como exemplos deste tipo de ossificação tem-se alguns ossos do crânio, alguns ossos faciais e parte da clavícula e mandíbula (MARKS; ODGREN, 2002; ROSENBERG, 2010). No entanto, na maioria das fraturas, algum nível de ossificação endocondral é esperada (SCHINDELER et al., 2008).

A matriz óssea inicial contém uma combinação de proteináceo e matriz extracelular mineralizada sintetizada por osteoblastos maduros que diferenciam-se na presença de fatores osteogênicos. Os membros da família BMP são mediadores críticos deste processo e suficientes para estimulação da formação óssea (SCHINDELER et al., 2008).

A fonte de osteoprogenitores responsável pela consolidação da fratura, permanece ambígua. O perióstio é uma fonte rica de células tronco capaz de produzir osso e, em situações onde o perióstio é removido ou danificado, a consolidação óssea muitas vezes é lenta. A medula óssea também contém células-tronco mesenquimais, capazes de contribuir para formação óssea durante a reparação (RUMI et al., 2005; SCHINDELER et al., 2008). No entanto, pode ocorrer reparo na ausência de

periósteo e/ou medula óssea. Isso é possível porque as células osteoprogenitoras possuem outras fontes como circulação e tecidos circunvizinhos (RUMI et al., 2005; ROZEN et al., 2007).

A vascularização é crítica para formação da matriz óssea mineralizada, pois a tensão adequada de oxigênio no local da fratura é necessária para diferenciação de osteoblastos (FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006; ROZEN et al., 2007). A estimulação da formação de vasos com fatores angiogênicos pode aumentar a formação óssea e a consolidação de fraturas em modelos experimentais (PENG et al., 2005). No entanto, estudos recentes demonstraram que pode ocorrer retardo na reparação mesmo com vascularização adequada, indicando que o fornecimento de sangue por si só não é o único determinante do processo de consolidação (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008).

2.1.5. Remodelação óssea

O estágio final do reparo da fratura compreende a remodelação óssea. Inicialmente este processo envolve a conversão de calo ósseo irregular em tecido ósseo lamelar, que é essencial para recuperar a integridade mecânica do osso (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008). A remodelação inicia-se por volta do 14º dia e pode prolongar-se por meses (ROZEN et al., 2007).

A principal célula envolvida na reabsorção de osso mineralizado é o osteoclasto, que quando ativo é polarizado, com parte da membrana envolvida na reabsorção fortemente aderida à superfície óssea. Esta área aderida é rica em filamentos de actina e não foi definido ainda se sua função é isolar o ambiente da reabsorção do espaço extracelular ou se atua como estrutura de reconhecimento, onde integrinas transmitem sinais para a degradação óssea (TEITELBAUM, 2000). Com o início da reabsorção, aparece uma depressão na superfície óssea junto à borda em escova, que é conhecida como lacuna de *Howship* (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ROSENBERG, 2010).

O ambiente ácido desmineraliza a matriz, enquanto as proteinases degradam os componentes orgânicos, tais como colágeno. Os produtos de degradação são

removidos e os osteoclastos podem sofrer apoptose ou retornar a forma não reabsortiva (NAKAHAMA; 2010; ROSENBERG, 2010).

Na remodelação, além do paratormônio (PTH), vitamina D3 e esteroides sexuais, participam do processo citocinas geradas localmente, que influenciam na função das células ósseas através de comunicações complexas e muitas vezes auto reguladas (HOFBAUER; SCHOPPET, 2004; MARTIN; GOOI; SIMS, 2009).

A biologia da reabsorção óssea envolve três moléculas-chave principais: Receptor Ativador do Fator Nuclear *Kappa* (RANK), Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear *Kappa* (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG). O processo também é dependente do M-CSF, das células osteoblásticas e dos precursores de osteoclastos (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; HENRIKSEN et al., 2009; MARTIN; GOOI; SIMS, 2009; ROSENBERG, 2010).

O RANK é um receptor expresso por pré-osteoclastos e osteoclastos (receptores de superfície). O RANKL é uma proteína produzida por osteoblastos e células estromais da medula, importante na osteoclastogênese, pois liga-se ao RANK na superfície dos pré-osteoclastos e osteoclastos, induzindo a diferenciação das células progenitoras ósseas, bem como estimula a função dos osteoclastos maduros (MARTIN; GOOI; SIMS, 2009). Ao ser estimulado pelo RANKL, a sinalização de RANK ativa o fator transcricional para o Fator Nuclear κB (NF- κB), que é essencial para formação e sobrevivência dos osteoclastos (MARKS; ODGREN, 2002; ROSENBERG, 2010).

A OPG é um receptor regulador da sinalização de RANKL e antagonista da diferenciação dos osteoclastos. A molécula atua através da ligação com o RANKL, bloqueando o acoplamento com seu receptor RANK (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; HENRIKSEN et al., 2009; MARTIN; GOOI; SIMS, 2009; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010; ROSENBERG, 2010). A OPG é produzida por osteoblastos em resposta a agentes anabólicos como estrógenos e TGF- β (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003).

O M-CSF também é essencial para osteoclastogênese. Os progenitores dos osteoclasto, ou seja, as unidades formadoras de colônias de macrófagos (CFU-M) expostos aos fatores de diferenciação M-CSF, fornecidos principalmente por osteoblastos, induzem a formação de pré-osteoclastos (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; HOFBAUER; SCHOPPET, 2004; NAKAHAMA, 2010; ROSENBERG, 2010).

Além destes fatores osteoclásticos especializados existe uma grande gama de fatores de crescimento, citocinas e hormônios presentes no sítio da fratura que participam da osteoclastogênese. Estes incluem as interleucinas, $\text{TNF-}\alpha$, BMPs, $\text{TGF-}\beta$ (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008; MARTIN; GOOI; SIMS, 2009) assim como vitamina D3, paratormônio (PTH), calcitonina, PDGF, estrógenos, corticosteroides, prostaglandinas, entre outros (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003). Segundo Martin, Gooi e Sims (2009), no processo de remodelamento, os fatores citados anteriormente atuam primeiro nos receptores dos osteoblastos, assim, os osteoclastos serão ativados para remodelação óssea. Boyle, Simonet e Lacey (2003) citam que a vitamina D3, PTH, PGE_2 , IL 1, IL 6, TNF e corticosteroides possuem atividade pró-reabsortiva, enquanto o estrógeno, calcitonina, BMP, $\text{TGF-}\beta$ e PDGF são considerados anti-reabsortivos. Hofbauer e Schoppet (2004) mencionam que o RANKL e IL-1 aumentam o tempo de sobrevivência dos osteoclastos maduros. A figura 1 ilustra de forma esquemática simplificada os mecanismos que regulam a formação e função dos osteoclastos.

Figura 1 - Representação esquemática da formação e função dos osteoclastos. O M-CSF induz a formação de pré-osteoclastos a partir das CFU-M. O RANKL liga-se ao receptor RANK na membrana dos precursores dos osteoclastos. A OPG bloqueia a interação do RANK com RANKL, constituindo antagonista da diferenciação dos osteoclastos - São Paulo - 2012

Fonte: Hofbauer e Schoppet (2004) adaptado por Da Cunha (2012)

O início da reabsorção é dependente da diferenciação dos osteoclastos. A indução da apoptose dos osteócitos, seja por microlesões de osso ou por outras alterações, sinalizam para as células de superfície aumentando produção de RANKL pelos osteoblastos culminando com a geração de osteoclastos. Assim, espera-se alta concentração de osteoclastos em áreas de remodelação. Sabe-se também que, intervenções que aumentam a reabsorção óssea são geralmente acompanhadas de formação óssea aumentada (KOBAYASHI; UDAGAWA; TAKAHASHI, 2009; HENRIKSEN, 2009).

Ao contrário do que ocorre na remodelação do calo cartilaginoso, a remodelação do calo ósseo é totalmente dependente dos osteoclastos. Inibidores de osteoclastos, a exemplo dos bisfosfonatos (BPs), mostram inibição da remodelação. Embora BPs possam atrasar a remodelação do calo, esse atraso não conduz necessariamente a resultados negativos funcionais (SCHINDELER et al., 2008). O calo ósseo remodelado pode ter propriedade mecânica superior por unidade de área de osso em comparação com um calo ósseo não completamente remodelado, mas um calo maior pode fornecer mecânica similar (DENISSEN; DE GROOT, 1979; PAUL et al., 1992; SCHINDELER et al., 2008).

Em estudo experimental para avaliar a ação dos BFs no processo de reparo em fraturas de fêmures em ratos, além de análises histológicas e radiográficas, os autores observaram em testes mecânicos que calo ósseo desorganizado e mais volumoso foi superior ao calo remodelado em ensaios de flexão de três pontos (LI et al., 1999).

Embora o remodelamento seja impulsionado principalmente pelos osteoclastos, é essencial que a atividade anabólica paralela seja mantida pelos osteoblastos. Além dos processos anabólico/catabólico, a remodelação é modulada por forças mecânicas. Esse princípio da ortopedia é regido pelas leis de Wolff, que postula que ossos saudáveis adaptam-se a cargas a que são submetidos, ocorrendo maior deposição mineral em regiões onde o osso é mais exigido em termos mecânicos. Assim, sabe-se que em situações onde ocorre desuso do membro fraturado, o processo de consolidação se processa de forma mais lenta (SCHINDELER et al., 2008).

2.2 Biomateriais

Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais para Aplicações Clínicas realizada em 1982, os biomateriais são definidos como toda substância (com exceção de drogas ou fármacos) ou combinação de substâncias, de origens naturais ou sintéticas, que, durante um período de tempo indeterminado, são empregados como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais. Assim, é um material não-tóxico usado como aparelho médico caracterizado por interagir com sistemas biológicos (WILLIAMS, 1987). De forma geral, os biomateriais podem ser classificados em função da composição química ou de acordo com o comportamento biológico.

2.2.1 Composição química

De acordo com a composição química, podem ser classificados em metálicos, cerâmicos, poliméricos, compósitos e naturais.

Metais e ligas metálicas

Metais como titânio, nióbio, tântalo, alumínio e vanádio são os mais conhecidos. São usadas misturas de metais para produção de ligas metálicas como o aço (BIOMATERIAIS, [200-?]; WOLKMER, 2006; OLIVEIRA et al., 2010). Dentre os biomateriais metálicos, os aços inoxidáveis, principalmente os austeníticos do tipo 316 L, ligas Co-Cr-Mo, Co-Ni-Cr-Mo, titânio puro e Ti-6Al-4V, são os mais usados (PEREIRA; BUONO, ZAVAGLIA, 2006)

Cerâmicos

As cerâmicas constituem uma extensa classe de materiais, incluindo vidros e vitrocerâmicas. São compostos inorgânicos, não-metálicos, duros, frágeis, com altas

temperaturas de fusão, baixa condutividade elétrica e térmica e boa estabilidade química. São amplamente utilizadas como lentes para óculos, fibras óticas para endoscopia, vidros porosos carreadores de anticorpos e enzimas, e, mais recentemente, como material de implante e regeneração (PEREIRA; VASCONCELOS; ZAVAGLIA, 2006). São suscetíveis à falha mecânica quando expostas às tensões de tração ou flexão. Os mais conhecidos são: alumina, óxido de zircônia, fosfato de cálcio, biovidros ou vidros bioativos. Cerâmicas de fosfato de cálcio podem ser usadas para produção de osso artificial (BIOMATERIAIS, [200-?]; WOLKMER, 2006; OLIVEIRA et al., 2010). As que apresentam maior utilização na área médica são fosfato tricálcico e hidroxiapatita, por apresentarem excelente biocompatibilidade (PEREIRA; VASCONCELOS; ZAVAGLIA, 2006; NANDI et al., 2010). A hidroxiapatita é osteocondutora e também atua como uma matriz passiva para o crescimento ósseo, na qual células osteoprogenitoras se fixam. Apesar das controvérsias a respeito da capacidade osteoindutora, estudos indicam grande eficácia de utilização das biocerâmicas no tratamento de inúmeros defeitos ósseos, mesmo se conhecendo apenas parte dos mecanismos pelos quais elas atuam (BIOMATERIAIS, [200-?]; SANG-HOON, 2004; DECLERCQ et al., 2005; OLIVEIRA, 2010; ROCHA, 2010; RAGETLY; GRIFFON, 2011).

Polímeros

Os materiais poliméricos são macromoléculas formadas pela união de unidades fundamentais, os "meros", que repetidamente darão origem a longas cadeias. Apresentam baixa densidade, pequena resistência à temperatura e baixas condutividades elétrica e térmica. Os polímeros sintéticos começaram a ser usados como biomateriais a partir de 1940-1942, em suturas a base de poliamidas sintética. A seguir, foram descritas as primeiras aplicações de polimetacrilato de metila, politereftalato de etileno e policloreto de vinila. Em 1950, polímeros como polietileno, poliuretano e politetraflúor etileno começaram a ser utilizados (ORÉFICE, 2006). Atualmente, dentre os mais empregados citam-se silicone, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polidioxanona, polietileno, polipropileno, metilmetacrilato, poliuretanos (OHARA et al., 1995) e seus copolímeros (ROETHER et al., 2002). Os polímeros podem ser processados por diferentes formas de elaboração em fibras, materiais de sutura, hastes, parafusos, placas e grampos (OHARA et al., 1995). Quanto à

estrutura das cadeias formadas, os polímeros podem ser classificados em cadeias lineares, polímeros com ramificações, com ligações cruzadas e copolímeros. Os copolímeros são constituídos de diferentes unidades de repetição, com objetivo de alterar propriedades como temperaturas de transições, comportamento químico, solubilidade, entre outros (ORÉFICE, 2006). O PLLA-co-PCL (O Poli L Lactide co Policaprolactone) é um polímero biodegradável. A biodegradação é um processo natural pelo qual produtos químicos orgânicos são convertidos em compostos mais simples e redistribuídos através de ciclos elementares, tais como o do carbono, do nitrogênio e do enxofre (MEI, 2006).

Compósitos

São sólidos que possuem dois ou mais componentes separados por uma interface que diferem em estrutura, composição e propriedades. Como exemplo podem ser citados os implantes dentais de titânio com revestimento de hidroxiapatita (BIOMATERIAIS, [200-?]; WOLKMER, 2006; OLIVEIRA et al., 2010).

Naturais

Os enxertos de origem natural podem ser classificados como enxerto autógeno, alógeno e xenógeno.

Autógeno - refere-se a tecidos transplantados de um local para o outro no mesmo indivíduo. Esse tipo de enxerto evita rejeição e infecção cruzada.

Alógeno - refere-se à transferência de tecidos retirados de um indivíduo e transplantado em outro da mesma espécie (banco de ossos ou membranas biológicas como pericárdio).

Xenógeno - o tecido tem origem em outro indivíduo de espécie diferente do receptor. Cita-se, como exemplo, osso e pericárdio bovino para uso em cães (BIOMATERIAIS, [200-?], WOLKMER, 2006; OLIVEIRA et al., 2010).

2.2.2 Comportamento biológico

Os biomateriais utilizados clinicamente induzem diferentes respostas teciduais e, levando-se em consideração a resposta biológica causada pelo biomaterial na interface implante/tecido do hospedeiro, pode-se classificá-lo em bioinertes, biotolerados, bioativos e reabsorvíveis (BIOMATERIAIS, [200-?]; OLIVEIRA et al., 2010).

Bioinertes

Não provocam reação de corpo estranho no organismo, estão em contato direto com o tecido receptor e praticamente não liberam componentes. Como exemplos pode-se citar o titânio, zircônia e alumina (HENCH; WILSON, 1993; CASTNER; RATNER, 2002).

Biotolerados

Moderadamente aceitos pelo tecido receptor e são geralmente envolvidos por tecido fibroso. São exemplos de materiais biotolerados o aço inoxidável, ligas Cr-Co e polimetilmetacrilato (OLIVEIRA, 2010).

Bioativos

São os materiais que favorecem a ligação química entre o material implantado e o tecido ósseo (osteointegração), sem a presença de invólucros fibrosos. Em função da similaridade química entre tais materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução por meio de recobrimento por células ósseas. Quando o material bioativo é implantado no corpo, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorrem na interface implante/tecido. Essas reações eventualmente resultam em uma ligação interfacial de natureza química e não física (HENCH; WILSON, 1993). Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, hidroxiapatita e os compostos

de fosfato de cálcio (BIOMATERIAIS, [200-?]; WOLKMER, 2006; NANDI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

Reabsorvíveis

Implantes reabsorvíveis são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo após certo período de contato com o tecido. Esses materiais são muito importantes em aplicações clínicas em razão de serem desnecessárias novas intervenções cirúrgicas para a retirada do material implantado. São exemplos desses materiais os fosfatos tricálcicos (HENCH; WILSON, 1993; BARBANTI; ZAVAGLIA, 2005).

2.2.3 Considerações gerais sobre biomateriais

As características desejáveis das membranas envolvem a biocompatibilidade, bioatividade, previsibilidade e facilidade de aplicação clínica (CALLAN, 1993; SZABO et al., 2005). Um material pode ser definido como bioativo quando é projetado para induzir ou condicionar a atividade biológica, seja por sinalização celular, osteoindução ou osteocondução (OLIVEIRA, 2010; ROCHA, 2010).

Os biomateriais, de acordo com sua interação com o tecido ósseo, podem promover osteogênese, osteoindução e osteocondução (FDA, 2005; GOMES et al., 2007). Os **osteogênicos** estimulam a formação de osso diretamente dos osteoblastos (ZELLIN; LINDE, 1997; FARDIN et al., 2010; RAGETLY; GRIFFON, 2011).

Os **osteoindutores** promovem resposta intracelular e extracelular na interface osso implante. Por meio deste processo, uma superfície bioativa é colonizada por células mesenquimais indiferenciadas e induzida à diferenciação em osteoblastos ou condroblastos. De uma forma mais conservadora, define-se osteoindução como a propriedade que alguns materiais possuem de induzir a formação de tecido ósseo quando são implantados em tecidos não ósseos. Este fenômeno consiste na conversão fenotípica de células dos tecidos moles em precursores do tecido ósseo, por meio de estimulação apropriada. Tem sido referida na literatura, a possibilidade da hidroxiapatita, quando associada a células osteoblásticas, apresentar esta

propriedade (OLIVEIRA, 2010; ROCHA, 2010; RAGETLY; GRIFFON, 2011). A BMP possui propriedades osteoindutivas (ZELLIN; LINDE 1997). Ferrigno, Della Nina e Fantoni (2007) usaram BMP em fraturas distais de rádio-ulna em cães e ao compararem com pacientes que não receberam BMP, observaram redução no tempo de consolidação.

Os materiais **osteocondutores**, geralmente inorgânicos como os biovidros, hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcico (TCP), facilitam o crescimento de novo tecido ósseo, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras (CALLAN, 1993; SZABO et al., 2005; FARDIN et al., 2010; RAGETLY; GRIFFON, 2011). Quase todos os materiais bioativos, habitualmente utilizados, podem ser classificados como sendo materiais osteocondutores, embora existam referências recentes que apontam para a capacidade osteoindutora de alguns deles (OLIVEIRA, 2010; ROCHA, 2010; RAGETLY; GRIFFON, 2011).

As combinações de biomateriais existentes nas membranas de compósito conferem biocompatibilidade, reabsorção, resistência mecânica, hidrofiliabilidade e osteocondução. Estas características permitem o mimetismo físico-químico e biológico do biomaterial. Alia-se a estas particularidades, a possibilidade de programar o tempo de absorção de acordo com desejado (HAO et al., 2003).

As unidades constituintes do copolímero vêm sendo aplicadas há mais de três décadas, confirmando suas propriedades atóxicas e não-mutagênicas (FDA, 2005; SZABO et al., 2005).

O Poli L Lactide copolimerizado com Policaprolactone (PLLA-co-PCL) associado ao Poli Glicol Etilênico (PEG) proporciona alta hidrofiliabilidade, comportamento mucoadesivo e favorece a coagulação sanguínea. O PEG é aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso médico, odontológico e farmacêutico (BAUER; TORNKVIST; NILSSON, 1986; ZHONGKUI et al., 2005; RORIZ et al., 2006).

Cristalograficamente, a HA é mais similar ao osso natural do que o β -TCP, porém, a razão de reabsorção da HA é extremamente baixa comparada com ao β -TCP. A velocidade de dissolução do β -TCP é de três a 12 vezes mais rápida do que da HA. Um implante ósseo constituído de HA permanecerá mesmo depois de três a quatro anos de implantação. O β -TCP, por outro lado, sendo reabsorvível, desaparecerá parcialmente, em períodos de seis a 15 semanas, dependendo da estequiometria,

tamanho de partícula e porosidade (BAUER; TORNKVIST; NILSSON, 1986; FDA, 2005; RORIZ et al., 2006; NANDI et al., 2010).

Apesar da excelente biocompatibilidade, a baixa resistência mecânica da cerâmica hidroxiapatita normal geralmente restringe o seu uso (NANDI et al., 2010). Os avanços recentes em nanociência e nanotecnologia reacenderam a investigação de HA em nanoescala. Tem sido sugerido que a nano-HA pode ser superior a HA nos quesitos mecânicos, biocompatibilidade e capacidade de integração óssea (ZHOU; LEE, 2011).

Os fenômenos interfaciais (osso/implante) relatados nesses materiais envolvem a presença de íons cálcio e fósforo na interface e representam um processo dinâmico, incluindo processos físico-químicos, interações cristal/proteína, colonização de células e tecidos, remodelamento ósseo, e finalmente, contribuição para a resistência da interface (WARRER et al., 1992; EL-WARRAK et al., 2004; JUNG et al., 2005; ZHANG et al., 2005).

A reação previsível e positiva do ambiente biológico em relação às cerâmicas de fosfatos de cálcio, β -TCP, HA ou combinações, tem sido foco de observação constante em vários estudos *in vitro* e *in vivo*. No entanto, limitações estão sempre relacionadas ao comportamento mecânico. Uma alternativa para tornar estes materiais ainda mais atrativos para uso clínico, é a incorporação de outra fase com melhores propriedades mecânicas, dando origem a material compósito de comportamento distinto (CORDEN et al., 2000; DENG; HAO; WANG, 2001; HAO et al., 2003; DEBUSSCHER et al., 2009).

A utilização de blendas poliméricas a base de PLLA, PCL e PEG têm demonstrado bom desempenho na obtenção de membranas para regeneração óssea guiada, podendo sugerir sinergismo adequado entre os dois materiais (polímero-cerâmico), se destacando inclusive na melhora significativa das propriedades mecânicas. As características elásticas e flexíveis da blanda polimérica associadas à dureza intrínseca da cerâmica resultam em comportamento mecânico diferenciado. As membranas compósitas (PLLA-co-PCL/PEG/Cerâmica) deverão associar as propriedades do PLLA (biocompatibilidade, reabsorção e resistência mecânica), do PEG (hidrofilicidade) e da cerâmica (osteocondução). A combinação existente nessas membranas propicia afinidade ao fluido biológico e propriedades bioativas (HASSNA; RAMAY; ZHANG, 2004; ROSANNA; VITTORIO; SANTI, 2004; SANG-HOON, 2004; DECLERCQ et al., 2005).

2.3 Aplicações clínicas e experimentais

Além das propriedades físico-químicas intrínsecas do material, o sucesso de um implante é geralmente, dependente dos fenômenos que ocorrem na zona da interface formada entre o tecido ósseo e o material implantado (EL-WARRAK et al., 2004; MENEZES; FREITAS; GONÇALVES, 2009).

O conceito de biocompatibilidade baseia-se nas interações entre o material e o meio biológico envolvente. Um dos aspectos mais importantes da biocompatibilidade, no que diz respeito às qualidades do material, é a resposta tecidual local, que normalmente permite obter uma indicação clínica. A biocompatibilidade pode ser avaliada através de estudos *in vitro*, *in vivo* e/ou *ex vivo* (EL-WARRAK et al., 2004; JUNG et al., 2005; MENEZES; FREITAS; GONÇALVES, 2009).

O desenvolvimento de novos materiais para enxerto, membranas e matrizes tridimensionais, baseados em biomateriais reabsorvíveis e biocompatíveis, bem como sua aplicabilidade clínica e influência no processo de regeneração tecidual, tem demandado estudos voltados para síntese de polímeros sintéticos e naturais dentro do contexto da engenharia tecidual (SERVICE, 2000; DENG et al., 2005; FEINBERG; AGHALOO; CUNNINGHAM JR., 2005; MENEZES; FREITAS; GONÇALVES, 2009).

Os primeiros estudos foram realizados com membranas de acetato celulose e politetrafluoretileno expandido, utilizados em reparos de lesões ósseas. Estas pesquisas contribuíram com o entendimento dos processos regenerativos guiados com auxílio de membranas não reabsorvíveis, que atualmente estão sendo substituídas por materiais reabsorvíveis (BOYNE, 1969; CALLAN, 1993).

Nas últimas três décadas têm-se intensificado o desenvolvimento de biomateriais e, atualmente, existem numerosos implantes disponíveis para cirurgia ortopédica, maxilofacial e cardiológica (WEILER et al., 2000; TEMENOFF et al., 2004).

Ignácio et al. (1997), ao avaliarem a resposta biológica de polímero de mamona implantado em rádio de coelhos, observaram que se trata de um polímero biocompatível com propriedades osteoindutoras e osteocondutoras. Entretanto Celeste et al. (2010) observaram reação inflamatória moderada a intensa quando o biomaterial foi implantado no tecido subcutâneo de rato. Jacques et al. (2004) compararam enxerto esponjoso autólogo e polímero de mamona em defeitos nos

côndilos femorais de coelhos. O experimento mostrou que a poliuretana de mamona integra-se ao osso receptor mais lentamente que o enxerto ósseo autógeno. No entanto, a proposta do uso de massa moldável para preencher falha óssea mostrou-se possível e promissora, muito embora o enxerto ósseo esponjoso autógeno ainda seja considerado padrão ouro (FARDIN, 2010). He et al. (2010) citaram o potencial tóxico da ricina e ricinina presente na mamona, que podem causar hemaglutinação e toxicidade nervosa.

As membranas biodegradáveis sintéticas são elaboradas a partir de polímeros e copolímeros. Estas podem apresentar diferentes respostas de acordo com o tipo de tecido corporal a ela exposto (WEILER et al., 2000). As membranas sintéticas bioativas têm como objetivo estimular as células no local da lesão e, assim, promover reparo no local desejado (TEMENOFF et al., 2004). Também atuam como carreadores de substâncias bioativas, morfogenéticas, anti-inflamatórias e antibióticas, necessárias para estimular os processos bioquímicos de reparação e sinalização celular, acelerando assim a resposta celular e criando condições favoráveis para neoformação tecidual (DAHLIN; GOTTLOW; LINDE, 1990; WIKESJO et al., 2004).

Em reparação óssea, o coágulo sanguíneo permite a diferenciação e divisão de osteoblastos (DAHLIN; GOTTLOW; LINDE, 1990), porém, alguns estudos indicam que os fibroblastos liberam fatores hemolíticos sobre o coágulo sanguíneo, o que altera os fatores indutores de diferenciação celular e reduz a proliferação de células ósseas (BECKER; BECKER, 1990; DAHLIN; GOTTLOW; LINDE, 1990). As membranas exercem a função de barreira físico-química, bloqueando a migração de fibroblastos para o local de proliferação óssea, facilitando a consolidação óssea (DAHLIN; GOTTLOW; LINDE et al., 1990, WARRER et al., 1991).

Em alguns casos, a estrutura biológica do órgão ou tecido não pode ser reparada integralmente, de modo que a alternativa viável é a implantação de substitutos e biomateriais (SAKATA; RINCON; DUEK, 2004; BARBANTI; ZAVAGLIA, 2005). Grandes perdas ósseas ocasionadas por doenças, acidentes ou provocada por osteotomias reconstrutivas podem apresentar reparo retardado. Diversos estudos demonstraram resultados satisfatórios com a utilização de matrizes ou membranas para regeneração (DAHLIN; GOTTLOW; LINDE, 1990; SAKATA; RINCON; DUEK, 2004, WIKESJO et al., 2004).

A literatura cita como alternativas às membranas não reabsorvíveis (*teflon*) as membranas absorvíveis de cortical de fêmur humano, colágeno bovino, entre outras. As membranas de colágeno possuem alta velocidade de absorção (entre 30 e 40 dias), o que geralmente não é compatível com a velocidade de formação óssea (acima de 60 dias). Isso implica em perda na matriz extracelular óssea. Além disso, são inertes e assim a resposta tecidual fica atenuada (DENISSEN; DE GROOT, 1979; PAUL et al., 1992; GOMES et al., 2007).

Geralmente as membranas comerciais são constituídas de colágeno bovino tipo I ou politetrafluor expandido. Algumas são gelatinosas, o que facilita a aplicação (RUEDI; BASSETT, 1967; LAURENCE et al., 2005). A maior aderência nos tecidos diminui o escoamento do material e a incorporação de antibiótico auxilia o controle da infecção (SCULEAN et al., 1999; SIKAVITSAS et al., 2005). O uso de antibióticos associados a membranas absorvíveis no controle das infecções ósseas e a liberação local em doses menores têm promovido controle eficaz, com efeitos secundários mínimos (KINANE, 2000; SIPOS et al., 2005). Koort et al. (2008), ao estudarem a liberação e atividade antibacteriana da ciprofloxacina veiculadas em Poli DL Lactide *in vitro* e *in vivo*, observaram níveis terapêuticos em seis horas que formam mantidos por até 300 dias *in vitro* e por três meses *in vivo*.

Compostos hidrogéis biodegradáveis e semibiodegradáveis podem ser usados como substitutos ósseos e são de grande interesse em aplicações biomédicas devido à sua excelente biocompatibilidade e interação com tecidos (SANGINÁRIO et al., 2006).

O processo completo de substituição e bioreabsorção óssea de hastes de Poli L Lactide/Hidroxiapatita (PLLA-HA) e Poli L Lactide (PLLA) foi estudado por Shikinamia, Matsusueb e Nakamurac (2005). As hastes foram implantadas na cavidade medular de fêmur de coelhos. Microtomografia computadorizada, microscopia eletrônica de varredura e fotomicrografias de cortes corados foram utilizadas para documentar o processo completo de bioreabsorção e substituição óssea. Em tempos de observação de quatro, 4,5 e 5,5 anos, observaram que nos pacientes do grupo com HA, houve substituição completa por tecido ósseo após cinco anos, inversamente, as hastes PLLA somente mostrou condução óssea discreta e pequenas quantidades de áreas degradadas.

Dinarvand et al. (2011) testaram HA, biovidro e TCP no reparo ósseo de defeitos críticos em crânio de ratos. Os grupos foram constituídos de PLLA; PLLA - HA; PLLA - biovidro; PLLA - HA - biovidro; PLLA - TCP. Após oito semanas não houve reação do tipo corpo estranho e nem maior inflamação nos grupos com biomateriais. Os aditivos biovidro, HA e TCP formaram mais osso em comparação aos grupos controle e PLLA. Entre os tratamentos, o grupo PLLA - HA - biovidro apresentou maior osteoindução/osteocondução, assim como melhor osteointegração em relação aos demais grupos.

Debusscher et al. (2009) avaliaram os resultados clínicos de um compósito reabsorvível a base de PLLA associado ao β -TCP na artrodese cervical em um total de 27 intervenções em 20 pacientes humanos com idade entre 18 e 79 anos. A união óssea foi observada em 96% dos casos, com auxílio de avaliação por tomografia computadorizada. O bloco cerâmico garante a manutenção da altura do disco intervertebral e sua lenta reabsorção permitiu estabilidade com fusão vertebral e excelentes resultados clínicos. Os blocos foram completamente absorvidos aos 36 meses de observação. Os resultados, em termos de fusão e ausência de reação inflamatória, foram semelhantes aos obtidos por técnicas que usam enxerto de crista ilíaca, com a vantagem de ausência de morbidade relacionada a colheita do enxerto ósseo.

Compostos biodegradáveis de hidrogel foram testados na reparação de defeitos osteocondrais em coelhos. Após 12 semanas, a qualidade do novo tecido formado nas regiões condrais e nos defeitos subcondrais foram avaliadas. A análise histológica revelou formação de cartilagem hialina (GUO et al., 2010).

Shirane et al. (2010) avaliaram o reparo ósseo em fíbulas de *Rattus norvegicus*. Foram utilizados tubos de silicones sem preenchimento, acrescidos de colágeno ou hidroxiapatita. Após oito semanas, observaram neoformação óssea significativamente maior nos grupos com colágeno e hidroxiapatita em relação ao controle, demonstrando capacidade osteoindutora / osteocondutora destes materiais.

A biocompatibilidade, bioatividade e comportamento mecânico podem ser avaliados de diversas formas. Cai et al. (2011) realizaram análises radiográficas e histológicas na degradação de polímeros. Zhang et al. (1999) usaram testes mecânicos, microscopia eletrônica de varredura e análise histológica para avaliação *in vivo* do comportamento biológico e mecânico de epóxis revestidos com hidroxiapatita.

Avaliou-se a mineralização óssea e o percentual de crescimento ósseo na superfície dos implantes.

Zellin e Linde (1997) avaliaram radiograficamente e histologicamente a taxa de reparação óssea em defeitos mandibulares de ratos corrigidos com membranas enriquecidas com BMP. Após fixação em formol, os espécimes foram descalcificados, incluídos em parafina, cortados e corados com técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) e, na sequência, analisados. Os três cortes mais centrais de cada defeito foram usados para contagem óssea. A neoformação óssea foi maior no grupo das membranas enriquecidas com BMP e verificou-se também que o suporte mecânico promovido pela membrana facilitou a ação da BMP.

A coloração HE é uma técnica básica que permite análise de vários aspectos do reparo ósseo como inflamação, tecido de granulação, angiogênese, matriz cartilaginosa e matriz óssea. A coloração de Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP) é uma técnica histoquímica usada para evidenciar osteoclastos. O citoplasma destas células será marcado em cor púrpura a vermelho escuro. A Coloração Tricrômico de Masson é uma técnica histoquímica usada para demonstrar fibras de colágeno em contraste com osso e tecidos moles. Assim, é uma coloração que permite a identificação e visualização de colágeno no tecido ósseo (GAMBLE, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Morfometria é a descrição quantitativa dos achados geométricos de estruturas teciduais. A técnica possibilita a aferição de um ou mais parâmetros realizada por meio de *softwares* específicos e, a análise morfométrica das imagens, é utilizada em patologia para se obter dados precisos de componentes celulares e teciduais, mediante mensuração e contagem (ANDREA; BLEGGI; ALVES, 2008).

Para avaliar cultivos de osteoblastos em suportes de osso alogênico desmineralizado em coelhos, foram utilizadas análises radiográficas e histológicas. A avaliação histológica foi apenas qualitativa, com a finalidade de estudar os padrões de formação óssea. Em contraste, exame radiográfico foi aplicado para determinação quantitativa através de densitometria. Os espécimes preparados com técnica de HE e Tricromo de Mallory permitiram avaliar e descrever a presença de osteócitos, material osteoide, trabéculas ósseas, tecido fibroso, células mesenquimais e fibroblastos (LI; LI, 2005).

Neste contexto, o aumento da expectativa de vida do ser humano, como consequência dos avanços da medicina, da maior preocupação com a alimentação e

dos cuidados gerais com saúde, é um dos maiores influenciadores no desenvolvimento de substitutos viáveis para recuperação e manutenção dos tecidos e órgãos, criando-se materiais para reforço ou reparo de áreas corporais afetadas (KRUYT et al., 2006).

O tema envolve a integração de áreas como: biologia, medicina, veterinária, odontologia, engenharia, química e física. Nesse contexto, a interação entre essas áreas facilita o aprimoramento e o desenvolvimento de polímeros, assim como rotas de síntese, processamento em formas variadas, qualidade clínica e resposta do tecido receptor (DENG et al., 2005).

Ainda não há trabalhos experimentais publicados que avaliem a associação dos polímeros Poli L Lactide co Policaprolactone / Poli Glicol Etilênico (PLLA-co-PCL/PEG) sem aditivos ou adicionados de β -TCP ou nano-HA. Apesar da grande gama de trabalhos publicados envolvendo o assunto biomateriais, é consenso entre os autores a carência de um biomaterial com propriedades ideais e não existe um produto comercial que atenda todas as exigências, quais sejam:

- não desencadear resposta inflamatória sustentada ou tóxica na sua implantação *in vivo*;
- disponibilidade em quantidade suficiente;
- permitir a ocorrência do processo de reparo do sítio comprometido compatível com tempo de degradação;
- possuir propriedades mecânicas adequadas à aplicação para que foi indicado e que qualquer variação das propriedades mecânicas decorrentes de sua degradação *in vivo* seja compatível com o processo de reparo;
- não gerar produtos tóxicos ou mutagênicos durante sua degradação;
- promover osteogênese; estimular osteoindução e osteocondução;
- ser completamente absorvido ou substituído por tecido em quantidade e qualidade semelhante ao do hospedeiro (FARDIN et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

Objetivos

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar comparativamente os aspectos macro e microscópicos do reparo aos três, sete, 14 e 30 dias da implantação de polímero¹, polímero com β -TCP² e polímero com nano-HA³ em defeitos ósseos produzidos em tíbias de coelhos, face a intenção de sustentar seu uso clínico. Assim, verificou-se:

- a - os aspectos macroscópicos dos espécimes;
- b - os eventos morfológicos por meio de análise descritiva e semiquantitativa dos cortes teciduais;
- c - a neoformação óssea no defeito;
- d - os indicadores do processo de remodelação óssea: quantidade de osteoclastos, porcentagem de área de trabéculas ósseas e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos.

¹ Poli L Lactide co Policaprolactone / Poli Glicol Etilênico (PLLA-co-PCL/PEG)

² Poli L Lactide co Policaprolactone / Poli Glicol Etilênico / β Fosfato Tricálcico (PLLA-co-PCL/PEG / β -TCP)

³ Poli L Lactide co Policaprolactone / Poli Glicol Etilênico / nano Hidroxiapatita (PLLA-co-PCL/PEG / nano-HA)

Hipóteses

4 HIPÓTESES

Os defeitos ósseos não críticos, em indivíduos normorreativos, tendem a apresentar reparo fisiológico com formação de calo ósseo e remodelamento equilibrados.

A hipótese do estudo é que, os polímeros a serem testados, apresentam biocompatibilidade e induzem maior neoformação óssea nos grupos que receberam membranas poliméricas em relação ao grupo controle, particularmente nos períodos de 14 e 30 dias de observação.

Espera-se também, que a indução da neoformação óssea, seja acompanhada de remodelação apropriada.

Limitações do estudo

5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O estudo foi conduzido com pacientes normorreativos. Isto pode dificultar a avaliação do potencial osteoindutor das membranas, pois espera-se que o reparo ósseo nestes indivíduos transcorra dentro da normalidade e sem a necessidade de osteoindução por biomateriais. Alia-se, a este fato, o tamanho da falha óssea, onde se trabalhou com defeitos não críticos, o que possibilita ao organismo normorreativo, reparo sem intervenções terapêuticas.

Como o período máximo de avaliação foi de 30 dias, não foi possível observar o processo final da remodelação. Outro fato inerente ao período máximo de avaliação, é que, até aos 30 dias, as membranas não foram completamente absorvidas. Desta forma não se pode ter certeza se o estudo foi eficaz em avaliar o tempo de reabsorção ou se o material seria realmente absorvido.

A resistência mecânica, após a reparação tecidual, está diretamente relacionada à boa função do órgão. Entretanto, não foram executados testes biomecânicos, de modo que, apesar de maior neoformação óssea nos grupos com biomateriais, não se sabe se a resistência deste calo é igual, superior ou inferior aos grupos que não receberam biomateriais.

Material e Método

6 MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa foi realizada após avaliação e aprovação pela "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com protocolo nº 1763/2009.

6.1 Indivíduos

Foram adquiridos 48 coelhos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), machos, adultos jovens, com peso entre 3200 e 3500g, do biotério Myriam Lerner Fleider⁴. Os pacientes foram transportados de acordo com as normas da Vigilância Sanitária. Para adaptação, os coelhos ficaram em gaiolas individuais no biotério do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo por um período de 15 dias. Os pacientes, que apresentavam condições clínicas normais, foram mantidos em ambiente com higienização e iluminação adequadas e alimentados com ração sólida para coelhos⁵ e água *ad libitum*. Antes do procedimento cirúrgico, os coelhos foram pesados e submetidos a exame clínico.

6.2 Grupos experimentais

O trabalho foi dividido em tempos experimentais de três, sete, 14 e 30 dias, com 12 pacientes agrupados aleatoriamente em cada tempo de experimentação. As tíbias dos 12 coelhos de cada período contemplaram 24 unidades experimentais, sendo seis para cada tratamento:

controle - apenas o orifício sem membrana;

membrana 1 (M1) - constituído de polímero a base de Poli L Lactide co Policaprolactone / Poli Glicol Etilênico (PLLA-co-PCL/PEG);

⁴ Empresa localizada na Chácara dos Lagos – Coelhos – Rua Theodomiro Ferreira Gomes, nº. 137 – Mogi das Cruzes – SP.

⁵ Ração Purina Natural Coelho - Paulínia - SP - Brasil.

membrana 2 (M2) - constituído de polímero e β Fosfato tricálcico (PLLA-co-PCL/PEG/ β -TCP);

membrana 3 (M3) - constituído de polímero e nano hidroxiapatita (PLLA-co-PCL/PEG/nano-HA).

Desta forma, o trabalho foi composto por 96 unidades experimentais conforme o quadro 1. O composto polimérico bioativo foi produzido pela empresa Bioactive⁶.

Quadro 1 - Distribuição e estratificação da amostra por tempo experimental e por tratamento analisado **M1** – (PLLA-co-PCL/PEG); **M2** – (PLLA-co-PCL/PEG/ β -TCP); **M3** – (PLLA-co-PCL/PEG/nano-HA) - São Paulo - 2010

Tratamento Período	96 tíbias			
	Controle	M1	M2	M3
Três dias	6	6	6	6
Sete dias	6	6	6	6
14 dias	6	6	6	6
30 dias	6	6	6	6

Fonte: Da Cunha (2012)

6.3 Cirurgia de implantação das membranas

A metodologia para a implantação das membranas nas tíbias dos coelhos abordou três etapas: pré-cirúrgica e anestésica, trans-cirúrgica e pós-cirúrgica visando minimizar os efeitos secundários e qualquer interferência no processo de reparação óssea.

⁶ Empresa lotada no Instituto de Pesquisas Nucleares (IPEN) – USP, Av. Professor Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária – São Paulo - SP.

6.3.1 Procedimento pré-cirúrgico e anestésico

No período pré-cirúrgico os coelhos foram pesados e avaliados clinicamente. Na sequência, os pacientes receberam medicação pré-anestésica com cloridrato de cetamina⁷ (30 mg/kg) e midazolam⁸ (1 mg/kg) pela via intramuscular e, 20 minutos após, foram submetidos a tricotomia dos membros pélvicos. O procedimento foi realizado com lâmina de tricotomia número 40 montada em máquina de tosa⁹. Para completar a tricotomia aplicava-se creme depilatório a base de ureia¹⁰ na pele da região cirúrgica e deixava-se agir por um período de três a cinco minutos. A seguir, o excesso de pelo e creme foi removido com gaze embebida em água. Este procedimento tinha por objetivo evitar a contaminação das amostras com restos de pelo.

Foi realizada indução da anestesia geral com isoflurano¹¹ em oxigênio a 100% com fluxo de 3 L/min administrado por máscara. Após indução, os pacientes foram intubados com sonda endotraqueal para manutenção e o fluxo de O₂ foi reduzido para 1,5 L/min. Para todo o procedimento anestésico utilizou-se circuito Mapleson D montado em aparelho de anestesia com controle de ventilação¹². Procedeu-se acesso venoso e arterial em vasos auriculares para fluidoterapia e monitorização da pressão arterial, respectivamente.

Realizou-se anestesia peridural sacrococcígea com lidocaína¹³ ou bupivacaína¹⁴ (0,3 ml/kg), sendo a administração realizada em um minuto. Trinta minutos antes da incisão cutânea, os coelhos receberam uma dose 5 mg/kg de enrofloxacin¹⁵ pela via subcutânea como profilaxia antimicrobiana.

A antisepsia foi feita por meio de fricção cutânea com gazes estéreis embebidas em álcool 70% seguida de gazes embebidas em iodo 1%. Os campos esterilizados protegeram e isolaram a área cirúrgica.

⁷ Cetamin – Syntec – São Paulo - Brasil

⁸ Dormire – Cristália – São Paulo - Brasil

⁹ Máquina de Tosa Oster - São Paulo - Brasil

¹⁰ Creme depilatório Veet para rosto - Reckitt Benckiser - São Paulo - Brasil

¹¹ Isoflurane - Cristália – Itapira - Brasil

¹² Aparelho de anestesia inalatória - Shogun Evolution - Modelo 2700 - Takaoka - São Paulo - Brasil

¹³ Xylestesin Iodocaína 2% sem vasoconstritor - Cristália - São Paulo, Brasil

¹⁴ Neocaína bupivacaína 0,5% sem vasoconstritor - Cristália – São Paulo - Brasil

¹⁵ Baytril 5% injetável - Bayer - SP - Brasil

Durante o período trans-cirúrgico o paciente esteve sobre monitorização constante com auscultação cardiorrespiratória, oximetria de pulso¹⁶, pressão arterial invasiva¹⁶, eletrocardiograma¹⁶ (ECG), capnografia¹⁶ e análise de gases anestésicos¹⁶ (Figura 2).

Figura 2 – Procedimento anestésico. A - Manutenção anestésica com isoflurano por sonda orotraqueal e aferição de pressão arterial pelo método invasivo na artéria auricular. B - Monitor multiparamétrico que inclui oximetria, ECG, capnografia e análise de gases - São Paulo - 2010

Fonte: Da Cunha (2012)

6.3.2 Procedimento cirúrgico

A etapa cirúrgica foi realizada no de Cirurgia Cárdio-Torácica (LCCT) localizado nas dependências do Hospital Veterinário da FMVZ - USP e que tem como responsável o professor Dr. Angelo João Stopiglia.

Foi realizada uma incisão cutânea longitudinal de 4 cm, na face medial da tíbia com rebatimento de retalho periosteal. No tecido ósseo subjacente (tíbia) foram realizados dois orifícios monocorticais, de 2,8 mm de diâmetro, utilizando-se para tal uma sequência de brocas cirúrgicas de titânio. A perfuração inicial foi realizada com broca cilíndrica de 1,5 mm, seguida de broca de 2,0 mm e broca final de 2,8 mm de diâmetro, todas elas com 3 mm de profundidade controladas através de um dispositivo cirúrgico de parada vertical “stop”. As brocas estavam acopladas em

¹⁶ Monitor multiparamétrico DX2010 - Dixtal - São Paulo - Brasil

contra ângulo 16/1¹⁷, micromotor e motor odontológico¹⁸. Utilizou-se irrigação constante interna e externa das brocas com solução salina estéril¹⁹ (Figura 3).

Figura 3 – Material utilizado para perfuração óssea. A - Motor, micromotor, contra ângulo e broca com KIT de irrigação. B - Detalhe da perfuração óssea com irrigação contínua - São Paulo - 2010

Fonte: Da Cunha (2012)

Os dois orifícios cirúrgicos foram confeccionados na região proximal da face medial da tíbia, a 15 mm da articulação fêmoro-tíbio-patelar, com espaçamento de 10 mm entre cada um e, na sequência, uma membrana foi delicadamente colocada, com o intuito de recobrir completamente cada orifício cirúrgico. Em 24 tíbias não foram colocadas membranas e fizeram parte do grupo controle.

O periósteo foi cuidadosamente reposicionado por sobre a membrana e suturado com fio reabsorvível poliglecaprone²⁰ 5.0. A sutura dos demais tecidos foi realizada em camadas teciduais, sendo a camada muscular e o tecido subcutâneo suturados com poliglecaprone²⁰ 5.0 e a pele suturada com fio de mononylon²¹ 4.0. A figura 4 demonstra a realização do procedimento cirúrgico e a figura 5 a localização dos orifícios nas tíbias em imagens radiográficas.

Para cada tempo experimental, foram utilizados 12 coelhos ou 24 tíbias. Desta forma foram obtidos seis controles, seis M1, seis M2 e seis M3 (Quadro 1).

¹⁷ Contra ângulo para micromotor – Anthogyr 16/1.

¹⁸ Motor odontológico BLM 350 - Driller.

¹⁹ Solução de NaCl 0,9% - JP - Indústria Farmacêutica - SA - Ribeirão Preto - SP.

²⁰ Caprofil, Ethicon, São Paulo – SP - Brasil

²¹ Nylon, Ethicon, São Paulo – SP - Brasil

Figura 4 - Cirurgia de implantação das membranas poliméricas bioativas em defeitos provocados em tíbia de coelho. A - Incisão do periósteo. B - Elevação de retalho de periósteo com elevador tipo Molt. C - Observe orifícios de 2,8 mm de diâmetro com espaçamento de 1cm entre eles. D - Detalhe da membrana durante o posicionamento sobre os defeitos. E - Membranas sobre os orifícios. F - Sutura do periósteo sobre os orifícios - São Paulo - 2010

Fonte: Da Cunha (2012)

Figura 5 – Exame radiográfico da tíbia no pós-operatório imediato. A - Incidência craniocaudal com localização dos orifícios na cortical "trans". B - Incidência mediolateral - São Paulo - 2010

Fonte: Da Cunha (2012)

6.3.3 Procedimento pós-operatório

Os pacientes foram observados até a recuperação anestésica. No pós-operatório imediato foram medicados com 3 mg/kg de cetoprofeno²² e 2 mg/kg de sulfato de morfina²³, ambos pela via subcutânea. A analgesia foi mantida com cetoprofeno²² durante cinco dias e morfina²³ por três dias.

Os coelhos foram acomodados em gaiolas individuais até o final do experimento, sendo monitorados diariamente para a verificação da integridade dos locais operados, nível de atividade, ingestão hídrica / alimentar e verificação da eliminação de fezes e urina. Durante essa fase foi fornecida água e ração comercial *ad libitum*.

²² Ketofen 1% - Pfizer – São Paulo – SP - Brasil

²³ Dimorf 10mg/ml – Cristália – Itapira - SP

6.4 Colheita e acondicionamento das amostras

Após os períodos de observação determinados, os pacientes foram sedados com a administração intramuscular de cetamina⁷ (10 mg/kg) e midazolam⁸ (1 mg/kg). A indução anestésica foi realizada com tiopental sódico²⁴ (50 mg/kg) pela via intravenosa e, na sequência, foram submetidos à eutanásia com dose letal de cloreto de potássio²⁵, administrado pela via intravenosa.

Para retirada das peças, realizou-se cuidadosamente incisão cutânea e muscular transversal que circundava a articulação fêmoro-tíbio-patelar, facilitando a desarticulação da tíbia. Outra incisão transversal em região distal à articulação tíbio-társica foi realizada para separar a tíbia do tarso. Através de dissecação cuidadosa, as camadas musculares foram retiradas de forma a não prejudicar a região próxima aos orifícios e suas respectivas membranas. Após a retirada das camadas musculares, cada tíbia foi identificada e armazenada em frascos com solução de formol 10%.

Uma semana após o acondicionamento em formol, as tíbias foram seccionadas com auxílio de disco diamantado montado em peça de mão reta 1:1²⁶ e acoplado a micromotor e motor¹⁸. O corte foi feito a aproximadamente 1 cm de cada orifício, restando um segmento ósseo com cerca de 3 cm contendo os dois orifícios. A identificação seguiu a ordem: período experimental, tratamento e número do indivíduo. Por exemplo, no espécime 7M134, **7** refere-se ao período experimental, **M1** determina o grupo membrana 1 e **34** o número do indivíduo. Mais tarde os espécimes foram divididos em dois espectrais, acrescentando a letra **A** ou **B** à etiqueta (Figura 6).

²⁴ Thiopental sódico - Cristália – Itapira - SP

²⁵ Cloreto de potássio 19,1% - Equiplex – Goiânia - GO

²⁶ Peça de mão reta 1:1 - KAVO

6.5 Fase laboratorial

Os 96 segmentos ósseos de tíbias, preservados em formol 10%, foram encaminhados para o Laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Estomatologia – Faculdade de Odontologia – Universidade de São Paulo (FO-USP) que tem como responsável a Prof^a. Dra. Luciana Corrêa.

6.5.1 Preparo das lâminas

O preparo das lâminas foi realizado de acordo com metodologia abaixo especificada.

Descalcificação

Para descalcificação dos espécimes, cada peça foi identificada e acondicionada em frasco de dois litros de capacidade e submersas em 1 L de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 8%, pH 7,4. Semanalmente o EDTA foi substituído. O processo de descalcificação finalizou em um mês.

Corte macroscópico do espécime

Após descalcificação, os espécimes foram colocados sobre suporte de vidro e cortados, no sentido "longo eixo", com lâmina de micrótomo de forma a dividir os orifícios ao meio. Este procedimento criou dois espectrais (A e B) de cada espécime e aumentou o número de amostras, além disso, permitiu avaliação macroscópica (Figura 6). Com a divisão de cada uma das 96 unidades experimentais, obteve-se 192 espectrais que foram avaliados macroscopicamente na sequência.

Figura 6 - Corte do espécime no sentido "longo eixo" do osso. Observe os dois espectrais com dois defeitos cada e membranas recobrimdo os orifícios. Abaixo de cada peça, observe a identificação em etiqueta que será usada até o final do processamento - São Paulo - 2011

Fonte: Da Cunha (20012)

Diafanização e inclusão dos espécimes em parafina

Após o corte, as peças foram acondicionadas em cassetes e encaminhadas para diafanização. Para tanto, o cassete, juntamente com a peça, foi submetido à submersão em série crescente de álcool e xilol por um período de 12 horas. Seguiu-se a este procedimento a inclusão dos espécimes em parafina. Finalmente os blocos, devidamente identificados, foram armazenados para posterior microtomia.

Corte dos blocos em micrótomo e coloração

Para análise descritiva, semiquantitativa e morfométrica em microscopia óptica de luz, preparou-se oito lâminas, sendo quatro de cada spectral (A e B).

Os cortes, com 5 µm espessura, foram realizados em micrótomo manual de mesa com auxílio de navalha. Seis lâminas foram coradas com HE, uma com coloração de TRAP e uma com coloração de Tricrômico de Masson. Após o assentamento do(s) corte(s) sobre a lâmina, o conjunto foi levado à estufa a 60°C para derretimento da parafina.

Coloração HE

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional quanto aos seguintes aspectos:

- a) grau de reabsorção da membrana;
- b) grau de inflamação;
- c) grau de reparação (osteogênese e/ou fibrogênese).

Esses aspectos foram analisados de forma qualitativa e quantitativa, sendo realizados testes morfométricos principalmente quanto a celularidade, quantidade de fibras colágenas formadas e quantidade de material osteoide.

Nas lâminas coradas com HE, foram realizadas análises descritiva, semiquantitativa e testes morfométricos.

Coloração de TRAP

A coloração de TRAP foi utilizada para contagem de osteoclastos.

Coloração Tricrômico de Masson.

A coloração foi utilizada para identificação e visualização de colágeno no tecido ósseo.

6.5.2 Avaliação macroscópica

Cada espécime foi avaliado macroscopicamente quanto a integridade da membrana, presença de tecido ósseo neoformado sobre e sob a membrana, hematoma, integridade da medula óssea, preenchimento do orifício e integridade da cortical, de acordo com quadro 2. Utilizou-se um quadro para cada espécime para anotação dos dados.

Quadro 2 – Ficha para análise macroscópica dos espécimes. MB – membrana; MO – medula óssea – São Paulo - 2011

Espécime:_____	Avaliação				
Membrana	Integra ()	Parcialmente deslocada ()		Deslocada ()	Ausente ()
Osso sobre a MB	Muito ()	Médio ()		Pouco ()	Nada ()
Osso sob a MB	Muito ()	Médio ()		Pouco ()	Nada ()
Hematoma	Grande ()	Médio ()		Pequeno ()	Nada ()
Integridade da MO	Sim ()			Não ()	
Consolidação do orifício	100% ()	75% ()	50% ()	25% ()	0% ()
Integridade da cortical	Interna sim () não ()			Externa sim () não ()	

Fonte: Da Cunha (2012)

6.5.3 Avaliação microscópica

As lâminas coradas com HE, Masson e TRAP permitiram análises descritiva e semiquantitativa procedidas por profissional patologista e testes morfométricos cegos por avaliador calibrado.

Análise descritiva

Para descrição microscópica, foi utilizada pelo menos uma lâmina de cada spectral incluindo todos os tempos experimentais e tratamentos. A avaliação permitiu descrever as características do defeito ósseo, presença e particularidades do tecido interposto como: tecido de granulação, vasos sanguíneos neoformados e áreas de matriz óssea e/ou cartilaginosa. Também avaliou-se as alterações no periósteo, reação tipo corpo estranho e presença de material exógeno.

Análise semiquantitativa.

As lâminas foram avaliadas segundo os critérios: infiltrado inflamatório, necrose, edema, tecido de granulação, angiogênese, matriz óssea, matriz cartilaginosa, hiperplasia periosteal e reação de corpo estranho. Assim, foram atribuídas notas de 0 a 4 onde: 0 – 0% (ausente); 1 – 1 a 25% (discreto); 2 – 26 a 50% (discreto a moderado); 3 – 51 a 75% (moderado a intenso); 4 – 76 a 100% (intenso).

6.5.4 Morfometria

A morfometria incluiu a quantificação da área de calo ósseo abrangendo matriz óssea e cartilaginosa, quantificação do número de osteoclastos e porcentagem de área de trabéculas ósseas.

Quantificação do calo ósseo

Seis cortes de cada espécime (três de cada espectral), corados em HE, foram selecionados aleatoriamente para quantificação da área do calo ósseo e de matriz cartilaginosa em mm². Foram quantificados os espécimes dos períodos experimentais de 14 e 30 dias, nos quais foi visível a presença de calo ósseo. Para cada corte, foram medidos cinco campos contendo o calo ósseo no aumento de 40X, tendo como referência a borda do defeito ósseo. A figura 7 ilustra, de forma esquemática, a lâmina de um espécime com as regiões onde a área do calo ósseo foi aferida.

Após a medição do calo como um todo, foi quantificada também, no mesmo campo, a área de matriz cartilaginosa presente no interior do calo. As medições foram realizadas por um único operador calibrado, utilizando *software* de morfometria digital²⁷. Os campos foram digitalizados a partir de microscópio de luz convencional²⁸ contendo câmera tipo CCD²⁹. Os dados foram inseridos em uma tabela, sendo no

²⁷ ImageLab2000® - Softium - São Paulo - Brasil.

²⁸ Microscópio de luz convencional - Laboval 4 - Zeiss - Alemanha.

²⁹ Câmera - Sony - HiperH AD - Japão.

final, obtida um média dos campos e, em seguida, a média dos espécimes de cada grupo e período experimental (Figuras 8, 9 e 10).

Figura 7 - Representação esquemática do espécime em corte longitudinal do osso com observação de dois defeitos com espaçamento de 1 cm entre eles. Observe os campos escolhidos para morfometria através da mensuração das áreas em mm^2 de osso neoformado. 1 - Campo correspondente a região do defeito ósseo. 2 - Região imediatamente abaixo do defeito. 3 - Região acima do defeito. 4 e 5 - Regiões laterais ao defeito - São Paulo - 2011

Fonte: Da Cunha (2012)

Figura 8 - Representação da tabela usada para obtenção da média da área em mm^2 do calo ósseo (CO) de cada espécime. 1A, 2A e 3A referem-se a cortes do espectral 14C16A e 1B, 2B e 3B referem-se a cortes do espectral 14C16B - São Paulo - 2011

Lâmina 14C16A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,43	6,98	6,5	5,26	5,95	5,92		
2	0	0	0	0	0	0		
3	0,99	1,3	0,79	0,93	1,15	1,01		
4	1,31	0,64	1,36	1,32	1,02	1,32		
5	0,66	0,56	0,73	1,12	1,4	1,23		
Total	9,39	9,48	9,38	8,63	9,52	9,48		
Média	1,88	1,90	1,88	1,73	1,90	1,90	11,18	1,86

Fonte: Da Cunha (2012)

Figura 9 - Equipamento usado para análise morfométrica. Microscópio de luz convencional acoplado em câmera tipo CCD e *software* de morfometria digital ImageLab2000® - São Paulo - 2011

Fonte: Da Cunha (2012)

Figura 10 - Interface do programa ImageLab2000®. A - Calo ósseo exibido em tela. B - Área de calo ósseo delimitado em azul - São Paulo - 2011

Fonte: Da Cunha (2012)

Contagem de osteoclastos e trabéculas ósseas

Dois cortes de cada espécime, corados em HE, foram selecionados aleatoriamente para quantificação do número de osteoclastos e porcentagem de trabéculas ósseas. Foram quantificados os espécimes dos períodos experimentais de sete, 14 e 30 dias, onde é visível a presença de osteoclastos e trabéculas. Para cada corte, foram medidos cinco campos em aumento de 100X, tendo como referência a borda do defeito ósseo (Figura 11). As lâminas coradas em TRAP foram usadas para confirmar a presença de osteoclastos durante a análise.

Após a contagem do número de osteoclastos (C), foi quantificada também, no mesmo campo, a porcentagem de área de trabéculas ósseas (T) no calo ósseo. A porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos (C/T) foi obtida dividindo o número de osteoclastos pela área de trabéculas ósseas e multiplicando por 100 $[(C/T)*100]$. As medições foram realizadas por um único operador calibrado, utilizando *software* de morfometria digital²⁷. Os campos foram digitalizados a partir de microscópio de luz convencional²⁸ contendo câmera tipo CCD²⁹. Ao final, foi obtida média dos campos e, em seguida, média dos espécimes de cada grupo e período experimental (Figuras 12 e 13).

Figura 11 - Localização dos campos, em lâmina de tecido ósseo corada em HE, aumento de 40X, para contagem de osteoclastos e porcentagem de área de trabéculas ósseas - São Paulo - 2011

Fonte: Da Cunha (2012)

Figura 12 - Representação da tabela usada para obtenção das médias da porcentagem de área de trabéculas ósseas (M - Trabec), número de osteoclastos (M - Clastos) e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos $[(C/T)*100]$ - São Paulo - 2011

Unidade	Campo 1		Campo 2		Campo 3		Campo 4		Campo 5		M - Clastos	M - Trabec	(C/T)*100
Medidas	C	T	C	T	C	T	C	T	C	A			
7C34A	3	21,5	3	21,5	4	22,2	2	18,3	2	16	2,9	20,14	14,40
7C34B	5	20,5	3	19,8	2	19,4	2	20,3	3	21,9			
7C36A	3	9,9	2	22,9	3	19,2	2	14,7	2	19,6	2,4	18,43	13,02
7C36B	5	24	2	19,8	3	18,4	2	23,5	0	12,3			
7C32A	3	18,6	2	24,9	3	19,9	3	18,6	4	18,5	2,8	18,83	14,87
7C32B	3	17,4	3	15,8	4	23	1	20,6	2	11			
7C30A	3	13,2	2	18,6	1	21,2	2	15,3	4	19	2,3	17,12	13,43
7C30B	4	17,6	2	15,7	2	14,1	1	17,8	2	18,7			
7C28A	3	15,2	2	16,3	3	20	1	14,2	2	18,8	2,2	18,28	12,04
7C28B	2	17,8	3	20,7	2	21,2	1	17,7	3	20,9			
7C39A	1	21,8	0	22,7	4	23,1	6	20,9	1	20,9	2,4	19,29	12,44
7C39B	2	18,2	2	16,2	3	13,9	2	19,3	3	15,9			

M - média; C - osteoclastos; T - porcentagem de área de trabéculas ósseas

Fonte: Da Cunha (2012)

Figura 13 - Interface do programa ImageLab2000® com visualização do calo. O sistema de subtração RGB foi usado para quantificar a porcentagem de área de trabéculas ósseas - São Paulo - 2011

Fonte: Da Cunha (2012)

6.6 Testes estatísticos

De posse dos resultados morfométricos, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para as comparações múltiplas. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%. Desta forma, foi considerado haver diferença entre os grupos se $p\text{-valor} < 0,05$. Havendo diferença entre os grupos, utilizou-se o teste de Mann-Whitney (comparação dois a dois) para identificar quais grupos apresentavam diferenças entre si. Este tratamento estatístico foi aplicado para as variáveis área de calo ósseo, porcentagem de área de trabéculas ósseas, número de osteoclastos e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos.

A área de matriz cartilaginosa foi analisada através do teste binominal de duas proporções, enquanto os dados da análise semiquantitativa foram avaliados com base na comparação de medianas em cada tratamento dentro do período experimental.

A análise estatística foi realizada com auxílio de programa estatístico computadorizado³⁰.

³⁰ Software Bioestat 3.0® - Belém - PA - Brasil

Resultados

7 RESULTADOS

O protocolo anestésico utilizado permitiu a realização dos procedimentos sem intercorrências. O grau de relaxamento muscular facilitou a técnica e garantiu conforto ao paciente durante a cirurgia.

Quatro pacientes vieram a óbito nos primeiros cinco dias do pós-operatório por timpanismo cecal. Dois foram submetidos à eutanásia por fratura de tíbia no primeiro dia de pós-operatório. Os seis pacientes foram substituídos e o protocolo analgésico e de manejo geral foi ajustado. As incisões cirúrgicas cicatrizaram sem complicações e não se observou reação inflamatória sustentada nos sítios cirúrgicos.

7.1 Descrição macroscópica

Dos 96 espécimes, 24 faziam parte do grupo controle e 72 dos grupos tratamentos. Durante a análise macroscópica percebeu-se, em quatro espécimes, membranas parcialmente deslocadas, e em 68 espécimes as membranas estavam intactas e no local que haviam sido colocadas durante a cirurgia.

Todos os espécimes dos grupos com tempo experimental de **três dias** exibiram hematoma volumoso no interior do defeito avançando para o canal medular, integridade da medula óssea, integridade da cortical e manutenção do defeito cirúrgico com bordas regulares. Os espécimes dos grupos com tempo experimental de **sete dias** apresentaram as mesmas características, exceção feita ao hematoma que estava mais organizado e pequeno nos espécimes do grupo controle e ausente nos que receberam membranas poliméricas.

Os exemplares dos grupos que foram submetidos à eutanásia aos **14 dias** revelaram ausência de hematoma, integridade da medula óssea e preenchimento parcial do orifício cirúrgico com tecido firme. Nos espécimes dos grupos que receberam membrana sobre o orifício, notou-se presença de grande quantidade de tecido com aspecto macroscópico semelhante a osso entre a membrana e o periósteo. As unidades experimentais dos grupos de **30 dias** demonstraram sinais semelhantes aos de 14 dias, porém, o preenchimento do defeito cirúrgico foi mais

evidente, especialmente nas unidades do grupo controle. O tecido entre a membrana e o periósteo, apesar de menos volumoso em relação ao período anterior, revelaram consistência dura, semelhante à cortical óssea.

7.2 Descrição microscópica e análise semiquantitativa

Os resultados das leituras das lâminas serão descritas por grupo / tratamento de acordo com laudo do profissional patologista.

7.2.1 Descrição microscópica

Período experimental de três dias

Em todos os tratamentos foi observada presença de defeito ósseo com bordas homogêneas e áreas restritas de desvitalização óssea. Havia coágulo interposto no defeito e periósteo com intenso infiltrado inflamatório difuso. Nos espécimes do grupo controle, observou-se tecido necrótico na superfície do defeito. Nos grupos que receberam membranas, o periósteo exibia edema discreto e verificou-se presença de espaço entre a superfície do defeito e o periósteo, o que sugere ocupação anterior por material exógeno. Nos exemplares dos grupos que receberam M3, observou-se áreas focais de necrose (Figura 14).

Figura 14 - Lâminas de tecido ósseo, em aumento de 40X, dos espécimes dos grupos com tempo experimental de três dias em coloração HE. Observe defeito ósseo com coágulo interposto (setas). Nas lâminas dos espécimes com polímeros é possível observar espaço entre o defeito e o periósteo (círculos) - São Paulo - 2011

Fonte: Da Cunha (2012)

Período experimental de sete dias

As lâminas dos quatro grupos exibiam defeito ósseo com bordas homogêneas e áreas sem desvitalização óssea, além de exuberante tecido de granulação interposto com grande quantidade de vasos sanguíneos neoformados e áreas focais de matriz óssea e cartilaginosa. Observou-se presença de osteoclastos na região de matriz osteoide.

Nas lâminas do grupo controle, o periósteo exibia hiperplasia com grande quantidade de células osteoprogenitoras distribuídas paralelamente entre si, sobre tecido conjuntivo denso. Notou-se deposição de matriz osteoide na superfície externa da cortical óssea adjacente ao tecido periosteal.

Nas lâminas dos grupos que receberam membranas, verificou-se manutenção do espaço entre periósteo e superfície óssea sugestivo de presença de material exógeno nesta região. Grande quantidade de matriz óssea e cartilaginosa estava presente na superfície do defeito e na região do periósteo (Figura 15). Trabéculas ósseas, misturadas a material osteoide, foram também observadas na região da medula óssea. Nas lâminas do grupo M3, verificou-se quantidade superior de matriz cartilaginosa na região do periósteo em comparação com os demais grupos (Figura 16).

Figura 15 - Lâmina de tecido ósseo, em aumento de 100X, de um espécime do grupo com polímero e nano-HA com tempo experimental de sete dias em coloração Masson. Observe presença de condrócitos (seta) entre matriz óssea (círculo) - São Paulo - 2011

Fonte: Da Cunha (2012).

Figura 16 - Lâminas de tecido ósseo, em aumento de 40X, dos espécimes dos grupos com tempo experimental de sete dias em coloração HE. Observe defeito ósseo com matriz óssea interposta (setas). Nas lâminas dos espécimes com membranas é possível observar espaço entre o defeito e o periósteo (círculos) - São Paulo - 2011

Fonte: Da Cunha (2012).

Período experimental de 14 dias

Em todos os grupos notou-se grande quantidade de osteoclastos na região do calo ósseo, bem como espessamento do tecido conjuntivo periosteal na superfície do calo (Figura 17). Nas lâminas do grupo controle observou-se presença de defeito ósseo cujo espaço exibia grande quantidade de material osteoide e trabéculas ósseas imaturas, em meio a tecido hematopoiético em processo de regeneração. No periósteo observou-se hiperplasia do tecido conjuntivo e deposição de matriz óssea em toda extensão superficial do defeito. Nessa região, notou-se alinhamento paralelo das fibras colágenas e das células osteoprogenitoras, indicando regeneração do periósteo.

Nas lâminas dos espécimes que receberam membranas, observou-se presença de defeito ósseo unido por calo ósseo recém formado, composto por trabéculas ósseas espessas com grande conectividade entre si em meio a tecido conjuntivo frouxo bem vascularizado. Verificou-se também a presença de espaço que sugere ter sido ocupado por material exógeno (membrana), que isolou a região do defeito ósseo em relação a parte superficial do calo. Havia grande quantidade de matriz cartilaginosa e, nas lâminas dos espécimes M2 e M3, foi nítida a ossificação endocondral, onde a recente substituição da cartilagem por trabéculas ósseas, foi mais evidente que em M1 (Figura 18).

Figura 17 - Lâmina de tecido ósseo, em aumento de 400X, de um espécime do grupo controle com tempo experimental de 14 dias em coloração TRAP. Observe osteoclastos (setas) - São Paulo - 2011

Fonte: Da Cunha (2012).

Figura 18 - Lâminas de tecido ósseo, em aumento de 40X, dos espécimes dos grupos com tempo experimental de 14 dias em coloração HE. Observe defeito com matriz óssea interposta (setas). Nas lâminas dos espécimes com membranas é possível observar espaço entre o defeito e o periósteo (círculos) - São Paulo - 2011

Fonte: Da Cunha, (2012).

Período experimental de 30 dias

Nas lâminas do grupo controle observou-se calo ósseo bem maduro, praticamente composto por tecido ósseo compacto com remodelamento avançado e apresentando continuidade com as margens do defeito. Na superfície do defeito notou-se periósteo com hiperplasia discreta e inúmeras células osteoprogenitoras.

Nas lâminas dos grupos com membranas, observou-se presença de calo ósseo exuberante na região do defeito ósseo, estendendo-se por toda superfície do osso preexistente e composto por trabéculas ósseas coesas, porém, com espaços medulares mais numerosos e amplos em relação ao controle. O espaço entre o periósteo e cortical que sugere ter sido ocupado por material exógeno permanecia.

Foram verificados espaços medulares amplos preenchidos por material hematopoiético tanto na região do defeito, quanto na superfície do osso preexistente. Notou-se também grande quantidade de osteoclastos em lacunas de *Howship* (osteoclastos ativos) e grande quantidade de osso esponjoso. Nas lâminas dos exemplares do polímero com nano-HA, verificou-se calo ósseo exuberante composto por tecido ósseo com espaços medulares de tamanho menor que nos grupos polímero e polímero com β -TCP, porém, maiores e mais numerosos que o controle (Figura 19).

Figura 19 - Lâminas de tecido ósseo, em aumento de 40X, dos espécimes dos grupos com tempo experimental de 30 dias em coloração HE. No grupo controle é possível observar calo ósseo maduro (seta branca). No grupo polímero com nano-HA verifica-se calo ósseo exuberante composto por tecido ósseo com espaços medulares de tamanho maior que o grupo controle porém menor que os grupos com os outros polímeros (setas escuras). Nas lâminas dos espécimes com membranas é possível observar espaço entre o defeito e o periósteo (círculos) - São Paulo - 2011

Fonte: Da Cunha (2012)

Nos períodos experimentais de sete, 14 e 30 dias, no **grupo controle**, a matriz óssea formou-se no interior do defeito e nos **grupos membranas**, formou-se no interior do defeito e também em grande quantidade na superfície do defeito e no perióstio. A presença da membrana significou uma barreira que isolou o perióstio do defeito ósseo e que acarretou na formação de grande quantidade de matriz óssea e cartilaginosa na região acima da membrana, diferente do controle, em que esta resposta foi mais homogênea no interior do defeito (Figura 20).

Figura 20 - Lâminas de tecido ósseo do período experimental de 14 dias em aumento de 40X. Observe calo no interior do defeito (setas brancas), sobre a membrana (seta vermelha), perióstio (círculos brancos) e membrana (círculo vermelho) em coloração de Masson – São Paulo - 2011

Fonte: Da Cunha (2012)

7.2.2 Análise semiquantitativa microscópica

Os resultados da análise semiquantitativa, obtidos por meio de leitura das lâminas dos espécimes representativos de cada período experimental, foram sumarizados pelo valor estatístico (mediana; máximo-mínimo).

Em todos os períodos experimentais, e nos quatro tratamentos, não houve reação do tipo corpo estranho (0; 0-0).

Período experimental - três dias

Todos os grupos exibiram infiltrado inflamatório de moderado a intenso (3; 2-3); edema de discreto a moderado (2; 2-3); tecido de granulação ausente (0; 0-0); angiogênese discreta (1; 1-1); matriz óssea ausente (0; 0-0) e matriz cartilaginosa ausente (0; 0-0).

Verificou-se necrose de discreta a moderada (2; 2-3), edema de moderado a intenso (3; 2-3) e hiperplasia periosteal de moderada a intensa (3; 3-4) no grupo controle. Assim, estes critérios foram mais expressivos e estatisticamente significativos no grupo controle em relação aos grupos que receberam polímeros, onde observou-se necrose discreta (1; 2-1), edema de discreto a moderado (2; 2-3) e hiperplasia periosteal de discreta a moderada (2; 2-3).

Período experimental - sete dias

Para os quatro tratamentos observou-se infiltrado inflamatório discreto (1; 1-2); necrose discreta (1; 1-1); edema discreto (1; 0-2); tecido de granulação de moderado a intenso (3; 2-4) e matriz óssea de moderada a intensa (3; 2-4). Desta forma, os quatro tratamentos foram estatisticamente semelhantes.

A angiogênese foi de moderada a intensa (3; 3-4) nos grupos que receberam polímeros, sendo estatisticamente superior ao grupo controle, onde a angiogênese foi de discreta a moderada (2; 1-2).

Nos grupos controle e M2, observou-se hiperplasia periosteal intensa (4; 2-4), que foi estatisticamente maior que M1 e M3 (3; 3-4), onde a hiperplasia foi de moderada a intensa.

Os grupos que receberam polímeros apresentaram formação de cartilagem de moderada a intensa (3; 2-3), estatisticamente superior ao grupo controle (2; 1-2), classificada como discreta a moderada.

Período experimental - 14 dias

Neste período, os grupos exibiram infiltrado inflamatório discreto (1; 1-1); necrose ausente (0; 0-1); edema ausente (0; 0-0); tecido de granulação discreto (1; 0-2); matriz óssea de moderada a intensa (3; 3-4) e hiperplasia periosteal de discreta a

moderada (2; 1-2). Os resultados foram estatisticamente semelhantes para os quatro tratamentos.

A angiogênese foi de moderada a intensa (3; 3-3) nos grupos que receberam polímeros, sendo estatisticamente superior ao grupo controle, onde a angiogênese foi de discreta a moderada (2; 1-3).

Os grupos que receberam polímeros exibiram matriz cartilaginosa de discreta a moderada (2; 2-3), que foi estatisticamente superior ao grupo controle, onde a matriz cartilaginosa era discreta (1; 1-2).

Período experimental - 30 dias

Todos os grupos exibiram infiltrado inflamatório, necrose, edema e tecido de granulação ausentes (0; 0-0). A angiogênese foi de moderada a intensa (3; 2-3) e a matriz cartilaginosa ausente (0; 0-0). Estes critérios foram estatisticamente semelhantes entre os grupos.

Os grupos controle e M1 apresentaram hiperplasia periosteal discreta (1; 1-1) e foram estatisticamente diferente dos grupos M2 e M3, que exibiram hiperplasia periosteal de discreta a moderada (2; 1-2). A matriz óssea ocorreu de forma intensa no grupo controle (4; 4-4) e de forma moderada a intensa nos grupos que receberam polímeros (3; 3-3).

7.3 Morfometria

Na mensuração de tecido ósseo neoformado obteve-se os valores em mm². A contagem do número de osteoclastos e porcentagem de trabéculas ósseas permitiu obter a porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos. Os dados estão demonstrados em tabelas e gráficos, juntamente com o tratamento estatístico apropriado para cada variável.

7.3.1 Quantificação do calo ósseo

Área de calo ósseo

Devido ao número e variabilidade das amostras, os dados foram avaliados por um modelo estatístico não paramétrico. Após o cálculo das médias dos campos e dos indivíduos (Apêndices A a J), os dados foram inseridos no programa Bioestat 3.0® para análise estatística conforme tabela 1. Para os tempos experimentais de 14 e 30 dias, o teste de Kruskal-Wallis mostrou haver diferença entre os grupos, assim, na sequência, fez-se o teste de Mann-Whitney, que mostrou diferença entre o grupo controle e os que receberam membrana. No tempo experimental de 14 dias, o teste também mostrou haver diferença entre M2 e M3. Já para o tempo experimental de 30 dias, não houve diferença estatística entre as membranas. De acordo com os dados obtidos e análise estatística, pode se observar que os biomateriais empregados proporcionaram maior neoformação óssea comparado ao controle e que o biomaterial M3 produziu maior calo ósseo que M2 no tempo experimental de 14 dias (Gráfico 1).

Tabela 1 - Análise estatística das médias da área do calo (CO) ósseo em mm² dos espécimes de cada tratamento nos tempos experimentais de 14 e 30 dias - São Paulo – 2012

Período / Tratamento	14 dias	P	30 dias	p
C	2,13 (± 0,17)		1,90 (± 0,11)	
M1	4,40 (± 0,35) ^a	0,001	3,75 (± 0,19) ^a	0,003
M2	4,28 (± 0,30) ^a		3,76 (± 0,25) ^a	
M3	4,80 (± 0,27) ^{a,b}		3,68 (± 0,31) ^a	

Estatisticamente significante quando $p < 0,05$

a = estatisticamente significante quando comparado ao controle ($p = 0,003$)

b = estatisticamente significante quando comparado a M2 ($p = 0,025$)

Fonte: Da Cunha (2012).

Gráfico 1 - Representação da área de calo ósseo formada nos períodos experimentais de 14 e 30 dias, contendo média e desvio padrão - São Paulo - 2012

Fonte: Da Cunha (2012).

Área de matriz cartilaginosa

Durante a morfometria dos espécimes com tempo experimental de 14 e 30 dias, apenas as lâminas do tempo experimental de 14 dias exibiram matriz cartilaginosa (Apêndices L a P). Pelo teste binominal de duas proporções, observou-se frequência estatisticamente maior de indivíduos exibindo cartilagem nos grupos com membranas (5 indivíduos em 6) em relação ao controle (2 indivíduos em 6) ($p = 0,039$). Na comparação entre os grupos com membranas, não houve diferença estatisticamente significativa com relação a área de cartilagem ($p = 0,8539$).

7.3.2 Contagem de osteoclastos e porcentagem de área de trabéculas ósseas

A contagem de osteoclastos, porcentagem de área de trabéculas ósseas e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos foram quantificadas nos espécimes dos tempos experimentais de sete, 14 e 30 dias (Apêndices Q ao S). Desta forma, demonstra-se os resultados com base na leitura de duas lâminas de cada espécime, sendo uma do espectral A e outra do espectral B, quando possível. Após o cálculo das médias dos campos e dos indivíduos, os dados foram inseridos no programa Bioestat 3.0® para análise estatística. As médias de cada parâmetro foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis dentro de cada período experimental. Nos casos onde foram observadas diferenças, os dados foram tratados estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney conforme tabela 2. Na sequência, os dados foram inseridos em gráficos para avaliação e interpretação dos resultados (Gráficos 2 a 4).

Tabela 2 - Valores de "p" obtidos pelo teste de Mann-Whitney dos parâmetros porcentagem de área de trabéculas ósseas (T), osteoclastos (C) e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos (C/T)*100, para os tempos experimentais de sete, 14 e 30 dias - São Paulo - 2012

Comparações	Parâmetro avaliado e períodos experimentais								
	T			C			(C/T)*100		
	7 d	14 d	30 d	7 d	14 d	30 d	7 d	14 d	30 d
C x M1	0,0022		0,0022	0,0152	ns	0,0048	0,0064	ns	0,0049
C x M2	0,0022		0,0022	ns	ns	0,0049	0,0022	ns	0,005
C x M3	0,0022	ns	0,0022	0,0281	0,0039	0,0048	0,0022	0,0039	0,005
M1 x M2	ns		ns	0,0049	ns	ns	ns	ns	ns
M1 x M3	ns		ns	ns	0,0039	0,0115	ns	0,0065	ns
M2 x M3	ns		ns	0,0048	0,0039	ns	ns	0,025	ns

Estatisticamente significativo quando $p < 0,05$

d = dias

ns = não significativo

Fonte: Da Cunha (2012).

Porcentagem de área de trabéculas ósseas

Os espécimes do grupo controle apresentaram baixa formação inicial de trabéculas, sendo estatisticamente significante em relação aos grupos com polímeros. O grupo controle também demonstrou aumento progressivo na deposição de trabéculas aos 14 e 30 dias. Aos 14 dias, não houve diferença entre os grupos e, aos 30 dias, o grupo controle apresentou maior porcentagem de área de trabéculas, estatisticamente significativo, em relação aos grupos com polímeros. Entre os polímeros não houve diferença estatística e a deposição de trabéculas foi semelhante nos três períodos experimentais avaliados (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Representação da porcentagem de área de trabéculas ósseas para cada tratamento nos períodos experimentais de sete, 14 e 30 dias com média e desvio padrão - São Paulo - 2012

Fonte: Da Cunha (2012).

Número de osteoclastos

As lâminas dos exemplares dos grupos polímero (M1) e polímero com nano-HA (M3), demonstraram maior número de osteoclastos no período de sete dias em relação ao grupo controle e polímero com β -TCP (M2). Aos 14 dias, o grupo

polímero com nano-HA apresentou maior número de osteoclastos que os demais grupos e, entre os últimos, não houve diferença estatística.

Aos 30 dias, os grupos que receberam membranas exibiram maior número de osteoclastos que o controle. Ainda neste período, o grupo polímero com nano-HA (M3) foi estatisticamente superior ao grupo com polímero, em relação ao número de osteoclastos (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Número de osteoclastos para cada tratamento nos períodos experimentais de sete, 14 e 30 dias com média e desvio padrão - São Paulo - 2012

Fonte: Da Cunha (2012).

Porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos

Aos sete dias, a porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos foi estatisticamente maior no grupo controle em relação aos grupos que receberam polímeros. Aos 14 dias, o grupo polímero com nano-HA (M3) foi estatisticamente superior aos demais e, aos 30 dias, os grupos que receberam polímeros apresentaram maior porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos que o grupo controle. Entre os polímeros, não houve diferença estatística aos 30 dias (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos para cada tratamento nos períodos experimentais de sete, 14 e 30 dias com média e desvio padrão - São Paulo - 2012

Fonte: Da Cunha (2012).

Discussão

8 DISCUSSÃO

A metodologia e os resultados do presente trabalho serão discutidos em forma de tópicos com base em literatura pertinente.

8.1 Da metodologia

O estudo do processo de reparação de falhas ósseas, cirúrgicas ou patológicas vem de longa data sendo tema de pesquisas e, frequentemente, o modelo animal é indicado após análises *in vitro*. Várias espécies de animais foram estudadas como modelo experimental em reparo ósseo, entre eles, ratos, camundongos, cobaias, coelhos, cães e macacos. Nesta pesquisa, optamos pelo coelho por ser de fácil manejo e de porte maior que ratos, camundongos e cobaias, o que permite confecção de defeitos maiores a exemplo dos trabalhos realizados por Ignácio et al. (1997) e Shikinamia, Matsusueb e Nakamurac (2005). Desta forma, não observamos no presente estudo, dificuldades técnicas na produção do modelo de defeito ósseo, recobrimento dos defeitos com membranas e manejo geral dos pacientes, corroborando com as informações dos trabalhos de Shikinamia, Matsusueb e Nakamurac (2005) e Guo et al. (2010).

Os quatro coelhos que vieram a óbito nos primeiros cinco dias de pós-operatório, foram submetidos a exames necroscópicos, e a causa provável da morte foi timpanismo, por hipomotilidade cecal, comum em pós-operatórios e em resposta ao uso de doses elevadas de analgésicos opioides, que sabidamente causam hipomotilidade gastroentérica. Dois pacientes foram submetidos à eutanásia por fratura de tíbia no primeiro dia de pós-operatório. Apesar dos orifícios fragilizarem a tíbia, a causa possível da fratura foi a presença de orifícios muito craniais ao osso por erro de técnica cirúrgica durante o procedimento.

Estudos em modelos experimentais sustentam o uso de biomateriais em situações clínicas, contudo, muitos trabalhos são conduzidos em pacientes de rotina, como o de Ferrigno, Della Nina e Fantoni (2007), onde os autores avaliaram a consolidação óssea em fraturas de rádio e ulna em cães com adição de BMP e o trabalho de

Debusscher et al. (2009) que avaliou blocos de PLLA e β -TCP em artrodeses vertebrais em humanos. Todavia, a experimentação em animais de laboratório reveste-se de importância científica, haja vista a possibilidade de trabalhar com grande número de unidades experimentais e pela padronização da amostra. Pode-se citar como revés, a dificuldade de reproduzir situações clínicas reais, como hiporreatividade óssea. A exemplo dos estudos de Shikinamia, Matsusueb e Nakamurac (2005), Guo et al. (2010) e Cai et al. (2011), trabalhamos com amostragem estatisticamente significativa e padronizada, porém, nosso trabalho avaliou o processo de reparo de falhas ósseas não críticas em indivíduos normorreativos, o que não representa, em termos clínicos, a necessidade de utilização de materiais osteoindutores.

Vários sítios anatômicos podem ser usados para confecção de defeitos ósseos, quando há intenção de estudar o processo de reparo. A escolha da região fica na dependência do objetivo do estudo, assim, Zellin e Linde (1997) produziram defeitos em mandíbulas de ratos, Gomes et al. (2007) realizaram avaliação de reparo em defeitos palatais em cães, Zhang et al. (1999) estudaram o reparo em fêmures de coelhos e Cai et al. (2011) avaliaram a reparação de defeitos tibiais em coelhos. Nós optamos pela realização de dois defeitos não críticos, monocorticais, em região proximal de cada tíbia, reduzindo o risco de fraturas e possibilitando a obtenção de número maior de amostras. Os defeitos não críticos, estudados neste experimento, foram reparados mesmo sem tratamento. Desta forma, foi avaliado se o uso de biomaterial aceleraria o reparo, diferente de Cai et al. (2011) que utilizaram defeitos críticos em tíbias de coelhos para avaliar a degradação de compósitos a base de β -TCP.

A padronização das unidades experimentais quanto à raça, linhagem, sexo, peso e idade, assim como o manejo pré e pós-operatório nos alojamentos, diminuíram a variabilidade da amostra. O procedimento anestésico propiciou analgesia e relaxamento muscular adequados e permitiu a realização do ato cirúrgico sem intercorrências. Assim, foi possível a execução de técnica asséptica, produção de defeitos padronizados e recobrimento com as membranas poliméricas, onde características físicas das membranas facilitaram a implantação cirúrgica sob o perióstio. Esta padronização foi passível de confirmação durante a avaliação macroscópica dos espécimes e análise microscópica das lâminas. Durante os exames, foi possível observar defeito ósseo padronizado com áreas restritas de

desvitalização, membranas poliméricas entre o defeito e o periósteo e ausência de artefatos cirúrgicos. Zhang et al. (1999) e Jacques et al. (2004) ressaltaram a importância da padronização das amostras para obter resultados fidedignos e reduzir o número de variáveis cirúrgicas.

Ruedi e Bassett (1967) e Laurence et al. (2005) discutiram em seus trabalhos as características físicas dos materiais que podem auxiliar a implantação, como o colágeno bovino que é gelatinoso e facilita a aplicação em cavidades. No presente experimento, utilizou-se os aditivos β -TCP e nano-HA em blendas poliméricas a base de PLLA-co-PCL/PEG com objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e agregar potencial osteoindutor / osteocondutor, de comum acordo com observações encontradas nos trabalhos de Corden et al. (2000); Deng, Hao e Wang (2001); Hao et al. (2003) e Debusscher et al. (2009).

Sobre a apresentação física do polímero e com base em comparações com os trabalhos de Shikinamia, Matsusueb e Nakamurac (2005), Guo et al. (2010) e Cai et al. (2011), verificamos que, apesar da membrana ter cumprido com a função de isolar o defeito, ao extrapolarmos as possíveis indicações do biomaterial para a rotina clínica ortopédica em medicina veterinária, é possível que encontraremos problemas. A maioria dos casos onde existe indicação formal para osteoindução ou preenchimento de falhas ósseas, a apresentação física em forma de bloco, gel ou pó, parece-me mais apropriada que uma membrana. Os blocos sólidos, gel ou pó, podem facilitar a aplicação em não uniões, defeitos causados por ressecção óssea, alongamentos ósseos ou preenchimento de falhas em técnicas como TTA para tratamento de ruptura de ligamento cruzado. Outra vantagem é a possibilidade de acrescentar enxerto ósseo esponjoso autógeno nestas apresentações.

Os períodos experimentais de três, sete, 14 e 30 dias foram utilizados com objetivo de avaliar todas as fases do processo de reparo. Assim, no primeiro período, avaliou-se as condições do coágulo e infiltrado inflamatório; aos sete dias, as características do tecido de granulação e angiogênese; aos 14 dias, a formação do calo ósseo e ossificação endocondral e, aos 30 dias, o processo de remodelação, a exemplo da pesquisa realizada por Celeste et al. (2010) com polímero de mamona em ratos. Estas fases do reparo são sustentadas por Rozen et al. (2007) e Schindeler et al. (2008). Guo et al. (2010) avaliaram os tecidos 12 semanas após a implantação de hidrogel biodegradável acrescido de TGF- β 1 com objetivo de estudar o comportamento de células tronco mesenquimais em coelhos. Outros tempos

experimentais são citados na literatura como seis semanas para avaliar biocompatibilidade e comportamento mecânico de material epóxi com ou sem hidroxiapatita em coelhos (ZHANG et al., 1999) e 60 dias para avaliar o reparo de fístulas oronasais em cães tratados com osso bovino inorgânico liofilizado esponjoso em bloco (GOMES et al., 2007). Os tempos experimentais selecionados para avaliação, permitiram uma visão global do processo de reparo, mas, o período máximo de observação (30 dias), não foi suficiente para contemplar a fase final da remodelação nos grupos que receberam membranas poliméricas.

Para a análise histológica os espécimes foram descalcificados em EDTA a 8%, pH 7,4%, visando melhor preservação das células e outras estruturas. As lâminas foram coradas pela técnica de HE, sendo esta uma coloração de rotina e que evidencia bem as células, pois diferencia núcleo de citoplasma (GAMBLE, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Metodologia semelhante foi usada por Zellin e Linde (1997) e Li e Li (2005) para avaliação de reparo ósseo em ratos e coelhos, respectivamente. Também foi realizada a coloração pelo Tricrômico de Masson, que salienta as fibras colágenas e coloração de TRAP para contagem dos osteoclastos, o que permitiu avaliar as propriedades osteoindutivas dos biomateriais e o processo de reparo em função do período experimental.

A morfometria é a descrição quantitativa dos achados geométricos de estruturas de qualquer dimensão e a técnica possibilita a aferição de um ou mais parâmetros, sendo realizada por meio de *softwares* específicos. O nosso estudo valeu-se desta técnica para aferir área de calo ósseo, porcentagem de trabéculas ósseas, número de osteoclastos e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos, visando mensurar estas variáveis e estabelecer correlações entre elas e, assim, estudar a reparação tecidual (ANDREA; BLEGGI; ALVES, 2008). Optamos por aferir as variáveis de cinco campos em cada lâmina e seis lâminas de cada indivíduo para obter amostragem representativa do tecido que estava em processo de reparação, corroborando com Ohara et al. (1995).

8.2 Dos resultados

Os resultados do trabalho serão discutidos em três capítulos que contemplam a descrição macroscópica, descrição microscópica e morfometria.

8.2.1 Descrição macroscópica

Durante a avaliação macroscópica, além dos defeitos padronizados e membranas poliméricas intactas e não deslocadas, verificamos formação de tecido de consistência firme e dura entre a membrana e o periósteo nos espécimes dos períodos de 14 e 30 dias, característica não observada nos grupos controles. O evento pode indicar maior formação óssea adjacente ao biomaterial, pois os polímeros bioativos estimulam a neoformação óssea devido seu potencial osteoindutor e osteocondutor (DEBUSSCHER et al., 2009; OLIVEIRA, 2010; ROCHA, 2010; RAGETLY; GRIFFON, 2011).

8.2.2 Descrição microscópica

A análise microscópica revelou defeito ósseo com bordas homogêneas e áreas restritas de desvitalização óssea, ressaltando a importância do uso de velocidade controlada durante a perfuração e irrigação constante da broca com solução salina 0,9%, evitando, dessa forma, necrose térmica, como observado na metodologia de Zhang et al. (1999). As características morfológicas microscópicas do defeito ósseo produzido demonstraram que a técnica cirúrgica foi padronizada, fato que reduziu as variáveis no processo de reparo ósseo e consequentemente facilitou a avaliação dos resultados.

Não observamos reação inflamatória sustentada, sinais de toxicidade ou indícios mutagênicos nos quatro tempos experimentais, o que denota as boas propriedades de biocompatibilidade dos biomateriais que constituem os polímeros (BAUER; TORNKVIST; NILSSON, 1986; FDA, 2005; SZABO et al., 2005; ZHONGKUI et al.,

2005; RORIZ et al., 2006; NANDI et al., 2010). Estas particularidades, observadas no nosso estudo, são condições elementares para poder indicá-los em situações clínicas que exigem uso de biomaterial, pois Williams (1987), Callan (1993), Wolkmer (2006) e Szabo et al. (2005) citaram como características desejáveis dos biomateriais a biocompatibilidade, bioatividade, previsibilidade, facilidade de aplicação clínica e ausência de toxicidade. Contraditoriamente, o polímero de mamona, que foi motivo de várias pesquisas (IGNÁCIO et al., 1997; JACQUES et al., 2004), teve seu uso questionado por Celeste et al. (2010), que demonstraram reação inflamatória de moderada a intensa em experimentos com ratos e He et al. (2010), que citaram os efeitos tóxicos da ricina e ricinina em seus trabalhos.

No período experimental de sete dias todas as lâminas exibiram exuberante tecido de granulação, interposto com grande quantidade de vasos sanguíneos neoformados, sobretudo nos grupos com polímeros. A vascularização é crítica para formação da matriz óssea mineralizada, pois a tensão adequada de oxigênio no local da fratura é necessária para diferenciação de osteoblastos e o processo de reparo ósseo como um todo (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; PENG et al., 2005; FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006; ROZEN et al., 2007). Observando os trabalhos de Peng et al. (2005), Ferrigno, Della Nina e Fantoni (2007) e Rozen et al. 2007, é possível extrapolar nossos resultados para situações da rotina ortopédica de cães e gatos, no que tange a não uniões. São frequentes não uniões em região distal de tíbia e rádio e ulna, sobretudo em cães de pequeno porte, onde a cobertura muscular e a vascularização são pobres, denotando a importância do aporte sanguíneo para o reparo ósseo. A verificação de angiogênese de moderada a intensa nos grupos que receberam polímeros, aos sete e 14 dias, pode ser alentador para uso em não uniões com comprometimento vascular.

Aos sete e 14 dias, no grupo controle, verificou-se áreas focais de matriz óssea e cartilaginosa com osteoclastos na região de matriz osteoide, indicando que o processo de reparo estava ocorrendo conforme o esperado em situações sem tratamento (RUMI et al., 2005; ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008; RAGGATT, 2010; ROSENBERG, 2010). Comparado ao controle, as lâminas dos espécimes que receberam polímeros apresentaram maior quantidade de matriz óssea e cartilaginosa, com osteoclastos entremeados, tanto na análise microscópica quanto na semiquantitativa. Entendemos que, neste período, os biomateriais exibiram potencial osteoindutor com estímulo apropriado da remodelação, pois

osteoclastos foram observados em grande quantidade. Entre os polímeros, a matriz cartilaginosa formou-se em maior quantidade nos indivíduos que receberam polímero e nano-HA. Estes achados podem estar relacionados à característica bioativa dos polímeros, citada na literatura (CALLAN, 1993; SZABO et al., 2005; FARDIN et al., 2010; DINARVAND et al., 2011; RAGETLY; GRIFFON, 2011).

No período experimental de 14 dias, todos os grupos revelaram grande quantidade de osteoclastos com diminuição aos 30 dias, sugerindo que o processo de remodelação foi mais intenso aos 14 dias. Aos 30 dias, o processo de remodelação estava praticamente completo no grupo controle e em atividade moderada nos grupos que receberam membranas poliméricas. De forma geral, independente do grupo, o reparo seguiu um processo semelhante ao que ocorre em situações onde não há interferência terapêutica, eventos estes descritos por Marks e Odgren (2002), Rozen et al. (2007) e Schindeler et al. (2008). A particularidade deste experimento, ao serem estudados indivíduos normorreativos, pode explicar o fato dos animais do grupo controle exibirem reparo em fases com tempos considerados normais; no entanto, os que receberam biomateriais demonstraram formação excessiva de calo ósseo e remodelação mais lenta. Boyle, Simonet e Lacey (2003) e Schindeler et al. (2008) afirmaram que a remodelação continuará ocorrendo enquanto houver deposição de tecido ósseo. É pertinente supor efeitos osteoindutores em indivíduos hiporreativos, contudo, estudos em pacientes com reparo ósseo lento, são necessários para sustentar o uso clínico.

Aos 14 dias a ossificação endocondral foi mais nítida nos grupos que receberam polímeros, principalmente nos espécimes que receberam polímero com β -TCP e polímero com nano-HA. Nestas lâminas, apesar da grande quantidade de matriz cartilaginosa, visualizava-se recente substituição da cartilagem por trabéculas ósseas. Os polímeros, destacadamente os acrescidos de β -TCP ou nano-HA, parecem estimular a neoformação óssea e acelerar o reparo (BECKER; BECKER, 1990; SHAPIRO, 2008; ZHOU; LEE, 2011). Com base na literatura consultada, sabe-se que a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos é acompanhada da síntese da matriz extracelular e proteínas ósseas, até a mineralização da matriz. O TGF- β 1 está envolvido em toda fase do processo osteogênico e seus níveis teciduais são diretamente proporcionais à formação óssea (DUCY; SCHINKE; KARSENTY, 2000; HOFBAUER; SCHOPPET, 2004; ROZEN et al., 2007). A proliferação e diferenciação dos fibroblastos e condrócitos são

estimuladas e coordenadas por fatores de crescimento, incluindo TGF- β 2 e β 3, fatores de crescimento de fibroblastos (FGF-1) e fator de crescimento *insulin-like* (IGF). Em resposta a estes fatores, condrócitos são capazes de gerar proteínas da matriz extracelular, particularmente colágeno tipo II ou colágeno tipo X para hipertrofia de condrócitos (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008; PAPE et al., 2010; RAGGATT, 2010). Não foi objetivo do trabalho elucidar os mecanismos osteoindutores dos polímeros usados, mas, com base na literatura consultada, é pertinente supor que a osteoindução está relacionada aos eventos supracitados.

Aos 30 dias, nos grupos com polímeros, observamos calo ósseo em pleno estágio de remodelação, com número elevado de osteoclastos em lacunas de *Howship*. Isto indica osteoclastos ativos e grande quantidade de osso esponjoso, pois a deposição óssea aumentada exige manutenção do processo de remodelação (HOFBAUER; SCHOPPET, 2004; MARTIN; GOOI; SIMS, 2009; KOBAYASHI; UDAGAWA; TAKAHASHI, 2009; NAKAHAMA, 2010). O fato permite supor provável remodelação completa em função de um período superior ao observado no experimento, contudo, o período máximo de observação foi 30 dias, reforçando a necessidade de estudos com período de observação mais longo, face a necessidade de observar o remodelamento e absorção da membrana. No grupo controle, aos 30 dias, o calo ósseo estava praticamente remodelado.

Aos sete, 14 e 30 dias, no grupo controle, a matriz óssea formou-se no interior do defeito e, nos grupos membranas, no interior do defeito e também em grande quantidade na superfície do orifício e no periósteo. A presença da membrana significou uma barreira que isolou o periósteo do defeito ósseo e que acarretou na formação de grande quantidade de matriz óssea e cartilaginosa na região acima da membrana, diferente do controle, em que esta resposta foi mais homogênea e localizada. Estes resultados indicam a estimulação da formação óssea pelos polímeros acrescidos ou não de β -TCP ou nano-HA. O potencial osteoindutor / osteocondutor destes polímeros foi discutido por vários autores referenciados (BIOMATERIAIS, [200-?]; HASSNA; RAMAY; ZHANG et al., 2004; ROSANNA; VITTORIO; SANTI, 2004; SANG-HOON, 2004; DECLERCQ et al., 2005; DINARVAND et al., 2011), sendo a formação óssea, mediante osteoindução e osteocondução, dependente do recrutamento de precursores mesenquimais que sofrem diversas fases proliferativas antes da diferenciação em um fenótipo que

suporta a deposição de matriz e sua mineralização (DINARVAND et al., 2011; RAGETLY; GRIFFON, 2011).

Ao se referir a formação de calo ósseo exclusivamente dentro do defeito, os exemplares do grupo controle mostraram maior e melhor formação óssea, com trabéculas coesas e mais homogêneas que os espécimes dos grupos com polímeros. Como discutido anteriormente, em termos de apresentação física do polímero, é provável que um biomaterial em forma de pó ou gel, facilitaria a osteoindução dentro do defeito e não isolaria o periósteo desta área, já que o periósteo é uma fonte rica de células osteoprogenitoras (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008). Em um primeiro momento, a membrana isolaria o defeito e impediria a penetração de fibroblastos, que poderia alterar os fatores indutores de diferenciação celular, reduzindo a proliferação de células ósseas (BECKER; BECKER, 1990; DAHLIN; GOTTLOW; LINDE, 1990), contudo, os exemplares do grupo controle não exibiram reparo ósseo retardado.

Os compostos biodegradáveis, como o fosfato tricálcico, são solubilizados ou fagocitados pelo organismo após certo período de contato com o tecido. Estas características são muito importantes em aplicações clínicas em função de serem desnecessárias novas intervenções cirúrgicas para a retirada do material implantado (WARRER et al., 1992; HENCH; WILSON, 1993; WEILER et al., 2000; BARBANTI; ZAVAGLIA, 2005; DEBUSSCHER et al., 2009). Mei (2006) e Oréfice (2006) explicaram que a biodegradação é o processo natural pelo qual produtos químicos orgânicos são convertidos em compostos mais simples e redistribuídos através de ciclos elementares, tais como o do carbono, do nitrogênio e do enxofre. O PLLA-co-PCL é um polímero biodegradável (MEI, 2006; ORÉFICE, 2006; PEREIRA; BUONO, ZAVAGLIA, 2006; PEREIRA; VASCONCELOS; ZAVAGLIA, 2006) e Hao et al. (2003) citaram que é possível programar o tempo de reabsorção em combinações de biomateriais. Contudo, em todos os grupos com polímeros, as membranas não foram completamente absorvidas até os 30 dias de observação, constituindo em um espaço entre o defeito e o calo ósseo sob o periósteo. A velocidade de dissolução do β -TCP é de três a 12 vezes mais rápida do que para HA. Um implante ósseo constituído de HA permanecerá mesmo depois de três a quatro anos de implantação; o β -TCP, por outro lado, sendo reabsorvível, desaparecerá parcialmente em períodos de seis a 15 semanas dependendo da estequiometria, tamanho de partícula e porosidade (BAUER; TORNKVIST; NILSSON, 1986; FDA,

2005; RORIZ et al., 2006; NANDI et al., 2010). Assim, como havia presença destes materiais nas membranas poliméricas, a absorção não se completou até o período de 30 dias de observação. O espaço ocupado pela membrana pode constituir um ponto de fragilidade mecânica. Além disso, o calo, como citado antes, não estava completamente remodelado. O calo ósseo remodelado possui propriedades mecânicas superiores por unidade de área em comparação ao osso não totalmente remodelado, mas um calo maior pode fornecer mecânica similar (DENISSEN; DE GROOT, 1979; PAUL et al., 1992; SCHINDELER et al., 2008). Em estudo mecânico com fraturas de fêmures em ratos, observou-se que o calo ósseo desorganizado e mais volumoso foi superior ao calo remodelado em ensaios de flexão de três pontos (LI et al., 1999).

8.2.3 Morfometria

A área de neoformação óssea, aferida no interior e ao lado do defeito, foi maior nos grupos que receberam polímeros em relação ao controle aos 14 e 30 dias de observação. Os biomateriais poliméricos usados no experimento, por possuírem propriedades bioativas incluindo osteoindução, osteocondução e sinalização celular (MENEZES; FREITAS; GONÇALVES, 2009; OLIVEIRA, 2010; ROCHA, 2010; DINARVAND et al., 2011) estimularam maior formação de calo ósseo. Isoladamente os polímeros PLLA, PCL e PEG e as cerâmicas β -TCP e nano-HA não possuem propriedades osteoindutoras (SHIKINAMIA; MATSUSUEB; NAKAMURAC, 2005), todavia, a utilização de blendas poliméricas a base de destes compostos, têm demonstrado bom desempenho na obtenção de membranas para regeneração óssea guiada, podendo sugerir sinergismo entre os materiais, inclusive com melhora nas propriedades mecânicas, fato observado em nosso estudo.

É provável que o efeito sinérgico observado no experimento, deva-se a capacidade das membranas compósitas (PLLA-co-PCL/PEG/cerâmica) associarem as propriedades do PLLA (biocompatibilidade, reabsorção e resistência mecânica) à do PEG (hidrofilicidade) e à da cerâmica (osteocondução). A combinação existente nessas membranas propicia afinidade ao fluido biológico e propriedades bioativas

(HASSNA; RAMAY; ZHANG et al., 2004; ROSANNA; VITTORIO; SANTI, 2004; SANG-HOON, 2004; DECLERCQ et al., 2005; DEBUSSCHER et al., 2009).

A aceleração da formação óssea é requerida em diversas situações onde o reparo ósseo está prejudicado, incluindo não uniões, artrodeses ou fusão espinhal e em preenchimento de defeitos após fratura, osteotomia, ostectomia ou ressecção tumoral (WARRER et al., 1991; EL-WARRAK et al., 2004; JUNG et al., 2005; RAGETLY; GRIFFON, 2011). Debusscher et al. (2009) utilizaram PLLA associado ao β -TCP em artrodese cervical em humanos e observaram resultados semelhantes às técnicas convencionais que usam enxerto de asa ilíaca, porém com menor morbidade. Ao avaliar o conjunto das características dos polímeros, expressos através dos resultados obtidos em nosso estudo, tais como ausência de toxicidade e estímulo da osteoneogênese, é pertinente recomendar seu uso em situações com baixa atividade osteogênica, porém, a absorção incompleta e apresentação física do polímero pode ser um fator limitante, carente de estudos adicionais.

Aos 30 dias, não houve diferença na formação óssea entre os grupos que receberam polímeros, contudo, no tempo experimental de 14 dias, os resultados mostraram maior formação óssea no grupo polímero com nano-HA em relação ao grupo polímero com β -TCP. Esta diferença pode indicar potencial sinérgico superior do grupo com nano-HA em relação ao grupo com β -TCP (HASSNA; RAMAY; ZHANG, 2004; ROSANNA; VITTORIO; SANTI, 2004; SANG-HOON, 2004; DECLERCQ et al., 2005; SHIRANE et al., 2010; DINARVAND et al., 2011).

Aos 14 dias, a presença de cartilagem foi mais frequente nos pacientes que receberam polímeros, pois levando em consideração que houve maior deposição óssea nestes indivíduos, espera-se também remodelação mais tardia, como sugerem as observações dos trabalhos de Martin, Gooi e Sims (2009) e Nakahama (2010).

A porcentagem de trabéculas ósseas no calo ósseo foi menor no grupo controle em relação aos grupos que receberam membranas poliméricas aos sete dias; entretanto, aos 14 dias, não houve diferença e, aos 30 dias, a porcentagem de trabéculas no grupo controle foi superior aos demais. A medida que a matriz óssea foi sendo depositada, o calo foi sendo remodelado e as trabéculas passaram a apresentar maior coalescência (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008). Como a deposição óssea foi maior nos grupos com membranas poliméricas, o reparo aconteceu mais tardiamente, assim, apesar do grupo controle exibir calo de

menor tamanho, a remodelação foi quase completa aos 30 dias e as lâminas exibiram alta porcentagem de trabéculas, observado tanto na análise microscópica quanto morfológica. Estes resultados devem ser interpretados com cautela, pois, do ponto de vista funcional e estrutural, um calo ósseo remodelado é superior ao calo em remodelamento. Contudo, clinicamente, há várias situações onde o estímulo da osteoindução é desejável, independente da remodelação mais tardia, como são os casos de não uniões e defeitos ósseos críticos.

A presença de osteoclastos indica processo ativo de reparação óssea (RAISZ; RODAN, 1998; TEITELBAUM, 2000; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ROSENBERG, 2010). Desta forma, ao avaliar a quantidade de osteoclastos presentes em cada período experimental, é possível estimar o grau de remodelamento do tecido, assim como comparar com a porcentagem de trabéculas ósseas formadas, pois enquanto houver deposição de matriz óssea, a presença de osteoclastos ativos e remodelamento são esperados (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; KOBAYASHI; UDAGAWA; TAKAHASHI, 2009; NAKAHAMA, 2010).

As lâminas dos exemplares dos grupos polímero e polímero com nano-HA demonstraram maior número de osteoclastos no período de sete dias em relação ao grupo controle e polímero com β -TCP, mas aos 14 dias, o elevado número de osteoclastos permaneceu apenas nos exemplares do grupo com nano-HA, sugerindo que este biomaterial tem maior poder de osteoclastogênese que os demais, nesta fase. A osteoclastogênese pode ser induzida naturalmente pela apoptose dos osteócitos, quer por microlesões ósseas, ou por outras alterações que sinalizam para as células de superfície aumentando produção de RANKL pelos osteoblastos culminando com a geração de osteoclastos. Com base nos resultados histológicos do nosso estudo, o polímero com nano-HA apresentou melhores propriedades osteoindutoras e de remodelação em relação aos demais grupos e em função da variável aferida e do período experimental. Desta forma, dentre os polímeros, parece ser o mais promissor, haja vista que a indução da formação óssea precisa de estímulo apropriado para remodelação (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; HENRIKSEN et al., 2009; KOBAYASHI; UDAGAWA; TAKAHASHI, 2009). A sobrevivência do osteoclasto é de aproximadamente três a quatro semanas sendo que provavelmente morre por apoptose (HUGHES et al., 1995). Como tempo máximo de observação foi de 30 dias, não foi possível fazer observações referentes a sobrevivência dos osteoclastos.

Aos 30 dias, a presença de poucos osteoclastos e calo ósseo com trabéculas coesas no grupo controle, indicaram final do processo de remodelamento (HENRIKSEN et al., 2009). A maior porcentagem de trabéculas com osteoclastos no grupo controle em relação aos que receberam membranas poliméricas aos sete dias, podem sinalizar remodelamento fisiológico (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008), fato que foi comprovado aos 30 dias de observação, pela alta porcentagem de trabéculas e baixo número de osteoclastos, pois o remodelamento já estava praticamente completo.

Aos 14 dias, o grupo polímero com nano-HA apresentou maior porcentagem de trabéculas óssea com osteoclastos que os demais, achado condizente com o maior número de osteoclastos neste período. Aos 30 dias, há um equilíbrio entre os grupos que receberam membrana, porém, todos apresentaram maior porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos que o grupo controle, indicando atividade osteoclástica e remodelamento, em decorrência de que neste período ainda foi observado calo ósseo volumoso. Martin, Gooi e Sims (2009) citaram que durante a reparação das fraturas, existe equilíbrio entre o processo anabólico (formador de osso) e catabólico (reabsorção óssea). Schindeler et al. (2008) especularam que a velocidade de reparo da fratura pode ser determinada por processos não-específicos anabólicos e catabólicos.

Em nosso estudo, as membranas poliméricas, sobretudo a que continha nano-HA, mostraram maior formação óssea acompanhada de simultâneo estímulo apropriado da remodelação. Foram observados aumento proporcional no número de osteoclastos e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos nestes indivíduos. Os gráficos das variáveis antes elencadas mostraram que o padrão de aumento foi semelhante ao fisiológico, embora exacerbado. Não evidenciamos reações do tipo corpo estranho, sinais de toxidades ou atividades mutagênicas nos períodos avaliados. Assim, com base nos trabalhos de Bauer, Tornkvist e Nilsson (1986), FDA (2005), Szabo et al. (2005), Zhongkui et al. (2005), Roriz et al. (2006) e Nandi et al. (2010), podemos recomendar seu uso em situações clínicas onde se constate ou se espere reparo ósseo atenuado, como não uniões, falhas ósseas, ostectomias, artrodeses e deficiências metabólicas que resultam em consolidação óssea retardada (RAGETLY; GRIFFON, 2011).

8.3 Considerações finais

A exemplo deste experimento, várias pesquisas foram realizadas no intuito de desenvolver e avaliar materiais com propriedades osteoindutoras / osteocondutoras (OHARA et al., 1995; SERVICE, 2000; ROETHER et al., 2002; SAKATA; RINCON; DUEK, 2004; TEMENOFF et al., 2004; DENG et al.; 2005; FEINBERG; AGHALOO; CUNNINGHAM JR., 2005; ZHANG et al., 2005; SANGINÁRIO et al., 2006; MENEZES; FREITAS; GONÇALVES, 2009) e biomateriais semelhantes para as situações supracitadas ou indivíduos hiporreativos são motivo de avaliações clínicas e vários trabalhos demonstraram bons resultados (BOYNE, 1969; CASTNER; RATNER, 2002; KRUYT et al., 2006; DEBUSSCHER et al., 2009). Contudo, as pesquisas e nossos resultados mostram que ainda não existe um biomaterial considerado ideal.

A avaliação global dos resultados, tendo em vista a aplicabilidade clínica dos polímeros, traz a necessidade de estudos adicionais que complementem os resultados expressos neste estudo. A avaliação de outras apresentações físicas do biomaterial, estudo da absorção completa dos polímeros e testes mecânicos podem trazer informações valiosas no campo da ciência dos biomateriais.

Também é necessário reacender estudos no que concerne o uso de biomateriais, com tempo de absorção programada, como carreadores de substâncias com propriedades antibióticas, anti-inflamatórias ou morfogenéticas, que seguramente constituirão em importante ferramenta para uso em pacientes hiporreativos ou imunocomprometidos, onde a ação local destas substâncias promove efeitos sistêmicos colaterais mínimos corroborando com informações de Dahlin, Gottlow e Linde (1990), Sculean et al. (1999), Kinane (2000), Wikesjo et al. (2004), Sikavitsas et al. (2005), Sipos et al. (2005) e Koort et al. (2008).

Conclusões

9 CONCLUSÕES

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

- os biomateriais testados não demonstraram toxicidade em avaliações clínicas, macroscópicas e microscópicas;
- as membranas não são completamente absorvidas até os 30 dias de observação, constituindo em um espaço entre o defeito e o periósteo;
- os biomateriais testados apresentam potencial osteoindutor e osteocondutor, pois houve maior formação de calo ósseo nos indivíduos dos grupos que receberam polímeros em relação ao controle nos períodos de 14 e 30 dias, acompanhado de estímulo apropriado da remodelação;
- no grupo controle houve remodelação óssea mais fisiológica em relação aos grupos que receberam polímeros em função do período experimental;
- o grupo polímero com nano-HA apresenta maior potencial estimulador de remodelação que os demais polímeros.

Referências

REFERÊNCIAS

ANDREA, C. E.; BLEGGI, L. F.; ALVES, M. T. S. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 1, p. 51-57, 2008.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BAUER, H. C.; TORNKVIST, H.; NILSSON, O. S. Effects of bisphosphonates on the incorporation of calcium-45 and 3H-proline in orthotopic and in demineralized matrix-induced bone in rats. **Bone**, v. 7, n. 2, p. 129-135, 1986.

BECKER, W.; BECKER, B. Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences. Surgical techniques and case reports. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 10, p. 377-391, 1990.

BIOMATERIAIS, [200-?] Disponível em:
<<http://www.biomateriais.com.br/telas/default/>>. Acesso em: 30 abr. 2011.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, p. 337-342, 2003.

BOYNE, P. Restoration of osseous defects in maxillofacial casualites. **The Journal of the American Dental Association**, v. 78, p. 767-776, 1969.

CAI, Z.; ZHANG, T.; DI, L.; XU, D. M.; XU, D. H.; YANG, D. A. Morphological and histological analysis on the in vivo degradation of poly (propylene fumarate)/(calcium sulfate/ β -tricalcium phosphate). **Biomedical microdevices Online**, 2011. Doi: 10.1007/s10544-011-9532-8. Disponível em:
<<http://www.springerlink.com/content/nm16165512074471/fulltext.pdf>>. Acesso em: 12 abr 2011.

CALLAN, D. Guided tissue regeneration without a stage 2 surgical procedure. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 13, n. 2, p. 172-179, 1993.

CASTNER, D. G.; RATNER, B. D. Biomedical surface science: Foundations to Frontiers. **Surface Science**, v. 500, n. 1-3, p. 28-60, 2002.

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

CORDEN, I. A.; JONES, C. D.; RUDD, P. CHRISTIAN, S. Physical and biocompatibility properties of poly-e-caprolactone produced using in situ polymerization: a novel manufacturing technique for long-fibre composite materials. **Biomaterials**, v. 21, p. 713-724, 2000.

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

DAHLIN, C.; GOTTLow, J.; LINDE, A. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand**, v. 24, p. 13-19, 1990.

DEBUSSCHER, F.; AUNOBLE, S.; ALSAWAD, Y.; CLEMENT, D.; LE HUEC, J. C. Anterior cervical fusion with a bio-resorbable composite cage (beta TCP-PLLA): clinical and radiological results from a prospective study on 20 patients. **European Spine Journal**, v. 18, p. 1314–1320, 2009.

DECLERCQ, H. A.; VERBEECK, R. M.; DE RIDDER, L. I.; SCHACHT, E. H.; CORNELISSEN, M. J. Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. **Biomaterials**, v. 26, p. 4964-4974, 2005.

DENG, M.; SHI, J.; SMITH, A. J.; JIN; Y. Effects of transforming growth factor beta1 (TGFbeta-1) and dentin non-collagenous proteins (DNCP) on human embryonic ectomesenchymal cells in a three-dimensional culture system. **Archives of Oral Biology**, v. 50, n. 11, p. 937-945, 2005.

DENG, X.; HAO, J.; WANG, C. Preparation and mechanical properties of nanocomposites of poly(D,L-lactide) with Ca-deficient hydroxyapatite nanocrystals, **Biomaterials**, v. 22, p. 2867-2873, 2001.

DENISSEN, H.; DE GROOT, K. Immediate dental root implants from synthetic dense calcium hidroxyapatite. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 42, n. 5, p. 551-556. 1979.

DINARVAND, P.; SEYEDJAFARI, E.; SHAFIEE, A.; JANDAGHI, A. B.; DOOSTMOHAMMADI, A.; FATHI, M. H.; FARHADIAN, S.; SOLEIMANI, M. New Approach to Bone Tissue Engineering: Simultaneous Application of Hydroxyapatite and Bioactive Glass Coated on a Poly(L-lactic acid) Scaffold. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 3, p. 4518–4524, 2011.

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

EL-WARRAK, A. O.; OLMSTEAD, M.; APELT, D.; DEISS, F.; NOETZLI, H.; ZLINSKY, K.; HILBE, M.; BERTSCHAR-WOLFSBERGER, R.; JOHNSON, A. L.; AUER, J.; RECHENBERG, B. V. An Animal Model for Interface Tissue Formation in Cemented Hip Replacements. **Veterinary Surgery**, v. 33. p. 495–504, 2004.

FARDIN, A. C.; JARDIM, E. C. G.; PEREIRA, F. C.; GUSKUMA, M. H.; ARANEGA, A. M.; GARCIA JÚNIOR, I. R. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. **Innovations Implant Journal: Biomaterials and Esthetics**. São Paulo, v. 5, n. 3, p. 48-52, 2010.

FEINBERG, S. E.; AGHALOO, T. L.; CUNNINGHAM JR., L. L. Role of tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction: findings of the 2005 AAOMS. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 10, p.1418-1425, 2005.

FERRIGNO, C. R. A.; DELLA NINA, M. I.; FANTONI, D. T. Osteossínteses com placas associadas a enxertos de proteína morfogenética óssea (Gen-Tech®) em fraturas distais de rádio-ulna em cães com menos de 6 quilos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 65-69, 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, HHS, Dental devices; reclassification of tricalcium phosphate granules and classification of other bone grafting material for dental bone repair. **Final rule. Fed Regist**, v. 70, n. 81, p. 21947-21950, 2005.

FRANZ-ODENDAAL, T. A.; HALL, B. K.; WITTEN, P. E. Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes. **Developmental Dynamics**, v. 235, p.176-190, 2006.

GAMBLE, M. The hematoxylin and eosin. In: BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. Churchill Livingstone: Elsevier, 2008. 6. ed. Cap. 9, p. 121-134.

GOMES, K.; PIPPI, N. L.; BRAGA, F. V. A.; KROLIKOWISKI, G.; SOARES, A. V.; PIGATTO, G. M. Osso bovino esponjoso inorgânico liofilizado em bloco no reparo de fístula oronasal induzida em cães. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 159-164, 2007.

GUO, X.; PARK, H.; YOUNG, S.; KRETLOW, J. D.; VAN DEN BEUCKEN, J. J.; BAGGETT, L. S.; TABATA, Y.; KASPER, F. K.; MIKOS, A. G.; JANSEN, J. A. Repair of osteochondral defects with biodegradable hydrogel composites encapsulating marrow mesenchymal stem cells in a rabbit model. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 1, p. 39-47, 2010.

HAO, J.; LIU, Y.; ZHOU, S.; LI, Z.; DENG, X. Investigation of nanocomposites based on semi-interpenetrating network of [l-poly (e-caprolactone)]/[net-poly (e-caprolactone)] and hydroxyapatite nanocrystals. **Biomaterials**, v. 24, p. 1531–1539, 2003.

HASSNA, R. R.; RAMAY, M.; ZHANG, J. Biphase calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 25, p. 5171–5180, 2004.

HE, X.; MACMAHON, S.; HENDERSON II, T. D.; GRIFFEY, S. M.; CHENG, L. W. Ricin Toxicokinetics and Its Sensitive Detection in Mouse Sera or Feces Using Immuno-PCR. **Plos One**, v. 5, n. 9, p. 1-8, 2010.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **An introduction to bioceramics**. Singapore: World Scientific Publishing Company CO, 1993, p. 181-198.

HENRIKSEN, K.; NEUTZSKY-WULFF, A. V.; BONEWALD, L. F, KARSDAL, M. A. Local communication on and within bone controls bone remodeling - Review. **Bone**, v. 44, p. 1026–1033, 2009.

HOFBAUER, L. C.; SCHOPPET, M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. **Journal American Medical Association**, v. 292, n. 4, p. 490-495, 2004.

HUGHES, D. E.; WRIGHT, K. R.; UY, H. L.; SASAKI, A.; YONEDA, T.; ROODMAN, G. D.; MUNDY, G. R.; BOYCE, B. F. Biophosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. **Journal of Bone and Mineral Research**., v. 10, p. 1478-1487, 1995.

IGNÁCIO, H.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; CHIERICI, G. Uso da poliuretana derivada do óleo de mamona para preencher defeitos ósseos diafisários segmentares do rádio - Estudo experimental em coelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 32, n. 10, p. 815-821, 1997.

JACQUES, J. W.; FAGUNDES, D. J.; FIGUEIREDO, A. S.; INOUE, C. M.; SCAPULATEMPO, R. P.; SASSIOTO, M. C. P. O papel da poliuretana de mamona como substituto do enxerto ósseo autógeno em coelhos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 31, n. 4, p. 236-241, 2004.

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

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

KINANE, D. F. Local antimicrobial therapies in periodontal disease. **Annals of the Royal Australasian College of Dental Surgeons**, v. 15, p. 57-60, 2000.

KOBAYASHI, Y.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N. Action of RANKL and OPG for Osteoclastogenesis. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 19, n. 1, p. 61–72, 2009.

KOORT, J. K.; MAKINEN, T. J.; SUOKAS, E.; VEIRANTO, M.; JALAVA, J.; TORMALA, P.; ARO, H. T. Sustained release of ciprofloxacin from an osteoconductive poly(DL)-lactide implant . **Acta Orthopaedica**, v. 9, n. 2, p. 295–301, 2008.

KRUYT, M. C.; PERSSON, C.; JOHANSSON, G.; DHERT, W. J.; DE BRUIJN, J. D. Towards Injectable Cell-based Tissue-Engineered Bone: The Effect of Different Calcium Phosphate Microparticles and Pre-Culturing. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 2, p. 309-317, 2006.

LAURENCE, S.; BAREILLE, R.; BAQUEY, C.; FRICAIN, J. C. Development of a resorbable macroporous cellulosic material used as hemostatic in an osseous environment. **Journal Biomedical Materials Research**, v. 73, n. 4, p. 422-429, 2005.

LI, Z.; LI, Z. B. Repair of mandible defect with tissue engineering bone in rabbits. **Australia and New Zealand Journal Surgery**, v. 75, p. 1017-1021, 2005.

LI, J.; MORI, S.; KAJI, Y.; MASHIBA, T.; KAWANISHI, J.; NORIMATSU, H. Effect of bisphosphonate (incadronate) on fracture healing of long bones in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, p. 969-979, 1999.

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

MARTIN, T. J.; GOOI, J. H.; SIMS, N.A. Molecular Mechanisms in Coupling of Bone Formation to Resorption. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 19, n. 1, p. 73-88, 2009.

MEI, L. H. I. Polímeros biodegradáveis. In: ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais - fundamentos & aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. Cap 6, p. 177-184.

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

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

NANDI, S. K.; ROY, S.; MUKHERJEE, P.; KUNDU, B.; DE, D. K.; BASU, D. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. **Indian Journal Medicine Research**, v. 132, p. 15-30, 2010.

OHARA, G. H.; KOJIIMA, K. E.; ROSSI, J. C.; TELLES, M.; SOARES, T. V. C. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretana de mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 62-68, 1995.

OLIVEIRA, L. S. A. F.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. B.; ROSA, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras – Artigo de Revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, n. 9, p. 37-44, 2010. Supplement, 1.

ORÉFICE, R. L. Materiais poliméricos - ciência e aplicação como biomateriais. In: ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais - fundamentos & aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. Cap 4, p. 88-156.

PAUL, B.; MELLONING, J.; TOWLE, H.; GRAY, J. Use of a collagen barrier to enhance healing in human periodontal furcation defects. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 12, p.123-131, 1992.

PAPE, H. C.; MARCUCIO, R.; HUMPHREY, C.; COLNOT, C.; KNOBE, M.; HARVEY, E. J. Trauma-Induced Inflammation and Fracture Healing. **Journal Orthopedic Trauma**. v. 24, n. 9, p. 522-5259, 2010.

PENG, H.; USAS, A.; OLSHANSKI, A.; HO, A. M.; GEARHART, B.; COOPER, G. M.; HUARD, J.. VEGF Improves, Whereas sFlt1 Inhibits, BMP2-Induced Bone Formation and Bone Healing Through Modulation of Angiogenesis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 11, p. 2017-2027, 2005.

PEREIRA, M. M.; BUONO, V. T. L.; ZAVAGLIA, C. A. C. Materiais metálicos - ciência e aplicação como biomateriais. In: ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais - fundamentos & aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. Cap 2, p. 41-58.

PEREIRA, M. M.; VASCONCELOS, W.; ZAVAGLIA, C. A. C. Materiais cerâmicos - ciência e aplicação como biomateriais. In: ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais - fundamentos & aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. Cap 3, p. 59-86.

RAGETLY, G. R.; GRIFFON, D. J. The rationale behind novel bone grafting techniques in small animals. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 24, n. 1, p. 01-08, 2011.

RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103–25108, 2010.

RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. Embryology and cellular biology of bone. In: AVIOLI, L. V.; KRANE, S. M. **Metabolic bone disease**. 3. ed. San Diego, Academic Press, 1998. Cap. 1, p. 1-22.

ROCHA, M. N. **Estudo de revestimento de fosfato de cálcio em substratos de titânio denso e poroso**. 2010. 169 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Faculdade de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

ROETHER, J. A.; BOCCACCINE, A. R.; HENCH, L. L.; MAQUET, V.; GAUTIER, S.; JÉRÔME, R. Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 23, p. 3871-3878, 2002.

- RORIZ, V. M.; SOUZA, S. L.; TABA, M. PALIOTO, D. B. Treatment of Class III Furcation Defects With Expanded Polytetrafluoroethylene Membrane Associated or Not With Inorganic Bone Matrix/Synthetic Cell-Binding Peptide: A Histologic and Histomorphometric Study in Dogs. **Journal Periodontology**, v. 77, n. 3, p. 490-497, 2006.
- ROSANNA, D. T.; VITTORIO, B.; SANTI, S. Biocompatibility and integrin-mediated adhesion of human osteoblasts to poly(dl-lactide-co-glycolide) copolymers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 161-169, 2004.
- ROSENBERG, A. E. Bones, Joints, and Soft-Tissue Tumors. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Pathologic basis of disease**. 8. ed. Philadelphia: Saunders, 2010. Cap. 26, p. 1205-1256.
- ROZEN, N.; LEWINSON, D.; BICK, T.; MERETYK, S.; SOUDRY, M. Role of Bone Regeneration and Turnover Modulators in Control of Fracture. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 17, n. 3, p. 197-213, 2007.
- RUEDI, T.; BASSETT, C. Repair and remodeling in milipore-isolated defects in cortical bone. **Acta Anatomica**, v. 68, p. 509-531, 1967.
- RUMI, M. N.; DEOL, G. S.; SINGAPURI, K. P.; PELLEGRINI JR., V. D. The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, p. 34-40, 2005.
- SAKATA, M. M.; RINCON, M. C. A.; DUEK, E. A. R. Estudo da Interação Polímero/Cartilagem/Osso Utilizando Poli (Ácido Lático-co-Ácido Glicólico) e Poli (p-Dioxanona) em Côndilo Femural de Coelhos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n 3, p. 176-180, 2004.
- SANG-HOON, R. Bone-like apatite-forming ability and mechanical properties of poly(e-caprolactone)/silica hybrid as a function of poly(e-caprolactone) content. **Biomaterials**, v. 25, p. 1167-1175, 2004.
- SANGINÁRIO, V.; GINEBRA, M. P.; TANNER, K. E., PLANELL, J. A.; AMBROSIO, L. Biodegradable and semi-biodegradable composite hydrogels as bone substitutes: morphology and mechanical characterization. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, p. 447–454, 2006.
- SCHINDELER, A.; MCDONALD, M. M.; BOKKO, P.; LITTLE, D. G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, p. 459-466, 2008.
- SCULEAN, A.; DONOS, N.; BLAES, A.; LAUERMANN, M.; REICH, E.; BRECX, M. Comparison of enamel matrix proteins and bioabsorbable membranes in the treatment of intrabony periodontal defects. A split-mouth study. **Journal Periodontology**, v. 70, n. 3, p. 255-62, 1999.
- SERVICE, R. F. Tissue engineers build new bone. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1498-1500, 2000.

SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. **European Cells and Materials**, v. 15, p. 53-76, 2008.

SHIKINAMIA, Y.; MATSUSUEB, Y.; NAKAMURAC, T. The complete process of bioresorption and bone replacement using devices made of forged composites of raw hydroxyapatite particles/poly L-lactide (F-u-HA/PLLA). **Biomaterials**, v. 26, p. 5542–5551, 2005.

SHIRANE, H. Y.; ODA, D. Y.; PINHEIRO, T. C.; DA CUNHA, M. R. Implantes de biomateriais em falha óssea produzida na fíbula de ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 45, n. 5, p. 478-482, 2010.

SIKAVITSAS, V. I.; BANCROFT, G. N.; LEMOINE, J. J.; LIEBSCHNER, M. A.; DAUNER, M.; MIKOS, A. G. Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. **Annals of Biomedical Engineering** v. 33, n. 1, p. 63-70, 2005.

SIPOS, P. M.; LOOS, B. G.; ABBAS, F.; TIMMERMAN, M. F.; VAN DER VELDEN, U. The combined use of enamel matrix proteins and a tetracycline-coated expanded polytetrafluoroethylene barrier membrane in the treatment of intra-osseous defects. **Journal of Clinic Periodontology**, v. 32, n. 7, p. 765-772, 2005.

SZABO, G.; HUYS, L.; COULTHARD, P.; MAIORANA, C.; GARAGIOLA, U.; BARABÁS, J.; NÉMETH, Z.; HRABÁK, K.; SUBA, Z. A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic and histomorphometric evaluation. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 20, n. 3, p. 371-381, 2005.

TEMENOFF, J. S.; PARK, H.; JABBARI, E.; CONWAY, D. E.; SHEFFIELD, T. L.; AMBROSE, C. G.; MIKOS, A. G. Thermally Cross-Linked Oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) Hydrogels Support Osteogenic Differentiation of Encapsulated Marrow Stromal Cells In Vitro. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 5-10, 2004.

TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484, p.1504-1508, 2000.

WARRER, K.; GOTFREDSEN, K.; HJORTING-HANSEN, E.; KARRING, T. Guided tissue regeneration ensures osseointegration of dental implants placed into extraction sockets. An experimental study in monkeys. **Clinical Oral Implants Research**, v. 2, n. 4, p. 166-171, 1991.

WARRER, K.; KARRING, T.; NYMAN, S.; GOGOLEWSKI, S. Guided tissue regeneration using biodegradable membranes of polylactic acid or polyurethane, **Journal of Clinic Periodontology**, v. 19, n. 9, pt. 1, p. 633-640, 1992.

WEILER, A.; HOFFMANN, R. F. G.; STÄHELIN, A. C.; HELLING, H. J.; SÜDKAMP, N. P. Biodegradable Implants in Sports Medicine: The Biological Base. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 16, n. 3, p. 305–321, 2000.

WIKESJO, U. M.; QAHASH, M.; THOMSON, R. C.; COOK, A. D.; ROHRER, M. D.; WOZNEY, J. M.; HARDWICK, W. R. rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, n. 2, p.194-204. 2004.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in biomaterials**. Amsterdam: Elsevier, 1987.

WOLKMER, T.M. **Obtenção e caracterização de hidroxiapatita porosa pelo método gelasting de espumas para uso como implantes**. 2006. 139 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2006.

ZELLIN, G.; LINDE, A. Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 35, p. 181-190, 1997.

ZHANG, M.; LIU, L.; ZHOU, W.; CHENG, L.; GUO, X. D. Interfacial fabrication and property of hydroxyapatite/polylactide resorbable bone fixation composites. **Current Applied Physics**, v. 5, p. 516–518, 2005.

ZHANG, S.; REVELL, P. A.; EVANS, S. L.; TUKE, M. A.; GREGSON, P. J. In vivo biocompatibility and mechanical study of novel bone-bioactive materials for prosthetic implantation. **Journal of Biomedical Matererial Research**, v. 46, n. 2, p. 279-286, 1999.

ZHONGKUI, H.; PEIBIAO, Z.; CHAOLIANG, H.; XUEYU, L. Nano-composite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: Mechanical properties and biocompatibility. **Biomaterials**, v. 26, p. 6296–6304, 2005.

ZHOU, H.; LEE, J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2769-2781, 2011.

Apêndices

APÊNDICES

Apêndice A - Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm² dos espécimes do grupo controle no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011

Lâmina 14C16A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,43	6,98	6,5	5,26	5,95	5,92		
2	0	0	0	0	0	0		
3	0,99	1,3	0,79	0,93	1,15	1,01		
4	1,31	0,64	1,36	1,32	1,02	1,32		
5	0,66	0,56	0,73	1,12	1,4	1,23		
Total	9,39	9,48	9,38	8,63	9,52	9,48		
Média	1,88	1,90	1,88	1,73	1,90	1,90	11,18	1,86

Lâmina 14C20A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	4B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,55	5,22	7,41	6,87	6,13	7,03	7,21		
2	0	0	0	0	0	1,45	1,67		
3	0,82	1,17	0,67	0,31	1,3	0,41	1,03		
4	0,63	0,9	0,97	1,59	1,6	0,38	1,4		
5	1,53	1,66	0,43	0,67	1,69	0,97	1,75		
Total	9,53	8,95	9,48	9,44	10,72	10,24	13,06		
Média	1,91	1,79	1,90	1,89	2,14	2,05	2,61	14,28	2,04

Lâmina 14C22A e B	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	5,88	5,43	6,13	5,73	7,29	6,4	7,4		
2	0	0	0	0	0,26	0,75	0,62		
3	1,4	2,22	1,31	1,23	1	0,97	1,03		
4	1,43	0,96	0,8	1,25	0,82	0,96	1,01		
5	2,81	1,83	1,37	1,11	0,92	0,99	0,92		
Total	11,52	10,44	9,61	9,32	9,37	10,07	10,98		
Média	2,30	2,09	1,92	1,86	1,87	2,01	2,20	14,26	2,04

Lâmina 14C24A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	4B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	5,44	6,17	5,44	5,49	5,03	5,92	5,81		
2	0	0	0,69	1,33	0,75	0	1,73		
3	2,78	1,95	1,59	1,11	1,97	2,3	1,64		
4	1,51	1,09	1,55	2,1	1,37	1,35	1,81		
5	2,29	2,21	1,82	2,1	1,65	1,3	1,15		
Total	12,02	11,42	11,09	12,13	10,77	10,87	12,14		
Média	2,40	2,28	2,22	2,43	2,15	2,17	2,43	16,09	2,30

Lâmina 14C18A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	4B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	5,4	5,4	5,67	5,4	5,24	5,4	4,88		
2	1,8	1,75	1,36	1,23	1,65	1,8	1,51		
3	1,42	1,89	1,91	1,87	1,34	1,03	1,82		
4	1,62	1,24	0,68	1,67	1,81	1,39	1,46		
5	1,31	1,33	1,37	1,73	1,6	1,94	0,99		
Total	11,55	11,61	10,99	11,9	11,64	11,56	10,66		
Média	2,31	2,32	2,20	2,38	2,33	2,31	2,13	15,98	2,28

Lâmina 14C26A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B		Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO			
1	5,66	5,85	5,86	5,44	5,49	5,4			
2	0	0	0	2,8	0	1,57			
3	1,64	1,79	2,32	0,47	0,91	1,61			
4	2,6	1,41	2,31	1,99	1,78	1,02			
5	1,92	1,02	1,19	1,31	1,94	1,51			
Total	11,82	10,07	11,68	12,01	10,12	11,11			
Média	2,36	2,01	2,34	2,40	2,02	2,22		13,36	2,23

Apêndice B - Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm² dos espécimes do grupo M1 no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011

Lâmina 14M126A e B	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	4,72	5,87	6,57	5,63	5,05	4,89	4,26		
2	0	3,04	2,03	0	0	0	0		
3	6,68	4,44	4,63	5,85	5,93	5,95	5,96		
4	5,43	2,26	1,48	5,65	5,7	5,74	6,01		
5	6,04	5,31	5,57	5,45	5,66	5,83	5,85		
Total	22,87	20,92	20,28	22,58	22,34	22,41	22,08		
Média	4,57	4,18	4,06	4,52	4,47	4,48	4,42	30,70	4,39

Lâmina 14M124A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	4B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	5,78	6,09	5,25	6,83	7,5	7,4	5,92		
2	1,36	0,65	2,08	1,78	0,69	0	0		
3	5,1	3,97	4,5	1,84	2,71	3,02	5,31		
4	4,81	3,34	6,72	4,12	4,35	4,08	6,74		
5	6,63	4,85	6,06	2,27	3,65	3,67	4,73		
Total	23,68	18,9	24,61	16,84	18,9	18,17	22,7		
Média	4,74	3,78	4,92	3,37	3,78	3,63	4,54	28,76	4,11

Lâmina 14M120A	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	5,2	5,08	5,14	5,7	5,48	6,36	6,54		
2	0,53	0	0	0	0	0	0		
3	3,61	5,43	4,94	5,22	5,24	5,15	5,74		
4	3,71	5,5	5,38	5,08	5,67	4,62	5,8		
5	2,24	4,84	4,6	4,62	5,04	4,09	4,56		
Total	15,29	20,85	20,06	20,62	21,43	20,22	22,64		
Média	3,06	4,17	4,01	4,12	4,29	4,04	4,53	28,22	4,03

Lâmina 14M116 A e B							Total	Média
1A	2A	3A	1B	2B	3B			
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,62	6,65	6,92	7,4	7,45	7,4		
2	0	0	0	0,94	0,75	0,86		
3	4,95	4,88	5,78	5,49	5,11	4,26		
4	5,33	5,02	4,49	2,68	3,31	3,09		
5	5,14	5,42	4,92	5,59	4,17	3,5		
Total	22,04	21,97	22,11	22,10	20,79	19,11		
Média	4,41	4,39	4,42	4,42	4,16	3,82	25,62	4,27

Lâmina 14M122A e B									Total	Média
1A	2A	3A	4A	5A	6A	1B	2B			
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,55	6,98	6	7,42	7,47	6,61	4,89	4,56		
2	1,38	1,63	0	1,38	0,58	0		0		
3	4,65	3,54	4,58	6,45	5,94	3,59	5,97	6,82		
4	5,58	4,02	4,46	6,17	5,63	3,32	7,22	5,98		
5	4,61	4,82	5,37	5,83	6,16	4,86	6,68	7,07		
Total	22,77	20,99	20,41	27,25	25,78	18,38	24,76	24,43		
Média	4,55	4,20	4,08	5,45	5,16	3,68	4,95	4,89	36,95	4,62

Lâmina 14M118 A e B							Total	Média
1A	2A	3A	1B	2B	3B			
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,15	6,96	6,57	6,48	6,48	5,9		
2	2,52	2,64	2,38	0	2,61	1,86		
3	5,91	5,13	5,02	5,58	5,86	5,4		
4	5,03	5,13	5,09	5,19	5,7	5,4		
5	5,21	5,02	5,14	6,03	6,04	6,7		
Total	24,82	24,88	24,2	23,28	26,69	25,26		
Média	4,96	4,98	4,84	4,66	5,34	5,05	29,83	4,97

Apêndice C - Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm² dos espécimes do grupo M2 no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011

Lâmina 14M227A e B										
	1A	2A	3A	4A	5A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,81	5,7	7,24	5,9	5,88	7,01	6,3	5,27		
2	0,54	0	0	0	0	0	0	0		
3	3,7	4,8	3,53	4,51	4,09	3,85	3,92	4,24		
4	4,96	3,74	3,91	3,94	4,95	4,28	3,79	4,05		
5	4,35	4,86	4,02	4,13	4,13	5,18	5,41	5,2		
Total	20,36	19,1	18,7	18,48	19,05	20,32	19,42	18,76		
Média	4,07	3,82	3,74	3,70	3,81	4,06	3,88	3,75	30,84	3,85

Lâmina 14M217A e B									Total	Média
	1A	2A	3A	1B	2B	3B				
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO				
1	6,45	5,72	7	6,88	6,75	6,54				
2	1,83	1,76	0,93	2,82	2,46	2,54				
3	3,67	3,28	4,47	4,05	4,04	5,09				
4	4,62	5,05	5,13	4,36	4,86	4,09				
5	4,66	4,63	5,31	4,85	4,61	4,26				
Total	21,23	20,44	22,84	22,96	22,72	22,52				
Média	4,25	4,09	4,57	4,59	4,54	4,50			26,54	4,42

Lâmina 14M225A e B									Total	Média
	1A	2A	3A	1B	2B	3B				
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO				
1	6,6	6,08	7,3	6,56	6,19	6,53				
2	1,49	0,95	0	0	0,42	0				
3	3,16	3,73	6,35	5,38	5,79	6,19				
4	3,42	3,34	3,52	4,69	6,14	4,88				
5	2,44	2,73	3,75	4,79	3,48	6,4				
Total	17,11	16,83	20,92	21,42	22,02	24				
Média	3,42	3,37	4,18	4,28	4,40	4,80			24,46	4,08

Lâmina 14M221A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,89	6,04	5,71	5,13	5,99	6,18		
2	0	0	0	0	0	1,83		
3	4,07	6,19	6,73	3,86	6,05	3,18		
4	5,51	5,8	5,71	4,69	4,48	3,4		
5	2,93	4,31	4,13	5,8	7,03	5,11		
Total	19,4	22,34	22,28	19,48	23,55	19,7		
Média	3,88	4,468	4,456	3,896	4,71	3,94	25,35	4,23

Lâmina 14M223A e B	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	4B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	5,68	4,14	6,57	6,92	6,15	7,4	7,4	7,4		
2	0	0	0	3,81	0	1,9	4,4	4,07		
3	6,39	6,29	4,36	4,93	5,19	3,97	4,22	3,9		
4	5,86	5,57	3,87	3,9	4,93	3,88	3,75	3,34		
5	5,22	4,64	5,24	4,08	4,92	4,52	3,67	3,56		
Total	23,2	20,6	20,0	23,6	21,2	21,7	23,4	22,3		
Média	4,6	4,1	4,0	4,7	4,2	4,3	4,7	4,5	35,21	4,40

Lâmina 14M219A e B	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	4B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,4	6,4	6,4	6,4	6,33	6,15	6,4	6,1		
2	1,95	2,86	2,01	2,02	0	1,07	0,79	1,71		
3	5,24	4,6	5,06	5,35	5,65	5,62	5,42	4,58		
4	5,26	4,9	6,24	6,96	6,02	5,95	5,3	6,77		
5	5,91	4,11	5,61	5,97	5,97	5,88	4,57	4,06		
Total	24,8	22,9	25,3	20,7	24,0	24,7	22,5	23,2		
Média	5,0	4,6	5,1	4,1	4,8	4,9	4,5	4,6	37,60	4,70

Apêndice D - Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm² dos espécimes do grupo M3 no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011

Lâmina 14M317A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,95	6,65	7,1	6,19	5,98	5,83		
2	5,86	7,47	4,67	0,93	0	0		
3	3,79	5,7	5,01	5,35	5,9	6,34		
4	4,94	5,17	5,41	2,95	5,46	5,04		
5	4,41	4,61	4,86	5,53	5,12	6,18		
Total	25,95	29,6	27,05	20,95	22,46	23,39		
Média	5,19	5,92	5,41	4,19	4,49	4,68	29,88	4,98

Lâmina 14M325A e B	1A	2A	3A	4A	1B	2B	4B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,7	7,24	7,21	7,42	6,79	7,47	7,35		
2	0	0	1,42	0,36	0	0	0		
3	6,2	6,63	6,21	6,6	7,11	6,89	6,27		
4	5,22	5,17	5,38	7,15	6,86	7,08	6,58		
5	6,6	6,67	5,16	4,39	4,1	4,02	4,14		
Total	24,72	25,71	25,38	25,92	24,86	25,46	24,34		
Média	4,94	5,14	5,08	5,18	4,97	5,09	4,87	35,28	5,04

Lâmina 14M327A e B	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,53	6,84	6,66	6,6	5,99	6,87	6,71		
2	0	0	0	0	0	0	0		
3	6,99	5,15	4,65	5,37	5,34	4,05	5,82		
4	6,18	3,73	4,67	5,38	4,55	5,01	4,7		
5	5,22	4,68	4,54	5,89	4,16	4,2	5,71		
Total	24,92	20,4	20,52	23,24	20,04	20,13	22,94		
Média	4,98	4,08	4,10	4,65	4,01	4,03	4,59	30,44	4,35

Lâmina 14M323A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	5,94	6,14	4,36	5,22	5,7	5,85		
2	0	0	0	0	0	0		
3	6,72	5,73	6,37	5,16	5,86	5,41		
4	7,09	5,61	6,23	5,79	5,06	5,34		
5	6,35	5,6	6,46	4,55	4,86	5,95		
Total	26,1	23,08	23,42	20,72	21,48	22,55		
Média	5,22	4,62	4,68	4,14	4,30	4,51	27,47	4,58

Lâmina 14M319A e B	1A	2A	3A	1B	2B	4B	5A	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,38	5,47	7,21	6,72	6,71	6,04	6		
2	0	0	0	3,22	2,56	3,78	2,77		
3	5,81	6,13	6,06	6	4,35	3,5	3,7		
4	6,75	6,32	6,64	6,89	6,76	4,14	3,44		
5	5,06	6,91	4,4	6,07	5,79	5,1	5,64		
Total	24	24,83	24,31	28,9	26,17	22,56	21,55		
Média	4,80	4,97	4,86	5,78	5,23	4,51	4,31	34,46	4,92

Lâmina 14M321B	1B	2B	3B	4B	5B	6B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,72	6,76	6,25	6,52	6,69	7,03		
2	0	0	0	0	0	0		
3	5,78	5,83	6,56	5,89	6,06	6,1		
4	5,69	6,07	7,3	4,38	6,99	7,23		
5	6,17	3,29	7,12	7,36	4,45	4,7		
Total	24,36	21,95	27,23	24,15	24,19	25,06		
Média	4,87	4,39	5,45	4,83	4,84	5,01	29,39	4,90

Apêndice E - Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm² dos espécimes do grupo controle no tempo experimental de 30 dias - São Paulo - 2011

Lâmina 30C8A e B	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	4,99	4,5	5,4	5,08	6,64	7,02	6,99		
2	0	0	0	0	0	0	0		
3	1,42	2,1	1,49	1,8	1,5	0,62	0,4		
4	1,04	1,9	1,64	1,16	1,1	1,21	0,78		
5	1,83	2,04	2,01	1,83	0,28	0,72	0,85		
Total	9,28	10,54	10,54	9,87	9,52	9,57	9,02		
Média	1,86	2,11	2,11	1,97	1,90	1,91	1,80	13,67	1,95

Lâmina 30C10A	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	5,28	3,78	5,07	4,36	5,79	5,26	5,19		
2	0	0	0	0	0	0			
3	0,38	2,44	0,95	1,34	2,08	1,28	2,04		
4	1,3	1,98	1,44	0,67	2,39	1,61	2,06		
5	0,75	2,11	0,58	1,11	2,66	2,51	2,17		
Total	7,71	10,31	8,04	7,48	12,92	10,66	11,46		
Média	1,54	2,06	1,61	1,50	2,58	2,13	2,29	13,72	1,96

Lâmina 30C04A	1A	2A	3A	1B	2B	3B	4A	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	4,9	4,8	4,58	4,1	5,14	4,84	4,22		
2	0	0	0	0	0	0	0		
3	1,54	2,65	1,5	2,66	1,26	2,01	1,35		
4	1,5	2,28	1,92	2,44	2,13	1,76	1,78		
5	1,89	1,67	1,71	2,38	1,74	1,7	2,12		
Total	9,83	11,4	9,71	11,58	10,27	10,31	9,47		
Média	1,97	2,28	1,94	2,32	2,05	2,06	1,89	14,51	2,07

Lâmina 30C12A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	7,1	5,27	5,93	4,26	3,93	4,08		
2	0	0	0	0	0	0		
3	0,99	3,26	1,43	1,26	1,15	1,1		
4	1,15	2,55	1,22	0,92	1,19	1,25		
5	0,9	1,76	1,17	0,97	1,11	1,04		
Total	10,14	12,84	9,75	7,41	7,38	7,47		
Média	2,03	2,57	1,95	1,48	1,48	1,49	11,00	1,83

Lâmina 30C06A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	5,61	5,41	5,16	5,48	5,51	5,02		
2	0	0	0	0	0	0		
3	1,17	1,27	1,04	0,95	1,09	1,02		
4	1,38	1,45	0,99	0,99	1,32	1,33		
5	1,05	1,55	1,09	0,91	0,9	1,13		
Total	9,21	9,68	8,28	8,33	8,82	8,5		
Média	1,84	1,94	1,66	1,67	1,76	1,70	10,56	1,76

Lâmina 30C14A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	4,95	5,8	4,6	4,55	4,48	4,29		
2	0	0	0	0	0	0		
3	1,54	1,07	1,53	1,85	1,12	1,37		
4	1,09	1,37	1,44	1,86	1,6	2,13		
5	1,62	1,53	1,84	1,36	1,28	0,97		
Total	9,2	9,77	9,41	9,62	8,48	8,76		
Média	1,84	1,95	1,88	1,92	1,70	1,75	11,05	1,84

Apêndice F - Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm² dos espécimes do grupo M1 no tempo experimental de 30 dias - São Paulo - 2011

Lâmina 30M110A	1A	2A	3A	4A	5A	6A	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	3,49	4,24	4,15	3,52	3,57	5,02		
2	0	0	0	0	1,86	0		
3	4,1	4,16	3,76	4,53	3,57	3,57		
4	4,92	4,88	4,52	4,43	4,79	4,27		
5	3,57	3,43	4,68	4,31	4,25	4,24		
Total	16,08	16,71	17,11	16,79	18,04	17,1		
Média	3,22	3,34	3,42	3,36	3,61	3,42	20,37	3,39

Lâmina 30M114A e B	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	4B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	5,11	6,93	6,73	6,09	4,14	5,6	4,85	5,49		
2	0	0	1,19	1,62	0	0	0	0		
3	3,33	3,62	3,92	3,84	5,54	5,08	3,49	4,89		
4	4,92	4,53	4,65	4,58	4,4	5,17	4,44	4,81		
5	5,71	5,33	5,1	5,34	4,68	3,6	4,2	4,41		
Total	19,07	20,41	21,59	21,47	18,76	19,45	16,98	19,6		
Média	3,81	4,08	4,32	4,29	3,75	3,89	3,40	3,92	31,47	3,93

Lâmina 30M112A	1A	2A	3A	1B	2B	3B	4A	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	4,77	4,76	5,03	3,55	4,86	4,22	3,96		
2	0	0	0	0	0	0	0		
3	4,1	3,59	4,1	5,03	4,25	3,41	5,4		
4	5,48	4,84	4,15	5,56	5,39	4,12	5,1		
5	5,57	3,98	4,8	4,47	5,32	4,65	5,53		
Total	19,92	17,17	18,08	18,61	19,82	16,4	19,99		
Média	3,98	3,43	3,62	3,72	3,96	3,28	4,00	26,00	3,71

Lâmina 30M118A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	4B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,57	5,74	5,75	6,7	6,23	5,63	5,96		
2	0	0	0	0	0	0	0		
3	3,88	3,85	3,24	2,8	4,6	4,15	4,66		
4	5,25	5,62	4,9	2,69	4,25	4,22	4,38		
5	4,74	4,44	4,95	1,89	4,9	5,03	5,05		
Total	20,4	19,7	18,8	14,1	20,0	19,0	20,1		
Média	4,1	3,9	3,8	2,8	4,0	3,8	4,0	26,41	3,77

Lâmina 30M114A	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,96	6,5	6,4	5,54	5,42	6,77	6,44		
2	0	0	0		0	0	0		
3	4,4	4,6	4,4	4,6	4,15	3,78	3,71		
4	3,64	3,47	4,45	5,02	4,32	4,66	4,56		
5	4,72	4,81	4,18	3,96	4,38	4,17	3,65		
Total	19,7	19,4	19,4	19,1	18,3	19,4	18,4		
Média	3,9	3,9	3,9	3,8	3,7	3,9	3,7	26,73	3,82

Lâmina 30M116A	1A	2A	3A	4A	5A	6A	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	7,25	7,02	5,39	6,13	5,67	6,21		
2	0	0	0	0	0	0		
3	3,42	3,9	4,51	3,86	5,03	4,29		
4	4,2	4,15	5,17	4,41	4,79	4,16		
5	4,16	4,53	5,1	4,44	4,11	4,7		
Total	19,0	19,6	20,2	18,8	19,6	19,4		
Média	3,8	3,9	4,0	3,8	3,9	3,9	23,32	3,89

Apêndice G - Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm² dos espécimes do grupo M2 no tempo experimental de 30 dias - São Paulo - 2011

Lâmina 30M211A	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	4,09	4,42	4,57	4,71	4,29	4,76	4,43	4,99		
2	0	0	0	0	0	0	0	0		
3	4,64	5,52	3,88	3,99	4,19	4,24	5,5	3,96		
4	4,31	3,14	3,77	4,03	4,62	4,67	5,43	4,51		
5	5,58	5,5	4,84	4,64	5,09	5,02	3,79	3,95		
Total	18,62	18,58	17,06	17,37	18,19	18,69	19,15	17,41		
Média	3,72	3,72	3,41	3,47	3,64	3,74	3,83	3,48	29,01	3,63

Lâmina 30M27A e B	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	4B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	5,57	4,2	5,67	3,85	5,04	5,84	5,08	6,24		
2	0	0	0	0	0	0	0	0		
3	5,4	4,64	5,85	5,45	4,02	5,42	4,39	5,16		
4	4,78	4,76	5,64	5,26	4,2	5,01	3,74	5,72		
5	5,98	4,8	4,02	4,5	4,77	5,12	3,46	6,1		
Total	21,73	18,4	21,18	19,06	18,03	21,39	16,67	23,22		
Média	4,35	3,68	4,24	3,81	3,61	4,28	3,33	4,64	31,94	3,99

Lâmina 30M215B	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	5,36	5,58	4,53	4,58	4,17	4,2	4,3		
2	0	0	0	0	0	0	0		
3	4,78	5,31	3,31	5,51	5,32	4,22	4,89		
4	5,35	5,4	4,69	5,61	4,74	5,18	5,18		
5	4,64	4,81	6,07	5,04	5,59	4,98	4,79		
Total	20,13	21,1	18,6	20,74	19,82	18,58	19,16		
Média	4,03	4,22	3,72	4,15	3,96	3,72	3,83	27,63	3,95

Lâmina 30M213 A e B	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,25	6,05	5,95	6,41	4,88	4,78	4,73		
2	0	0	0	0	0	0	0		
3	6,51	6,23	5,65	3,94	3,06	3,64	4,29		
4	3,95	5,62	3,81	5,95	4,21	3,8	3,36		
5	3,5	3,94	5,4	3,51	3,59	5,01	4		
Total	20,2	21,8	20,8	19,8	15,7	17,2	16,4		
Média	4,0	4,4	4,2	4,0	3,1	3,4	3,3	26,40	3,77

Lâmina 30M225A e B	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	5,15	5,95	5,49	5,08	6,17	6,19	5,71		
2	0	0	0	0	0	0	0		
3	3,38	3,24	3,78	3,8	3,86	3,31	3,79		
4	3,82	3,73	3,39	3,96	3,34	3,66	3,8		
5	4,01	3,81	3,88	3,77	3,04	3,98	3,45		
Total	16,4	16,7	16,5	16,6	16,4	17,1	16,8		
Média	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,4	3,4	23,31	3,33

Lâmina 30M29A e B	1A	2A	3A	4A	5A	1B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	3,14	4,44	3,84	4,65	4,44	4,35		
2	0	0	0	0	0	0		
3	5,47	5,55	5,58	5,53	5,66	5,1		
4	4,98	5,06	4,79	4,83	4,97	4,48		
5	5,16	4,67	5,2	5,34	4,79	4,8		
Total	18,8	19,7	19,4	20,4	19,9	18,7		
Média	3,8	3,9	3,9	4,1	4,0	3,7	23,36	3,89

Apêndice H - Quantificação morfométrica da área do calo ósseo (CO) em mm² dos espécimes do grupo M3 no tempo experimental de 30 dias - São Paulo - 2011

Lâmina 30M37A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	5,98	6,09	6,22	3,8	5,69	5,98		
2	0	0	0	0	0	0		
3	4,7	4,82	5	4,82	4,68	4,22		
4	2,84	3,09	5,71	3,8	4,3	4,77		
5	4,96	4,78	3,67	4,34	4,5	3,42		
Total	18,48	18,78	20,6	16,76	19,17	18,39		
Média	3,70	3,76	4,12	3,35	3,83	3,68	22,44	3,74

Lâmina 30M313A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	4,68	5,23	5,28	5,25	3,85	5,08		
2	0	0	0	0	0	0		
3	3,54	3,05	3,95	3,76	4,01	4,03		
4	3,87	2,68	3,02	3,96	3,42	3,65		
5	3,77	3,95	3,48	2,19	3,96	2,61		
Total	15,86	14,91	15,73	15,16	15,24	15,37		
Média	3,17	2,98	3,15	3,03	3,05	3,07	18,45	3,08

Lâmina 30M39A	1A	2A	3A	4A	5A	6B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,17	5,84	5,65	5,83	5,02	4,79		
2	0	0	0	0	0	0		
3	2,54	3,98	5,44	4,71	4,88	5,08		
4	4,05	3,92	5,67	5,42	5,01	4,75		
5	3,77	5,91	4,91	3,97	4,44	4,3		
Total	16,53	19,65	21,67	19,93	19,35	18,92		
Média	3,31	3,93	4,33	3,99	3,87	3,78	23,21	3,87

Lâmina 30M35A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	4,12	5,27	6,06	6,48	7,35	6,63		
2	0	0	0	0	0	0		
3	5,6	5,72	4,62	3,14	2,83	2,51		
4	5,78	5,3	5,04	2,33	2,53	2,46		
5	3,43	4,8	4,59	4,72	3,6	3,65		
Total	18,93	21,09	20,31	16,67	16,31	15,25		
Média	3,79	4,22	4,06	3,33	3,26	3,05	21,71	3,62

Lâmina 30M315A e B	1A	2A	3A	4A	5A	1B	2B	3B	4A	Total	Média
Região / CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	6,09	5,92	5,93	5,77	5,56	5,81	7,35	5,99	5,51		
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
3	5,13	4,9	4,89	4,24	3,39	4,13	2,57	2,35	2,81		
4	5,21	5,36	6,1	5,21	5,23	3,29	4,8	5,91	2,45		
5	4,85	5,03	4,25	5,15	5,56	4,71	4,42	4,01	4,45		
Total	21,3	21,2	21,2	20,4	19,7	17,9	19,1	18,3	15,2		
Média	4,3	4,2	4,2	4,1	3,9	3,6	3,8	3,7	3,0	34,87	3,87

Lâmina 30M311A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	Total	Média
CO	CO	CO	CO	CO	CO	CO		
1	5,79	5,96	6,08	6	6,4	5,96		
2	0	0	0	0	0	0		
3	3,02	4,62	4,27	4,34	4,15	5,05		
4	5,14	4,23	3,57	4,8	5,12	5,11		
5	4,95	4,6	3,68	4,49	5,02	4,18		
Total	18,9	19,41	17,6	19,63	20,69	20,3		
Média	3,78	3,88	3,52	3,93	4,14	4,06	23,31	3,88

Apêndice I - Análise estatística das médias da área do calo ósseo (CO) em mm² dos espécimes de cada tratamento no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011

Indivíduo / Tratamento	Controle CO	M1 CO	M2 CO	M3 CO
1	2,04	4,39	3,85	4,98
2	1,86	4,11	4,42	5,04
3	2,04	4,03	4,08	4,35
4	2,3	4,27	4,23	4,58
5	2,28	4,62	4,4	4,92
6	2,23	4,97	4,7	4,9
MÉDIA	2,125	4,398333	4,28	4,795
DP	0,173407	0,349652	0,295905	0,270241

Estatisticamente significante quando $p < 0,05$

Kruskal-Wallis	0,001
Controle X M1	0,003
Controle X M2	0,003
Controle X M3	0,003
M1 X M2	0,748
M1 X M3	0,078
M2 X M3	0,025
DP - Desvio Padrão	

Apêndice J - Análise estatística das médias da área do calo ósseo (CO) em mm² dos espécimes de cada tratamento no tempo experimental de 30 dias - São Paulo - 2011

Indivíduo / Tratamento	Controle CO	M1 CO	M2 CO	M3 CO
1	1,95	3,39	3,63	3,74
2	1,96	3,93	3,99	3,08
3	2,07	3,71	3,95	3,87
4	1,83	3,77	3,77	3,62
5	1,76	3,82	3,33	3,87
6	1,84	3,89	3,89	3,88
MÉDIA	1,901667	3,751667	3,76	3,676667
DP	0,112324	0,194156	0,248113	0,309623

Estatisticamente significante quando $p < 0,05$

Kruskal-Wallis	0,003
Controle X M1	0,003
Controle X M2	0,003
Controle x M3	0,003
M1 X M2	0,748
M1 XM3	0,631
M2 X M3	0,336
DP - Desvio Padrão	

Apêndice L - Quantificação morfométrica da área de matriz cartilaginosa (MC) em mm² dos espécimes do grupo controle no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011

Lâmina 14C24A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	4B	Total	Média
Região / MC	MC	MC	MC	MC	MC	MC	MC		
1				0,28					
2									
3	0,46	0,7	0,2	0,16	0,92	0,86	0,63		
4			0,3	0,56	0,44	0,57	0,7		
5	0,81			1,29	0,92	0,58	0,54		
Total	1,27	0,7	0,5	2,29	2,28	2,01	1,87		
Média	0,25	0,14	0,10	0,46	0,46	0,40	0,37	2,18	0,31

Lâmina 14C18A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	4B	Total	Média
Região / MC	MC	MC	MC	MC	MC	MC	MC		
1			0,31				0,2		
2									
3	1,27	0,96	0,57				0,47		
4		0,48		1,89			0,36		
5			0,43						
Total	1,27	1,44	1,31	1,89	0	0	1,03		
Média	0,25	0,29	0,26	0,38	0,00	0,00	0,21	1,39	0,20

Apêndice M - Quantificação morfométrica da área de matriz cartilaginosa (MC) em mm² dos espécimes do grupo M1 no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011

Lâmina 14M124A e B	1A	2A	3A	4B	Total	Média
Região / MC	MC	MC	MC	MC		
1	0,4	0,7	1,26			
2						
3				1,03		
4	2,67		0,32	1,52		
5		1,91	2,13			
Total	3,07	2,61	3,71	2,55		
Média	0,61	0,52	0,74	0,51	2,39	0,34

Lâmina 14M120A	1A	2A	3A	4A	5A	6A	Total	Média
Região / MC	MC	MC	MC	MC	MC	MC		
1								
2								
3				0,16	0,33	1,23		
4				0,27	1,7	0,33		
5	0,24	1,07	0,7		0,87	0,44		
Total	0,24	1,07	0,7	0,43	2,9	2		
Média	0,05	0,21	0,14	0,09	0,58	0,40	1,47	0,21

Lâmina 14M116B	2B	3B	Total	Média
Região / MC	MC	MC		
1				
2		0,1		
3	0,48	0,51		
4	0,25	0,28		
5	0,5	0,9		
Total	1,23	1,79		
Média	0,25	0,36	0,60	0,10

Lâmina 14M122A e B	1A	2A	3A	4A	5A	1B	2B	Total	Média
Região / MC	MC	MC	MC	MC	MC	MC	MC		
1	0,52	1,4	1,4	1,7		0,29			
2				0,7					
3	0,97	1,56	0,49	1,68		0,92	1,17		
4	2,92	1,12	1,3	3,24		1,18	0,87		
5	0,4	0,62	0,23	0,33	2,8				
Total	4,81	4,7	3,42	7,65	2,8	2,39	2,04		
Média	0,96	0,94	0,68	1,53	0,56	0,48	0,41	5,56	0,70

Lâmina 14M118A e B	1A	3A	1B	2B	3B		Total	Média
Região / MC	MC	MC	MC	MC	MC			
1								
2								
3	2,33		2,71					
4	1,16	1,47	1,17	0,69	1			
5	0,78	1,1		0,51	0,42			
Total	4,27	2,57	3,88	1,2	1,42			
Média	0,85	0,51	0,78	0,24	0,28		2,67	0,44

Apêndice N - Quantificação morfométrica da área de matriz cartilaginosa (MC) em mm² dos espécimes do grupo M2 no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011

Lâmina 14M217A e B	1A	2A	1B	2B	Total	Média
Região / MO	MC	MC	MC	MC		
1	0,52	0,57	0,2			
2						
3				0,3		
4						
5						
Total	0,52	0,57	0,2	0,3		
Média	0,10	0,11	0,04	0,06	0,32	0,05

Lâmina 14M225A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / MC								
1								
2								
3	2,16	1,98	3,15	5,26	4,61	4,33		
4	0,42	1,34	1,11	2,03	4,65	0,81		
5	2,44	0,79	1,07	4,52	2,32	0,61		
Total	5,02	4,11	5,33	11,81	11,58	5,75		
Média	1,00	0,82	1,07	2,36	2,32	1,15	8,72	1,45

Lâmina 14M221A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / MC								
1								
2								
3		1,05	0,71					
4	2,14	0,99	1,11	1,31				
5		1,23	1,12	1,24	1,16	1,95		
Total	2,14	3,27	2,94	2,55	1,16	1,95		
Média	0,43	0,65	0,59	0,51	0,23	0,39	2,80	0,47

Lâmina 14M22A	1A	2A	3A	4A		Total	Média
Região / MC							
1							
2							
3	0,89	0,86	0,65	0,76			
4	2,06	0,15	1,13	1,48			
5		1,64					
Total	2,95	2,65	1,78	2,24			
Média	0,59	0,53	0,36	0,45		1,92	0,24

Lâmina 14M219A e B	1A	2A	3A	4A	1B	2B	3B	4B	Total	Média
Região / MC	MC	MC	MC	MC	MC	MC	MC	MC		
1			0,29	0,2	0,12	0,57	0,78			
2										
3					1,02					
4						1,78	1,43			
5	1,11	0,51		0,17				0,58		
Total	1,11	0,51	0,29	0,37	1,14	2,35	2,21	0,58		
Média	0,22	0,10	0,06	0,07	0,23	0,47	0,44	0,12	1,71	0,21

Apêndice O - Quantificação morfométrica da área de matriz cartilaginosa (MC) em mm² dos espécimes do grupo M3 no tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011

Lâmina 14M317A e B	1A	2A	3A	1B		Total	Média
Região / MC	MC	MC	MC	MC			
1							
2							
3	2,02	1,46	1,15	0,23			
4	0	0		0			
5	2,09	1,84		0,12			
Total	4,11	3,3	1,15	0,35			
Média	0,82	0,66	0,23	0,07		1,78	0,30

Lâmina 14M325B	1B	2B	3B	4B		Total	Média
Região / MC	MC	MC	MC	MC			
1							
2							
3							
4	0,68	0,58	0,62	0,59			
5	0,2	0,31	0,19	0,21			
Total	0,88	0,89	0,81	0,80			
Média	0,18	0,18	0,16	0,16		0,68	0,10

Lâmina 14M323A	1A	2A	3A		Total	Média
Região / MC	MC	MC	MC			
1						
2						
3	0,45	0,55	0,12			
4		1,33				
5	0,98		0,33			
Total	1,43	1,88	0,45			
Média	0,29	0,38	0,09		0,75	0,13

Lâmina 14M319A e B	1A	2A	3A	1B	2B	3B	Total	Média
Região / MC	MC	MC	MC	MC	MC	MC		
1								
2								
3		0,57						
4	0,92		1,33	1,86	0,55	0,59		
5		2,68	1,02		0,37			
Total	0,92	3,25	2,35	1,86	0,92	0,59		
Média	0,18	0,65	0,47	0,37	0,18	0,12	1,98	0,33

Lâmina 14M321A e B	1A	2A	3A	4B	5B	6B	Total	Média
Região / MC	MC	MC	MC	MC	MC	MC		
1			2,03	0,44	0,36	0,31		
2								
3			1,68	0,46		0,33		
4	0,59	0,38	1,9	0,52		0,74		
5		0,45	1,56		0,77			
Total	0,59	0,83	3,46	0,52	0,77	0,74		
Média	0,12	0,17	0,69	0,10	0,15	0,15	1,38	0,23

Apêndice P- Análise estatística das médias da área de matriz cartilaginosa (MC) em mm² dos espécimes de cada tratamento do tempo experimental de 14 dias - São Paulo - 2011

Indivíduo / Tratamento	Controle MC	M1 MC	M2 MC	M3 MC
1				0,3
2		0,34	0,05	0,1
3		0,21	1,45	
4	0,31	0,1	0,47	0,13
5	0,2	0,7	0,24	0,33
6		0,44	0,21	0,23
MÉDIA	0,255	0,358	0,484	0,218
DP	0,077782	0,230478	0,560428	0,101341

Estatisticamente significativa quando $p < 0,05$

Teste binominal, duas proporções

p unilateral = 0,039

DP - Desvio Padrão

Apêndice Q - Média e desvio padrão (DP) do número de osteoclastos (C), porcentagem de área de trabéculas ósseas (T) e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos (C/T) nos espécimes do tempo experimental sete dias. Observe indivíduos (I) dos grupos: Controle, M1, M2 e M3 com respectiva análise estatística - São Paulo - 2011

	Controle			M1			M2			M3		
I	T	C	C/T	T	C	C/T	T	C	CT	T	C	C/T
1	20,14	2,9	14,4	30,09	3,3	11,0	28,29	2,1	7,4	30,12	3,1	10,3
2	18,43	2,4	13,0	26,87	3	11,2	25,3	2,6	10,3	26,95	3	11,1
3	18,83	2,8	14,9	28,59	3,1	10,8	24,21	2	8,3	25,78	2,9	11,2
4	17,12	2,3	13,4	30,11	2,9	9,6	27,38	2,3	8,4	25,87	2,8	10,8
5	18,28	2,2	12,0	27,16	2,9	10,7	30,64	2,1	6,9	30,49	2,9	9,5
6	19,29	2,4	12,4	23,29	2,8	12,0	21,18	2,4	11,3	24,26	2,8	11,5
MÉDIA	18,7	2,5	13,4	27,7	3,0	10,9	26,2	2,3	8,8	27,2	2,9	10,8
DP	0,9	0,3	1,1	2,6	0,2	0,8	3,3	0,2	1,7	2,5	0,1	0,7

Estatisticamente significante quando $p < 0,05$

Teste Kruskal-Wallis

% área trabécula	0,0042
Osteoclastos	0,0012
% trab com clastos	0,0014

% área de trabéculas		Número de osteoclastos		% trabécula com osteoclastos	
Controle X M1	0,0022	Controle X M1	0,0152	Controle X M1	0,0064
Controle X M2	0,0022	Controle X M2	0,1453	Controle X M2	0,0022
Controle X M3	0,0022	Controle X M3	0,0281	Controle X M3	0,0022
M1 X M2	0,5887	M1 X M2	0,0049	M1 X M2	0,0649
M1 X M3	0,9372	M1 X M3	0,4583	M1 X M3	0,936
M2 X M3	0,6991	M2 X M3	0,0048	M2 X M3	0,0777

Apêndice R - Média e desvio padrão (DP) do número de osteoclastos (C), porcentagem de área de trabéculas ósseas (T) e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos (C/T) nos espécimes do tempo experimental 14 dias. Observe indivíduos (I) dos grupos: Controle, M1, M2 e M3 com respectiva análise estatística - São Paulo - 2011

Controle				M1			M2			M3		
I	T	C	C/T	T	C	C/T	T	C	C/T	T	C	C/T
1	30,26	3	9,9	22,2	2,8	12,6	27,03	3	11,1	21,84	3,8	17,4
2	34,32	3,6	10,5	21,39	2,2	10,3	19,67	2,8	14,2	22,04	3,9	17,7
3	41,1	3,1	7,5	36,92	3,0	8,1	35,82	3,5	9,8	25,26	5,1	20,2
4	27,23	2,9	10,7	27,15	2,9	10,7	19,89	2,5	12,6	31,66	3,8	12,0
5	31,53	3	9,3	36,71	2,7	7,4	27,15	2,6	9,6	29,9	4,2	14,0
6	33,39	2,6	7,8	22,14	2,5	11,3	31,45	3	9,5	31,78	4,2	13,2
MÉDIA	33,0	3,0	9,3	27,8	2,7	10,1	26,8	2,9	11,1	27,1	4,2	15,8
DP	4,3	0,3	1,3	7,3	0,3	2,0	6,4	0,4	1,9	4,6	0,5	3,1

Estatisticamente significante quando $p < 0,05$

Teste Kruskal-Wallis

% área trabécula	0,2324
Clastos	0,0017
% trab com clastos	0,0067

Número de osteoclastos

Controle X M1	0,0656
Controle X M2	0,3785
Controle X M3	0,0039
M1 X M2	0,3367
M1 X M3	0,0039
M2 X M3	0,0039

% trabécula com osteoclastos

Controle X M1	0,3785
Controle X M2	0,1735
Controle X M3	0,0039
M1 X M2	0,5752
M1 X M3	0,0065
M2 X M3	0,025

Apêndice S - Média e desvio padrão (DP) do número de osteoclastos (C), porcentagem de área de trabéculas ósseas (T) e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos (C/T) nos espécimes do tempo experimental 30 dias. Observe indivíduos (I) dos grupos: Controle, M1, M2 e M3 com respectiva análise estatística - São Paulo - 2011

	Controle			M1			M2			M3		
I	T	C	C/T	T	C	C/T	T	C	C/T	T	C	C/T
1	57,07	0,7	1,2	35,06	1,9	5,4	34,67	1,9	5,5	24,04	2,2	9,2
2	62,98	0,6	1,0	15,36	1,5	9,8	26,57	2,3	8,7	25,71	2,5	9,7
3	48,13	0,7	1,5	11,78	1,1	9,3	32,68	2,8	8,6	28,59	2,2	7,7
4	47,54	0,9	1,9	20,374	2	9,8	22,64	2,7	11,9	31,15	3,3	10,6
5	45,33	1	2,2	29	2,2	7,6	25,6	2,6	10,2	33,81	3,2	9,5
6	45,02	1	2,2	25,12	2,2	8,8	21,7	2,1	9,7	28,83	2,9	10,1
MÉDIA	51,0	0,8	1,7	22,8	1,8	8,4	27,3	2,4	9,1	28,7	2,7	9,4
DP	6,7	0,2	0,5	8,7	0,4	1,7	5,3	0,4	2,1	3,5	0,5	1,0

Estatisticamente significante quando $p < 0,05$

Teste Kruskal-Wallis

% área trabécula	0,003
Clastos	0,0005
% trab com clastos	0,0036

% área de trabéculas		Número de clastos		% de trabéculas com clastos	
Controle X M1	0,0022	Controle X M1	0,0048	Controle X M1	0,0049
Controle X M2	0,0022	Controle X M2	0,0049	Controle X M2	0,005
Controle X M3	0,0022	Controle X M3	0,0048	Controle X M3	0,005
M1 X M2	0,3939	M1 X M2	0,0538	M1 X M2	0,6884
M1 X M3	0,3095	M1 X M3	0,0115	M1 X M3	0,2971
M2 X M3	0,5887	M2 X M3	0,2971	M2 X M3	0,8726