LUIS EDUARDO STEVANATO DE ALMEIDA

Avaliação biomecânica dos ossos III/IV metacarpianos com falhas ósseas induzidas experimentalmente, tratados com mantas ósseas a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno, em ovinos

São Paulo
2015

LUIS EDUARDO STEVANATO DE ALMEIDA

Avaliação biomecânica dos ossos III/IV metacarpianos com falhas ósseas induzidas experimentalmente, tratados com mantas ósseas a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno, em ovinos

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

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Clínica Cirúrgica Veterinária

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

São Paulo
2015

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3130
FMVZ

Almeida, Luis Eduardo Stevanato de

Avaliação biomecânica dos ossos III/IV metacarpianos com falhas ósseas induzidas experimentalmente, tratados com mantas ósseas a base de quitosana, hidroxapatita e colágeno, em ovinos / Luis Eduardo Stevanato de Almeida. -- 2015.
81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

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

1. Ovídeo. Biomecânica. 2. Ortopedia. 3. Biomaterial. 4. Falha óssea. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação biomecânica dos ossos III/IV metacarpiano com falhas ósseas induzidas experimentalmente em ovinos, tratados com mantas ósseas a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno", protocolado sob o nº 2962/2013, utilizando 6 (seis) ovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. André Luis do Valle De Zoppa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

São Paulo, 18 de fevereiro de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ALMEIDA, Luis Eduardo Stevanato de

Título: Avaliação biomecânica dos ossos III/IV metacarpianos com falhas ósseas induzidas experimentalmente, tratados com mantas ósseas a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno, em ovinos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a DEUS, a minha mãe Maria Elena e meu pai Fernando de Almeida (*in memoriam*), ao meu irmão Fernando Henrique, minha sobrinha Gabriela, aos meus amigos em especialmente Prof. Dr. Rodrigo Crispim e Prof. Dr. André Zoppa, que além de professores se tornaram grandes amigos. E aos animais, que utilizamos em nosso estudo.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por guiar meus passos em mais uma conquista em minha vida pessoal e profissional, pois somente ele reconhece as dificuldades encontradas nesta jornada.

A minha grande incentivadora de toda minha vida, minha MÃE.

Ao meu amigo e orientador Prof. André Luis do Valle De Zoppa pela iniciativa, amizade, ajuda e companherismo neste período.

Ao meu grande amigo Prof. Dr. Rodrigo Crispim Moreira, que além de amigo, tornou-se um irmão. Obrigado meu Brother!

Ao Dr. César Augusto Martins pela ajuda na confecção desta obra, sugestões e ensinamentos sobre o tema.

Aos companheiros de grupo, Geissiane, Nicole, Daniele, Cinthia, Fernanda e Thamires, por estarem sempre ajudando no possível.

Aos professores, Prof. Dr. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva, Prof. Dr. Rodrigo Romero Corrêa e Profa. Dra. Aline Magalhães Ambrósio pela amizade e aprendizagem.

A todos funcionários do HOVET/USP que fizeram parte deste trabalho, Cicero, Henrique e Marcos, e todos residentes.

A Profa. Dra. Sílvia Renata Galdo Cortopassi, por sua essencial contribuição orientando o Bruno e o Douglas, os quais realizaram toda a parte anestésica deste projeto.

As ovelhas que nos ajudaram de maneira a melhorar nosso ensino.

Aos funcionários da biblioteca pela ajuda na confecção da mesma.

E à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por ter financiado e possibilitado a realização dessa pesquisa.

Epígrafe

Só é lutador quem sabe lutar consigo mesmo.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

ALMEIDA, L. E. S. de. **Avaliação biomecânica dos ossos III/IV metacarpianos com falhas ósseas induzidas experimentalmente, tratados com mantas ósseas a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno, em ovinos.** [Biomechanical evaluation of III/IV metacarpal bones with bone defects induced experimentally in sheep treated with chitosan, collagen and hydroxyapatite composite]. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Nos equinos as fraturas geralmente são de alta energia provocando perda do tecido ósseo. Estas lesões do tecido ósseo ocorrem quando suas propriedades de resistência e rigidez são ultrapassadas. Devido a perda de tecido ósseo diversos métodos são utilizados para corrigir os defeitos ósseos, tanto em ortopedia humana, quanto na medicina veterinária, porém os resultados muitas vezes não são satisfatórios. O desenvolvimento de compostos a base colágeno, quitosana e hidroxiapatita deu-se devido a busca na melhora do comportamento mecânico e biológico dos enxertos. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento biomecânico do osso III/IV metacarpianos de ovinos após a implantação de compósito de quitosana, hidroxiapatita e colágeno. Foi utilizado seis ovinos fêmeas da raça Santa Inês, os quais foram submetidos à ostectomias unicorticais de cinco milímetros de diâmetro na região média da superfície dorsal do III/IV metacarpianos. Posteriormente, através de sorteio, foi implantado o compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita em um membro torácico. No membro contralateral foi reproduzida a mesma técnica, porém foi mantido como controle, não sendo preenchido com o compósito. Todos os animais foram submetidos à avaliação física diária. Após 180 dias da criação da falha, os ovinos foram eutanasiados com protocolo autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais. Os ossos foram dissecados e armazenados a -20°C . Após o descongelamento completo, as amostras foram submetidas a ensaio de flexão em três pontos realizado em máquina universal de ensaios mecânicos KRATOS®, modelo KE3000MP, *software*: TRACOMP – W95. Os ossos foram posicionados com sua superfície palmar (mais plana) apoiada sobre duas bases cônicas distantes 5 cm entre si, de modo que a falha óssea ficasse posicionada à mesma distância entre as bases. A carga foi aplicada na superfície dorsal por um atuador cônico no ponto médio do osso, onde foram criadas as falhas ósseas, com velocidade de deslocamento de 5 milímetros

por minuto até o momento da fratura do osso. Durante o ensaio mecânico o *software* gerou gráficos de força x deformação, de onde foram calculadas as seguintes propriedades biomecânicas: força máxima, rigidez, momento e deformação máxima. Através da análise estatística não houve diferença estatísticas na análise da rigidez, força máxima, momento e deformação máxima para ambos os grupos. Com estes resultados podemos concluir que o compósito de quitosana, hidroxiapatita e colágeno não interferiu na consolidação óssea de III/IV metacarpianos de ovinos após 180 dias da implantação.

Palavras-chave: Ovino. Biomecânica. Ortopedia. Biomaterial. Falha óssea.

ABSTRACT

ALMEIDA, L. E. S. de. **Biomechanical evaluation of III/IV metacarpal bones with bone defects induced experimentally in sheep treated with chitosan, collagen and hydroxyapatite composite.** [Avaliação biomecânica dos ossos III/IV metacarpianos com falhas ósseas induzidas experimentalmente, tratados com mantas ósseas a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno, em ovinos]. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

In equines, the fractures are usually of high energy causing loss of bone tissue. These bone tissue injuries occur when its properties of strength and rigidity are outdated. Due to bone loss, various methods are used to correct the bone defects, both in human and in orthopedic veterinary medicine, but the results often are not satisfactory. The development of chitosan, collagen and hydroxyapatite composite came about due to search the improvement of the mechanical behaviour and biological grafts. The objective of this study was to evaluate the biomechanical behavior of the III/IV metacarpal bone of sheep after the implantation of chitosan, collagen and hydroxyapatite composite. Six healthy female sheep Santa Inês breed were submitted to bilateral unicortical ostectomy (five mm/diameter) on the dorsal aspect of the III/IV metacarpal bone. One front limb was randomly selected for composite implantation. At the contralateral limb was reproduced the same technique, but was kept as control, and are not filled with composite. The animals were submitted to daily physical examination during 180-day follow-up period. After 180 days of failure creation, the animals were euthanized with protocol approved by the Animal Ethics Committee. The bones were dissected and stored at -20 C°. After complete thawing, samples were subjected to bending test on three points held in universal testing machine mechanics KRATOS®, model KE3000MP, *software*: TRACOMP-W95. The bones were positioned with its palmar surface (flatter) supported on two tapered bases 5 cm distant from each other, so that the bone gap was positioned at the same distance between the bases. Load was applied on the dorsal surface by a tapered actuator at the midpoint of the bone, where bone defects were set up, with a speed of displacement of 5 mm per minute until the time of bone fracture. During the mechanical test the software generated graphs of force x deformation, where the following biomechanical properties were calculated: maximum strength, rigidity, moment and maximum deformation. Through statistical

analysis, there was no difference in the analysis of statistics, maximum strength, rigidity and maximum deformation for both groups. With the results of this research, it can be concluded that the composite did not interfere in biomechanical characteristics of the metacarpal III/IV bone after 180 days of deployment.

Keywords: Sheep. Biomechanics. Orthopedics. Biomaterial. Bone defect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração de gráfico carga x deformação	32
Figura 2 - Compósito a base de quitosana, colágeno e hidroxiapatita – São Paulo - 2015.....	38
Figura 3 - Vista dorsal dos ossos III/IV metacarpianos.....	39
Figura 4 - Posicionameto dos membros na mesa de cirurgia.....	41
Figura 5 - Local a ser incisado.....	42
Figura 6 - Determinação do ponto médio do osso.....	42
Figura 7 - Incisão de pele, divulsão do tecido subcutâneo, afastamento dos tendões e incisão do periósteo.....	43
Figura 8 - Perfuração da cortical cis e falha criada.....	44
Figura 9 - Manta a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana	45
Figura 10 - Síntese da pele	45
Figura 11 - Mostrando o III/IV ossos metacarpianos dissecados.....	47
Figura 12 - Ossos envolvidos em compressas e embebida em solução	48
Figura 13 - Descongelamento das peças	49
Figura 14 - Demonstração do ensaio de fexão em três pontos	52

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Ilustra a dispersão dos pontos através da mediana da força máxima. Nota-se a pariedade entre os pontos da mediana da força máxima entre os membros controle e com biomaterial55
- Gráfico 2 - Ilustra a diferença da força máxima entre o grupo controle e com biomaterial. Nota-se que a média do grupo controle, numericamente, foi discretamente maior que do grupo com biomaterial.....56
- Gráfico 3 - Ilustra a dispersão dos pontos através da mediana da deformação máxima. Nota-se a pariedade entre os pontos da mediana da deformação máxima entre os membros controle e com biomaterial ..58
- Gráfico 4 - Ilustra a diferença da deformação máxima entre o grupo controle e com biomaterial. Nota-se que a mediana do grupo com biomaterial é maior no gráfico quando comparado com o controle59
- Gráfico 5 - Ilustra a dispersão dos pontos através da mediana da rigidez. Nota-se a pariedade entre os pontos da mediana da deformação máxima entre os membros controle e com biomaterial61
- Gráfico 6 - Ilustra a diferença da mediana da rigidez entre o grupo controle e com biomaterial. Nota-se que a mediana do grupo com biomaterial é maior no gráfico quando comparado com o controle62
- Gráfico 7 - Ilustra a dispersão dos pontos através da mediana do momento de deflexão. Nota-se a pariedade entre os pontos da mediana do momemto de deflexão entre os membros controle e com biomaterial.....64
- Gráfico 8 - Ilustra a diferença da mediana do momento de deflexão entre o grupo controle e biomaterial. Nota-se que a mediana do grupo com controle é discretamente maior no gráfico quando comparado com o grupo biomaterial65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de força máxima (N) e análise descritiva dos grupos controle e biomaterial	54
Tabela 2 - Valores da deformação máxima (mm) e análise descritiva dos grupos controle e biomaterial	57
Tabela 3 - Valores da rigidez (N/mm) e análise descritiva dos grupos controle e biomaterial.....	60
Tabela 4 - Valores do momento (N.mm) de deflexão e análise descritiva dos grupos controle e com biomaterial	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	OSSO: PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS	20
3.2	ENXERTOS	23
3.3	BIOMATERIAIS UTILIZADOS EM ORTOPEDIA	24
3.3.1	Hidroxiapatita	25
3.3.2	Quitossana	26
3.3.3	Colágeno	27
3.3.4	Compósitos	27
3.4	ENSAIOS BIOMECÂNICOS	29
4	HIPÓTESE	36
5	MATERIAL E MÉTODO	37
5.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO E COMISSÃO DE BIOÉTICA	37
5.2	ANIMAIS	37
5.3	MATERIAIS UTILIZADOS NO PROJETO	38
5.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	39
5.4.1	Procedimento anestésico	40
5.4.2	Procedimento cirúrgico	40
5.4.3	Avaliação física	46
5.4.4	Procedimentos pós-operatórios	46
5.4.5	Eutanásia e coleta dos ossos	46
5.4.6	Preparo das peças para ensaios	47
5.4.7	Avaliação Biomecânica	49

6	RESULTADOS	53
6.1	FORÇA MÁXIMA	53
6.2	DEFORMAÇÃO MÁXIMA	56
6.3	RIGIDEZ	59
6.4	MOMENTO DE DEFLEXÃO (MOMENTO)	62
7	DISCUSSÃO	66
7.1	OVINO COMO ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO	66
7.2	PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E CIRÚRGICO.....	67
7.3	FALHA ÓSSEA.....	68
7.4	PÓS OPERATÓRIO E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	70
7.5	PREPARO DAS PEÇAS.....	70
7.6	ENSAIO BIOMECÂNICO.....	71
7.7	A UTILIZAÇÃO DO COMPÓSITO A BASE DE QUITOSANA, HIDROXIAPATITA E COLÁGENO NO TECIDO ÓSSEO.....	72
8	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

O uso de enxertos ósseos está se tornando frequente na ortopedia veterinária como método de resolução de fraturas cominutivas e àquelas com grande perda óssea, pois propicia significativamente a redução da necessidade de amputação do membro afetado (CAVASSANI et al., 2000).

As fraturas são lesões do tecido ósseo que ocorrem quando suas propriedades de resistência e rigidez são ultrapassadas. A resistência e a rigidez do osso são propriedades mecânicas de grande importância. A resistência é definida como a carga máxima que o osso suporta no momento em que há fratura, e a rigidez é definida como a capacidade do osso se deformar elasticamente a medida que uma carga é aplicada, independentemente da direção em que a mesma é aplicada. Quando estas propriedades são ultrapassadas ocorrem lesões do tecido ósseo. Estas propriedades biomecânicas do tecido ósseo podem variar de acordo com a idade, sexo, espécie, porosidade, densidade, mineralização, função e fatores hormonais (AN e DRAUGHN, 2000; KESSLER et al., 2002).

Diversos métodos são utilizados para corrigir defeitos ósseos, tanto em ortopedia humana, quanto na medicina veterinária, porém os resultados muitas vezes não são satisfatórios. Com o objetivo de melhorar a reparação óssea foi desenvolvida uma grande variedade de substitutos ósseos, dentre eles os biomateriais, podendo ser metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos, que devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos receptores (PEREZ-SANCHEZ et al., 2010; VERTENTEN et al., 2010).

A bioengenharia tecidual óssea estuda materiais que possam servir de biomatriz, induzindo a formação óssea circundante ou agir como um transportador ou modelo para implantação das células ósseas e/ou outros agentes, como aquelas confeccionadas para possibilitar a liberação de substâncias como fatores de crescimento; e que sejam mecânico e biologicamente adequados para reconstrução de falhas ósseas (DI MARTINO, 2005).

A consolidação das fraturas é um sistema complexo e organizado de eventos biológicos, intracelulares e extracelulares de acordo com o organismo e o tempo. Fatores locais e sistêmicos contribuem para a consolidação da fratura, assim como crescimento e diferenciação celular e hormonal (LOPEZ et al., 2012).

A utilização de mantas a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno vêm sendo utilizadas em testes de biocompatibilidade e citotoxicidade em ratos. Esta promove estímulo vasculogênico favorecendo o crescimento tecidual e osteocondução, além de possuir boa biocompatibilidade, não causando inflamação crônica (AMARAL, 2006).

Um estudo de falhas ósseas em cães, tratados com substituto ósseo de hidroxiapatita originada de corais do mar, demonstrou que o substituto se incorporou totalmente ao osso. Inicialmente este se apresentava fraco ao estresse fisiológico, mas após sua incorporação mostrou-se tão resistente, quanto o osso primário (TENCER et al., 1984).

Dessa maneira, a avaliação biomecânica da manta óssea de quitosana, hidroxiapatita e colágeno no preenchimento de falhas ósseas, se mostra importante no intuito de verificar se ocorrem alterações nas propriedades biomecânicas do osso.

2 OBJETIVOS

Avaliar a influência, após 180 dias do procedimento cirúrgico, de biomaterial composto por quitosana, colágeno e hidroxiapatita nas propriedades biomecânicas dos ossos terceiro (III) e quarto (IV) metacarpianos (mtc) de ovelhas com preenchimento de falhas ósseas, criadas experimentalmente, em ovinos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 OSSO: PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS

O osso é um órgão de sustentação vascularizado que apresenta elevada rigidez e dureza. A rigidez do osso é inferior somente a dentina e o esmalte dentário. Além de sustentar o corpo, o osso possibilita a locomoção através das inserções musculares, proteção dos órgãos e atua como um reservatório de minerais, principalmente o cálcio e fósforo, o que auxilia na manutenção da homeostase destes íons nos fluídos corpóreos (KÖNIG; LIEBICH, 2002; REIS, 2007; ROSCHGER et al., 2008; FRANKEL; NORDIN, 2014).

Os ossos podem ser classificados em quatro classes, conforme sua função e forma: osso longos, curtos, planos e irregulares. Os ossos longos são divididos em epífise, metafise e diáfise, e apresentam na maior parte das vezes a forma cilíndrica, sendo o seu corpo na porção tubular limitado pela cavidade medular, e sua porção externa, por osso compacto. Ossos curtos, por exemplo, ossos do carpo e do tarso, têm como função a distribuição da força durante a concussão. Ossos planos são formados por duas lâminas de osso compacto associado ao osso esponjoso e presença de medula óssea interpondo estas lâminas. Já os ossos irregulares são encontrados na base do crânio e na coluna vertebral servindo de proteção (DYCE et al., 2004).

O tecido ósseo pode ser classificado mecanicamente e histologicamente em osso compacto (ou cortical) e osso trabecular (ou esponjoso). Em todos os tipos de ossos, o tecido ósseo compacto está presente na camada mais externa, que é densa e rígida e conhecida como córtex ósseo, suportando maior tensão, mas uma menor deformação (FRANKEL; NORDIN, 2014).

Segundo Belloti e Tamachi (2013), o osso compacto (cortical) corresponde a 80% do tecido ósseo do corpo humano e o restante (20%) é composto por osso esponjoso. O osso cortical é composto por substância intersticial calcificada e matriz óssea que é depositada em camadas chamadas lamelas. Estas estão uniformemente espalhadas na substância intersticial formando as lacunas, as quais são preenchidas por osteócitos. As lamelas se organizam concentricamente em

torno dos canais vasculares longitudinais formando uma estrutura denominada sistema de Havers. Dentro do sistema de Havers há canais haversianos, que possuem um ou dois vasos sanguíneos que se comunicam com a cavidade medular e com a superfície do osso através dos canais de Volkmann (GETTY, 1986).

O osso trabecular é composto por uma rede de finas trabéculas ósseas unidas entre si e dispostas de acordo com a solicitação mecânica da região onde se encontra. A porção trabecular devido sua estrutura porosa tem uma grande capacidade de armazenar energia, assim garantindo uma maior deformação quando comparada ao osso cortical (KONG et al., 2007; ROSCHGER et al., 2008).

O osso, por ser considerado uma matéria viva, está em constante mudança, dividida em 3 processos: crescimento, modelagem e remodelagem. O crescimento compreende o desenvolvimento de toda estrutura esquelética, tanto na largura quanto no comprimento, fenômeno controlado principalmente pelo sistema endócrino. O desenvolvimento longitudinal é a característica principal do processo de crescimento, o qual é inibido pela redução dos espaços epifisiários, especialmente nos ossos longos. Por sua vez, a modelagem é responsável pelo aumento da resistência óssea, pelo ganho de massa e corresponde principalmente ao tamanho ósseo. Esta última, responde particularmente a atividades com predomínio de estresse mecânico, conferindo maior resistência óssea com menor possibilidade de fraturas ao longo da vida. A remodelagem tem como principal função, a reparação de microfraturas ocorridas no dia a dia, por um contínuo ciclo de destruição e posterior renovação óssea, ou seja, a ativação dos osteoclastos leva a reabsorção óssea e as ações dos osteoblastos reconstroem a matriz óssea, levando a nova mineralização do tecido. Diferenças entre as ações dos osteoblastos e osteoclastos podem elevar ou reduzir a mineralização, sendo que é o equilíbrio dinâmico entre eles que possibilita a manutenção da densidade da matriz óssea. A remodelagem depende de três fatores: (1) a magnitude da força aplicada no osso; (2) a frequência com a qual as forças são aplicadas e (3) a direção de aplicação da força. As forças mecânicas induzidas pelo exercício físico, agem sobre os osteoblastos para formar novo tecido, adaptando-o aos estímulos externos. De forma similar, a ação muscular resulta em estresse mecânico no osso gerando potenciais elétricos que afetam o equilíbrio da atividade osteoblástica e osteoclástica, induzindo-o a novas modificações. Com o avanço da idade, ocorre o predomínio da atividade osteoclástica aumentando o processo de desmineralização

óssea, a qual é atribuída principalmente a degeneração dos constituintes trabeculares da estrutura óssea. Embora haja alguma compreensão acerca das modificações ósseas em função de estímulos mecânicos, ainda não se sabe quais são os níveis e as frequências de estimulação mecânica necessárias para desencadear o processo de controle/regulação da modelagem e remodelagem óssea (HOLANDA, 1999; BARROS, 2008; FRAJACOMO et al., 2013).

O recobrimento externo do tecido ósseo é feito pelo perióstio (tecido conectivo especializado) e internamente pelo endóstio os quais são irrigados através dos canais de Volkmann. O perióstio é importante na consolidação das fraturas, sendo que a proliferação óssea é maior que a reabsorção devido seu alto poder osteogênico, diferentemente do endóstio em que a atividade de reabsorção é maior que a proliferação óssea, devido a estes fatos, e com o avanço da idade, o canal medular tende a ficar maior e o cortex mais espesso (BELLLOTI; TAMACHI, 2013).

O tecido ósseo é composto por dois tipos de materiais: orgânico e inorgânico. A parte inorgânica é composta basicamente por colágeno e mucopolissacarídeos. Já a parte orgânica é composta basicamente por cristais de hidroxiapatita. O osso é composto percentualmente por: 33,30% de colágeno, 57,35% de fosfato de cálcio, 3,85% de carbonato de cálcio, 2,05% de fosfato de magnésio e 3,45% de carbonato e cloreto de sódio (GETTY, 1986).

A porção mineral é responsável por conferir rigidez ao osso, sendo a porção colagenosa responsável pela tenacidade e resistência do osso. Estudos confirmam que a desnaturação do colágeno presente no osso reduz em até 60% sua resistência e tenacidade. Além do colágeno tipo I atuar como o principal detentor das fissuras primárias no osso (FRANKEL; NORDIN, 2014).

As células responsáveis por manter a composição dos ossos são divididas em quatro tipos, sendo elas: células osteoprogenitoras, as quais se mantêm em um estado indiferenciado e quando estimuladas se proliferam ou diferenciam-se em osteoblasto; os osteoblastos, que quando estimulados formam uma nova matriz orgânica e controlam a mineralização da matriz; os osteócitos, que revestem cerca de 90% da área da superfície total da matriz óssea madura, permitindo a troca de minerais que ocorre entre os líquidos presentes no osso e no sangue; e por último os osteoclastos, que são as únicas células capazes de realizar o processo de reabsorção óssea (BELLLOTI; TAMACHI, 2013).

3.2 ENXERTOS

O desenvolvimento de substitutos ósseos para o tratamento de defeitos do esqueleto é um desafio para as pesquisas ortopédicas e traumatológicas. Durante várias décadas, numerosos grupos de pesquisadores, em colaboração com indústrias, desenvolveram substitutos ósseos de diferentes origens: biológicos, sintéticos, orgânicos, inorgânicos ou compostos como alternativas para o uso do osso autógeno como enxerto (KESSLER, 2002). O transplante autógeno ainda é considerado o padrão-ouro para enxerto no tratamento de fraturas cominutivas, tumores e cirurgias reconstrutivas (ZABEU; MERCADANTE, 2008).

Quanto a composição, os enxertos podem ser esponjosos, corticais, cortico-esponjoso, osteocondrais ou de medula óssea. O esponjoso consiste de tecido ósseo trabecular altamente celular, removido da cavidade medular da região metafisária de ossos longos; o cortical é composto por osso compacto, que promove principalmente suporte estrutural; o cortico-esponjoso é a associação dos dois; o osteocondral resulta da associação entre cartilagem articular e osso subcondral; e o de medula óssea constitui-se de células indiferenciadas (MILLIS; MARTINEZ, 2003).

O transplante ou enxerto de osso autógeno é o mais utilizado nas cirurgias ortopédicas dos equinos, sendo o osso esponjoso o mais comum. O osso cortical pode ser transplantado sem vascularização (avascular) ou com vascularização. Quando comparado, o osso cortical avascular com o vascular, o último se mostra mais eficiente, por possuir vasos sanguíneos que farão anastomoses e nutrição do osso, diferentemente do avascular que depende da penetração de vasos sanguíneos para que ocorra a nutrição (AUER et al., 2012).

Muitos fatores contribuem para o retardo ou não união dos enxertos ósseos. Três grandes categorias foram divididas por Stevenson (1998): a deficiência na vascularização e angiogênese, deficiência na resposta óssea e cartilaginosa, e deficiência na estabilidade, força e continuidade física.

Apesar de os enxertos autólogos apresentarem bons resultados, eles apresentam limitações relacionadas à quantidade de material possível de ser coletada e à morbidade devido a coleta no próprio paciente (CALORI et al., 2011).

As limitações associadas aos autoenxertos, podem ser evitadas com o uso dos aloenxertos (alogênicos), que são normalmente provenientes de cadáveres e

armazenados em bancos de ossos. Os aloenxertos possuem osteocondutividade e osteoindutividade devido a presença de fatores de crescimento, contudo a falta de células viáveis diminui seu potencial osteogênico. Por não serem oriundos do próprio paciente, os enxertos alogênicos podem transmitir doenças e causar reações imunológicas (AUER et al., 2012).

Devido as limitações e possíveis problemas associados aos autoenxertos e aos aloenxertos, vem crescendo o interesse em materiais sintéticos para substituição de tecido ósseo (CALORI et al., 2011).

3.3 BIOMATERIAIS UTILIZADOS EM ORTOPEDIA

O biomaterial é uma substância pura ou composta, sintético ou natural, com finalidade de preencher parcialmente ou totalmente o tecido em que foi implantado e são tolerados de forma transitória ou permanente, pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos (WILLIAMS; BLAYNEY, 1987; VITAL et al., 2006).

Os biomateriais devem possuir características biológicas para interação com o leito receptor. As características importantes que devem ser avaliadas são: biocompatibilidade, previsibilidade, aplicabilidade clínica, ausência de riscos trans-operatórios e sequelas pós operatórias mínimas, além de aceitação pelo paciente. O biomaterial não deve ser carcinogênico ou pirogênico, deve apresentar estabilidade química e biológica, resistência mecânica e elástica ideal (WILLIAMS; BLAYNEY, 1987). Outros fatores importantes que os biomateriais devem apresentar são: atoxicidade, não induzir resposta imunológica, esterelizável, induzir a diferenciação celular, ser absorvido gradativamente para atuar como uma barreira mecânica para o crescimento de tecido fibroso ou invaginação de tecido muscular para dentro da falha (AMARAL, 2006; SPIN NETO, 2008).

Podemos classificar os biomateriais conforme sua funcionalidade, quais sejam: a osteoindução que é a capacidade do biomaterial promover a osteogênese e o crescimento de um osso novo através de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos; a osteocondução que é a capacidade do implante servir como um arcabouço ou estrutura para a penetração e crescimento celular, e a osteogênese

que é o processo que materiais orgânicos são capazes de formar diretamente tecido ósseo através de osteoblasto (AMARAL, 2006; AUER et al., 2012).

Os substitutos ósseos podem ser divididos em: cerâmicas, polímeros, biovidros, fatores de crescimento, células e a associação de vários tipos de substitutos ósseos chamados de compósitos (VERTENTEN et al., 2010)

O organismo animal reage de diferentes maneiras quando coloca-se um implante sintético no mesmo, principalmente, com relação a característica superficial. Classifica-se o biomaterial em relação a reação tecidual em bioinerte, bioreabsorvível ou biodegradável e bioativo. O material bioinerte não apresenta reação com tecidos adjacentes. O bioreabsorvível ou biodegradável sofre biodegradação, bioreabsorção e absorção por atividade biológica, bioquímica ou fagocitose. A bioatividade é o material bioativo capaz de induzir uma reação biológica específica, capaz de integrar com o tecido ósseo (AMARAL, 2006; NAVARRO et al., 2008; TABATA, 2009).

Assim, os biomateriais osteointegráveis representam uma alternativa ao uso de osso autógeno no preenchimento de falhas ósseas por não apresentarem riscos de rejeição imunológica ou transmissão de doenças, e podendo ser utilizado em grandes quantidades. Os biomateriais são materiais artificiais desenvolvidos para utilização nas áreas da saúde com finalidade de substituir órgãos ou tecidos que perderam suas funções (WILLIAMS; BLAYNEY, 1987; SPIN NETO, 2008).

O desenvolvimento de compostos a base colágeno e hidroxiapatita deu-se devido a busca na melhora do comportamento mecânico e biológico dos enxertos (AMARAL, 2006).

3.3.1 Hidroxiapatita

O grupo dos biomateriais com a composição mais próxima do osso é o das cerâmicas de fosfato de cálcio, sendo a principal a hidroxiapatita, representada quimicamente pela fórmula $C_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (VITAL et al., 2006).

Desde o início dos anos 70 tem se produzido a hidroxiapatita sintética, porém ela só foi introduzida para aplicação clínica no início dos anos 80 (VITAL et al., 2006).

A porosidade da hidroxiapatita funciona como suporte passivo à neoformação vascular, o que leva à proliferação de células ósseas (VITAL et al., 2006). A superfície porosa da hidroxiapatita parece fornecer um substrato adicional à proliferação do tecido ósseo, sendo que é difícil determinar o tamanho e a geometria dos poros, entretanto poros com 100 a 1000 μm de diâmetro, desde que os poros sejam conectados entre si por canalículos de 50 μm de diâmetro. O tamanho dos poros interfere no tempo de absorção do biomaterial, devido a isso a importância em determinar qual a melhor geometria (AUER et al., 2012). A hidroxiapatita permite a junção, proliferação, migração de células ósseas, o que resulta em formação de novo osso, em união direta ao biomaterial (VITAL et al., 2006).

3.3.2 Quitosana

Em 1811 Henri Braconnot descobriu a quitina presente em cogumelos, que inicialmente recebeu o nome de fungina, porém em 1823, Odier isolou um resíduo insolúvel de inseto, chamado quitina. Posteriormente Roget em 1859 descobriu a quitosana através da ebulição de uma solução com quitina (AMARAL, 2006).

A quitosana pode ser definida como um copolímero constituído de β -(1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose e β -(1-4)-acetamida-2-deoxi-D-glicopirranose, oriunda da reação de desacetilação da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza (TONHI; PLEPIS, 2002).

Na área da biomedicina a quitosana e a quitina demonstram ser um promissor biomaterial empregado na engenharia de tecidos, funcionando como um sistema liberador de substâncias, recobrimento de feridas e regenerador tecidual (KUMAR, 2000).

Devido a facilidade da manipulação da quitosana e suas várias funcionalidades, diversas aplicações industriais, ambientais e médicas, principalmente na odontologia são possíveis. Para isto foram criados filmes, géis, membranas, fibras, microesferas e pó a base de quitosana (RABEA, 2003).

3.3.3 Colágeno

O colágeno é a uma proteína fibrosa presente na pele, tendões, ossos, dentes, vasos sanguíneos, intestinos e cartilagens, correspondendo a 30% da proteína total do organismo e 6% do peso do corpo humano (TONHI; PLEPIS, 2002). As diferentes organizações das fibras de colágeno conferem as diferentes propriedades do tecido conjuntivo. A formação de fibras insolúveis com alta força elástica é a principal característica do colágeno, sendo ele o responsável por modular as forças externas e internas exercidas no organismo. Este pode ser favoravelmente utilizado como biomaterial devido apresentar papel estrutural nos tecidos em desenvolvimento (AMARAL, 2006).

Devido a importância das características do colágeno como: biodegradabilidade, biocompatibilidade, interação com plaquetas ativando o processo de coagulação do sangue, habilidade em promover crescimento celular e susceptível a modificações químicas (AMARAL, 2006). O colágeno possui uma posição destacada como biomaterial em diversas aplicações, como: reconstrução de tecidos moles, revestimento de ferimentos de queimaduras, como suporte para crescimento de tecidos. Os biomateriais de colágeno podem ser produzidos de diversas formas, dependendo do tipo de aplicação indicada, assim como: pó, membranas, géis, esponjas e filmes (FRANCO et al., 2001; TONHI; PLEPIS, 2002).

3.3.4 Compósitos

O colágeno e a quitosana, associada ou não à hidroxiapatita, têm sido bastante utilizados nas terapias reconstrutivas, pois são polímeros biocompatíveis, atóxicos e biodegradáveis, além de possuírem inúmeras propriedades biológicas (MUNHOZ et al., 2014).

Amaral (2006) avaliou a biocompatibilidade *in vivo* e a citotoxicidade *in vitro* de mantas ósseas a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno. Este biomaterial não apresentou toxicidade celular por meio do método de difusão em ágar, como pelo método de difusão de extrato nas duas linhagens celulares (VERO e HEp) utilizadas.

A ausência de resposta inflamatória no tecido subcutâneo favorece a utilização deste material para aplicação clínica como substituto tecidual.

Zhang e Zhang (2002) uniram a hidroxiapatita, o fosfato-tricalcio e a quitosana, para formar um biomaterial híbrido que obtivesse propriedades biomecânicas para suportar a aplicação de cargas e ainda mantivesse as características biocompatíveis da quitosana. Para avaliação, os autores realizaram teste compressivo e microscopia eletrônica de varredura. Notaram que o módulo de elasticidade e resistência para suportar a aplicação de cargas manteve-se e a quantidade de células osteoblásticas aumentaram neste composto.

Liu et al. (2006) observaram que a adição de ácido cítrico em diferentes proporções à solução de quitosana e cimento de fosfato de cálcio aumentou sua resistência biomecânica, após o endurecimento desse material, que também se mostrou biocompatível, possibilitando seu uso para o preenchimento de falhas ósseas.

Amaral et al. (2006) citaram que a associação de colágeno bovino com hidroxiapatita se mostrou um bom substituto ósseo, que associado com o aspirado medular se tornou um biomaterial com propriedades osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutivas.

Martins (2010) criou um defeito osteocondral na superfície medial da tróclea lateral do osso *talus* de equinos, a fim de verificar a biocompatibilidade do gel de quitosana associado ao fosfato de glicerol. Ao término do estudo concluiu que esta associação foi compatível com o ambiente articular sendo indicado para futuras, aplicações como suporte de células e para liberação controlada de medicamento.

Moreira (2014) avaliou a resistência mecânica à compressão axial da poliuretana de mamona e quitosana associada a cimento de fosfato de cálcio no preenchimento de falhas ósseas do terceiro metacarpiano de equinos estabilizados com placas bloqueadas de 11 orifícios. Ao fim do estudo concluiu que o preenchimento de falha óssea com os biomateriais trouxe benefícios biomecânicos à osteossíntese de modo que aumentaram a resistência e a rigidez do conjunto implante ortopédico/biomaterial/osso, sendo que a quitosana trouxe maior benefício no preenchimento da falha.

3.4 ENSAIOS BIOMECÂNICOS

A biomecânica é um ramo da bioengenharia e da engenharia biomédica, que pode ser aplicada em sistemas biológicos, gerando noções básicas para o entendimento das influências mecânicas sobre o tecido ósseo (DALMOLIN et al., 2013; OZKAYA; LEGER, 2014).

As pesquisas biomecânicas podem ser divididas em três áreas, o estudo experimental, análise de modelos e a pesquisa aplicada. Os estudos experimentais determinam as propriedades mecânicas dos materiais; a análise de modelos evidencia matematicamente os resultados antes de ser realizada o trabalho experimental e a pesquisa aplicada é o conhecimento científico direcionado a trazer benefícios para os pacientes (OZKAYA; LEGER, 2014).

Com a utilização da biomecânica compreende-se as forças e momentos que o esqueleto apendicular deve resistir, gerando avanços na estabilização de fraturas, no estudo da remodelação óssea, nas fraturas decorrentes do exercício e do trauma (LOPEZ; MARKEL, 2012; DALMOLIN et al., 2013).

A mecânica utiliza os conceitos de grandezas escalares ou vetoriais. A grandeza escalar possui apenas uma vertente e é entendida como massa, energia, potência, trabalho mecânico e temperatura. A grandeza vetorial é caracterizada por possuir duas vertentes, sendo uma grandeza e uma direção associada. Força, velocidade, momento e aceleração são exemplos da grandeza vetorial. Para uma avaliação completa da força, o sentido da aplicação e a intensidade devem ser determinados (OZKAYA; LEGER, 2014).

No entendimento da biomecânica deve-se conhecer os fundamentos básicos da mecânica. As forças internas do corpo são descritas utilizando a terminologia e os conceitos básicos da mecânica e da física (OZKAYA; LEGER, 2014).

O aumento da popularidade dos implantes ortopédicos para correção de fraturas levou a um crescente interesse pelas avaliações mecânicas desses materiais, tanto para uso em medicina humana como veterinária (NA; DRAUGHN, 2000).

As propriedades biomecânicas do tecido ósseo podem variar de acordo com a idade, sexo, espécie, porosidade, densidade, mineralização, função e fatores hormonais (NA; DRAUGHN, 2000).

As propriedades mecânicas de um corpo são influenciadas pelo material que compõe esse corpo, pela geometria do corpo e pela metodologia aplicada para a avaliação dessas propriedades. Dessa forma, quando desejamos avaliar e comparar as propriedades mecânicas do tecido ósseo de determinada espécie, devemos utilizar amostras com geometria padronizada e testes também com metodologia padronizada, evitando resultados divergentes (MOREIRA et al., 2008).

A força pode ser definida como uma modificação mecânica, assim quando um objeto é empurrado, puxado, lançado ou chutado é aplicada uma força sobre ele, sendo que a força pode ser capaz de deformar o objeto quando fixo e alterar seu estado de movimento quando livre. As forças podem ser classificadas de várias maneiras em relação aos seus efeitos causados sobre o objeto, como interna ou externa, ou em relação a sua orientação, como normal ou tangencial (OZKAYA; LEGER, 2014).

A força causa aceleração ou movimento de um corpo, ou, quando este é bloqueado, provoca deformação. O momento de uma força é o resultado da aplicação de determinada força com um braço de alavanca, que produz assim tensões de flexão, no sentido longitudinal, que provocam o encurvamento ou tensões de cisalhamento, que provocam a torção. A diáfise do osso recebe grande parte da energia, quando comparada com a energia absorvida pela epífise, dissipando a força nesta, criando o braço de força (DALMOLIN et al., 2013; OZKAYA; LEGER, 2014).

A força aplicada em um objeto fixo, causa deformação do mesmo. Quando a força é retirada e o objeto retorna a sua conformação normal, ocorre a deformação elástica. Aplicando-se uma carga permanente em um objeto, e este não retorne a sua conformação normal, ocorre o fenômeno de deformação plástica, até que ocorra a fratura. Deste modo, quando a resistência do osso é superada pela força aplicada ocorre a fratura (DALMOLIN et al., 2013; OZKAYA; LEGER, 2014).

Os osso longos podem ser submetidos a forças consideradas fisiológicas, estas quando o osso sofre alterações decorrentes de atividades diárias, raramente ocasionando fraturas, e as forças não fisiológicas geralmente são associadas aos traumas (DALMOLIN et al., 2013).

A escolha do ensaio biomecânico depende diretamente do material a ser avaliado, da finalidade e das propriedades mecânicas a serem aferidas (AMENDOLA, 2007).

As propriedades biomecânicas sofrem variações dependendo do sentido da carga aplicada no corpo. Caso a carga seja aplicada nas extremidades do corpo com direções opostas, alongando o corpo, essa força é denominada como força de tração. A força aplicada nas extremidades de um corpo, em direções opostas causando encurtamento e alargamento desse corpo, essa força é determinada como força de compressão (MARKEL, 1996).

Aplicando-se cargas perpendiculares ao eixo principal do corpo, causando flexão do mesmo, gera uma força denominada flexão. Com a flexão de um objeto as forças de tensão e compressão são aplicadas em lados opostos do osso (MARKEL; LOPEZ, 2012).

No ensaio de torção, a carga é aplicada a uma estrutura que faz com que ele gire em torno do seu próprio eixo, o que resulta num binário da estrutura. Tal como no caso da flexão, a magnitude destas tensões é proporcional à sua distância a partir do eixo neutro (geralmente o eixo central de rotação). Durante a aplicação das forças ocorre fissuras no osso o qual tendem a se propagar no eixo axial neutro. Após a fissura inicial ocorre a tensão máxima ao longo de todo o osso causando a fratura em espiral (MARKEL, 1996).

Panjabi (1988) descreveu três tipos de testes biomecânicos (resistência, fadiga e estabilidade). No teste de resistência avalia-se a força em que ocorre a falha do objeto. A longividude do objeto é testado aplicando-se cargas cíclicas com força variada gerando teste de fadiga. O teste de estabilidade avalia os movimentos multidirecionais, principalmente da coluna vertebral, sob aplicação de diversas cargas, em sentidos variados, no qual se mensura a rigidez e as amplitudes de movimento do mesmo (STEFANES et al., 2009).

Os ensaios podem ser classificados de acordo com a velocidade de aplicação das cargas em: estáticos (baixa velocidade) e dinâmicos (alta velocidade). Dentre os estáticos notam-se os de tração, compressão, torção, cisalhamento e flexão, e nos dinâmicos, os de fadiga e impacto (STEFANES et al., 2009).

Durante o ensaio biomecânico de um determinado objeto (por exemplo, osso ou um sistema osso/implante), podemos expressar graficamente a deformação causada conforme a carga aplicada ao objeto, em curvas de carga x deformação (AN; DRAUGHN, 2000; LOPEZ; MARKEL, 2012; NORDIN; FRANKEL, 2014) (Figura 1).

Figura 1 - Ilustração de gráfico carga x deformação

Fonte: (NORDIN; FRANKEL, 2014).

Legenda: Ilustração de uma curva carga x deformação onde pode-se observar uma fase inicial de acomodação, uma fase linear da curva onde ocorre a deformação elástica e uma fase curvilínea onde ocorre deformação plástica. Pode-se observar também o limite elástico e o ponto de falha.

Após uma fase inicial de acomodação, podemos observar uma fase linear da curva onde ocorre deformação elástica (região elástica) e, dessa forma, caso seja retirada a carga aplicada, o objeto retorna a sua forma inicial. A inclinação da curva nessa região indica a resistência do objeto que está sendo ensaiado (AN e DRAUGHN, 2000; LOPEZ; MARKEL, 2012; NORDIN; FRANKEL, 2014).

Em sequência à fase linear da curva, podemos observar que ocorre uma curvatura no gráfico, onde ocorre deformação plástica (região plástica) e, nessa fase, caso seja retirada a carga aplicada, o objeto não retorna a sua forma inicial. O momento em que a deformação deixa de ser elástica e passa a ser plástica é conhecido como momento de deflexão (NA; DRAUGHN, 2000; LOPEZ; MARKEL, 2012; NORDIN; FRANKEL, 2014).

Se continuarmos o ensaio biomecânico podemos chegar a um ponto onde o objeto se deforma sem apresentar nenhuma resistência à carga a ele aplicada. Esse ponto é conhecido como ponto de falha (NA; DRAUGHN, 2000; LOPEZ; MARKEL, 2012; NORDIN; FRANKEL, 2014).

Tonhi e Plepis (2002) realizaram um estudo para obtenção e caracterização de blendas de colágeno e quitosana. As blendas foram confeccionadas em três proporções diferentes de cada material, sendo colágeno-quitosana na proporção de 3:1; 1:1 e 1:3, respectivamente. Através do ensaio biomecânico de tração, verificaram que as curvas de tensão-deformação demonstraram comportamento semelhante. Porém notou-se que o colágeno e a quitosana apresentaram comportamentos opostos nas regiões elástica e plástica. Na região elástica o colágeno deformou mais que a quitosana, apesar desta última suportar maior tensão no limite elástico. Na região plástica o comportamento se mostrou invertido, pois a quitosana passou a deformar mais que o colágeno para o mesmo valor de tensão, portanto o colágeno é capaz de suportar menores tensões que a quitosana. Estes comportamentos foram repassados para as blendas de acordo com suas proporções. Sendo assim as blendas com maior quantidade de colágeno suportaram maiores tensões antes da ruptura, enquanto que as blendas com maior quantidade de quitosana deformaram mais.

Abrahão et al. (2006) realizaram estudo de flexão em três pontos com a tíbia de ratas osteopênicas ovariectomizadas para avaliar sua resistência. Os animais passaram por atividade física diária e posteriormente foram eutanasiados. Para esta avaliação a tíbia foi colocada em um suporte metálico em forma de “U” que permitiu que houvesse um espaço entre os apoios e então, a carga foi aplicada transversalmente ao osso com um pino de 0,2 mm de diâmetro, gerando a flexão em três pontos. Os resultados demonstraram que não ocorreu diferença entre os animais com atividade física e os outros.

Heini et al. (2001) utilizaram 33 pares de vértebras oriundas de 5 cadáveres humanos para testar e avaliar propriedades biomecânicas dos enxertos com metilmetacrilato e de fosfato de cálcio. Para no teste biomecânico as placas vertebrais foram embebidas em material de moldagem, e as amostras foram sujeitas a compressão axial. Dessa forma, puderam concluir que o preenchimento dos corpos vertebrais com cimento aumentou sua rigidez.

Um estudo realizado por Kon et al. (1999) foi delineado a fim de verificar se as células derivadas de medula osteoprogenitoras colocadas na cerâmica de hidroxiapatita proporcionaria uma reparação óssea mais eficaz ao longo de um tempo mais curto, em comparação com os implantes de cerâmica de hidroxiapatita isentos de células. Para isso, utilizaram 4 ovelhas, onde foram criadas falhas ósseas de 3,5 cm no terço central da tíbia esquerda, que foram preenchidas com implantes cilíndricos compostos de hidroxiapatita com porosidade de 80%. Em dois animais foi colocado o implante embebido em células e nos outros somente o implante. A técnica para avaliação biomecânica dos cilindros utilizada foi a identificação, que é uma técnica não destrutiva de recuo que testa a rigidez do material. Dessa forma, concluíram que o implante com célula osteogênica apresentou maior rigidez comparado ao implante livre de células.

Lu et al. (1999) avaliaram o fosfato de cálcio (CPC) e a porção reabsorvível de metacrilato de bisfenol-A-glucidyl (Bis-GMA) com base de cimento (RPC), no preenchimento de falhas ósseas em coelhos. Após a realização de uma falha cilíndrica de 6 mm de diâmetro e 12 mm de profundidade nos côndilos femorais e tibiais de ambos os membros posteriores, as falhas foram preenchidas em um dos lados com CPC e o outro lado com RPC. Após a eutanásia com 2, 4, 12 e 24 semanas pós cirúrgica, os côndilos femorais e tibiais foram dissecados e congelados. Os cilindros compostos de cimento e osso neoformado foram extraídos e moldados em cilindros de 6 mm de diâmetro de 12 mm de altura, para a realização dos testes de compressão. Dessa maneira, concluíram que houve maior resistência no cimento RPC (27 MPa) comparado ao CPC (11 MPa) e ao osso esponjoso normal.

Florin et al. (2005) compararam as propriedades mecânicas do uso de duas placas DCP, duas placas LC-DCP e duas placas LCP, posicionadas de modo ortogonal na fixação de fraturas, utilizando modelos ósseos submetidos à flexão em quatro pontos. Os autores concluíram que os resultados das placas LCP foram superiores às demais placas com relação à resistência, até que se iniciassem deformações permanentes no conjunto osso/placa.

Sod et al. (2008) compararam, em laboratório, a resistência mecânica de placas LCP e LC-DCP na fixação de fratura transversa em diáfise de osso terceiro metacarpiano de equinos. Para tanto, fixaram em cada osso, uma placa na

superfície dorsal e submeteram a ensaios biomecânicos de flexão em quatro pontos, flexão cíclica em quatro pontos e torção. Após avaliação dos resultados, concluíram que as placas LCP resistiram a cargas superiores quando comparadas às LC-DCP em todos os parâmetros avaliados.

Curcelli (1999) avaliou biomecanicamente a consolidação de fraturas induzidas na diáfise da tíbia de ratos tratadas com diferentes tipos de anticoagulante. Os animais foram divididos em três grupos. Um grupo tratado com heparina sódica, outro com enoxaparina e por último o grupo controle. Os animais foram eutanasiados após 28 dias e os ossos submetidos a ensaio biomecânico de flexão. Foi constatada que não houve diferença biomecânica na consolidação das fraturas entre os grupos tratados com diferentes anticoagulantes e o grupo controle.

Martins (2001) realizou um estudo para avaliar o comportamento mecânico de falhas de 3,5 mm no rádio de coelhos, sendo que em um grupo as falhas foram preenchidas com biomaterial (proteína morfogenética bovina e colágeno) e o outro com osso homólogo, e o membro contralateral de controle. Após seis semanas esses animais foram submetidos a eutanásia e os rádios submetidos a ensaio biomecânicos de flexão em três pontos com a carga sendo aplicada no foco da regeneração. O autor avaliou a força máxima e o deslocamento. Concluiu-se que embora os enxertos homólogos obtiveram consolidação satisfatória, os biomateriais apresentaram uma variação mecânica intra-grupo baixa, apresentando-se homogêneos.

4 HIPÓTESE

O preenchimento de falha óssea com biomaterial composto por quitosana, hidroxiapatita e colágeno não influencia as propriedades biomecânicas do tecido ósseo estudado, após 180 dias de reparação da falha criada.

5 MATERIAL E MÉTODO

5.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO E COMISSÃO DE BIOÉTICA

O estudo foi realizado no Laboratório de Ortopedia e Traumatologia Comparada do Departamento de Cirurgia da FMVZ – USP da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). O protocolo experimental foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sob o número 2962/2013.

5.2 ANIMAIS

Foram utilizados seis ovinos (fêmeas não prenhes), adultos (média de três anos de idade) hígidos, da raça Santa Inês. Durante período de adaptação de 30 dias e no transcorrer da pesquisa os animais foram mantidos em regime de estabulação, recebendo água e feno de gramíneas *ad libitum*, além de ração peletizada comercial para dieta de manutenção, calculada com base no peso vivo (1%).

Na chegada ao Hospital Veterinário da FMVZ-USP (Serviço de Cirurgia de Grandes Animais), todos foram identificados por meio de brincos (numerados) e vacinados contra clostridioses (primeira dose e reforço após 30 dias). Foram realizados exames laboratoriais (hemograma completo, perfil renal, perfil hepático e coproparasitológico), e os animais foram vermifugados de acordo com seu peso vivo, com moxidectina e suplementados com sal mineral.

5.3 MATERIAIS UTILIZADOS NO PROJETO

Para o preenchimento da falha óssea foi utilizado o compósito a base de quitosana, colágeno e hidroxiapatita (Figura 2) desenvolvido pela Professora Ana Maria de Guzzi Plepis e sua equipe, do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo.

Figura 2 - Compósito a base de quitosana, colágeno e hidroxiapatita – São Paulo - 2015

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

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

5.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram confeccionadas falhas ósseas circulares unicorticais na região dorsal da diáfise média dos ossos III/IV metacarpiano dos seis ovinos, com uma serra trefina de 4 mm de diâmetro, o qual produziu uma falha de 5 mm de diâmetro (Figura 3). De modo aleatório, foram implantadas as mantas óssea de quitosana, hidroxiapatita e colágeno nas falhas ósseas na diáfise do III/IV metacarpiano de um membro, e no membro contralateral, as falhas não foram preenchidas, servindo então como controle do remodelamento ósseo. Os animais foram submetidos a eutanásia após 180 dias de pós-operatório.

Figura 3 - Vista dorsal dos ossos III/IV metacarpianos

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Determinação da área onde foram confeccionadas as falhas ósseas através de osteotomia monocortical com perfuradora.

5.4.1 Procedimento anestésico

Os animais foram submetidos a anestesia geral inalatória, após 48 horas de jejum alimentar e 12 horas de jejum hídrico, seguindo o protocolo utilizado pelo Serviço de Anestesia do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP – HOVET/USP, o qual constou: medicação pré-anestésica com cloridrato de xilazina¹ (0,05 mg/kg, i.v.), indução anestésica com propofol² (6 mg/kg, i.v.), manutenção inalatória com isoflurano³ vaporizado em oxigênio 100%. Durante o procedimento anestésico/cirúrgico foram avaliados os seguintes parâmetros: pressão arterial invasiva, frequência respiratória e cardíaca, capnografia (análise da concentração de CO₂) e saturação de hemoglobina através da oximetria de pulso.

5.4.2 Procedimento cirúrgico

Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito e os membros fixados distalmente e preparados para o procedimento cirúrgico.

A antisepsia foi realizada com digluconato de clorexidina degermantea 2% e digluconato de clorexidina alcoólica a 0,5%. Para evitar a contaminação provinda dos cascos, o mesmo foi protegido com bandagem elástica estéril (Figura 4).

Após os ovinos estarem em plano anestésico foi realizado o acesso dos ossos III/IV metacarpianos, por meio de incisão de pele semi-circular de 5 centímetros, na região dorsal da diáfise média dos ossos o qual foi determinada palpando a extremidade dorsoproximal dos ossos III/IV metacarpianos e a extremidade dorsodistal do mesmo. Com o auxílio de uma régua o osso foi medido e o centro da medição foi utilizado como ponto médio da incisão (Figura 5), tal procedimento foi confirmado por meio de realização de exame radiográfico com um emissor de raios-X portátil Modelo TR90, e painel digital modelo Mark IIG (Figura 6). O tendão do

¹Rompum[®], Bayer Saúde Animal, São Paulo, S.P., Brasil.

²Propovan[®], Cristália, Itapira, S.P., Brasil.

³Isoforine[®], Cristália, Itapira, S.P., Brasil.

músculo extensor digital lateral, tendão lateral do músculo extensor digital comum e tendão medial do músculo extensor digital comum foram afastados lateralmente. O tecido subcutâneo foi divulsionado até a identificação do periósteo, que foi incisado de forma semi-circular (Figura 7). A falha foi realizada no terço médio da diáfise do III/IV metacarpianos utilizando uma serra trefina de 4 mm de diâmetro, acoplada a uma perfuradora elétrica⁶, sob irrigação contínua com solução de NaCl 0,9% (Figura 8).

Após a criação da falha óssea, foram implantadas as mantas ósseas de quitosana, hidroxiapatita e colágeno (Figura 9). Os implantes foram recobertos pelo periósteo e tecido subcutâneo, que foi suturado com fio poligrecapone 25 nº 2.0. Os tendões afastados previamente foram reposicionados e síntese de pele foi feita com fio mononylon nº 2.0, no padrão simples contínuo (Figura 10). Após o procedimento em um membro torácico, foi seguido o mesmo protocolo no membro contralateral que foi utilizado como controle do estudo. Ao término do procedimento foi realizado penso de Robert Jones para proteger a ferida cirúrgica do ambiente externo.

Figura 4 - Posicionameto dos membros na mesa de cirurgia

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Os dois membros já posicionados e com a antissepsia realizada para o procedimento cirúrgico.

Figura 5 - Local a ser incisado

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Imagem ilustrando a aferição do comprimento total do osso III/IV metacarpiano com o auxílio de uma régua, marcando o ponto médio do comprimento do osso com uma agulha.

Figura 6 - Determinação do ponto médio do osso

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: ilustrando a realização de imagem radiográfica para confirmação do ponto médio, com emissor de raios-x portátil Modelo TR90, e painel digital modelo Mark IIG.

Figura 7 - Incisão de pele, divulsão do tecido subcutâneo, afastamento dos tendões e incisão do periósteo

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: A) Ilustração da realização da incisão de pele semi-circular na diáfise média do III/IV osso metacarpiano. B) Divulsão do tecido subcutâneo. C) Afastamento dos tendões extensores. D) Incisão semi-circular do periósteo e posteriormente sua elevação.

Figura 8 - Perfuração da cortical *cis* e falha criada

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: A) Ilustração da perfuradora acoplada a uma serra trefina de 4 mm de diâmetro perfurando a *cis*-cortical sob irrigação contínua de NaCl 0,9%. B) Falha óssea criada apenas na cortical *cis*, dorsal do osso.

Figura 9 - Manta a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Ilustração da colocação da manta a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana preenchendo todo o orifício criado.

Figura 10 - Síntese da pele

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Ilustração da síntese de pele realizada com fio de sutura mononylon nº 2.0, no padrão simples contínuo.

5.4.3 Avaliação física

A cada 48 horas foi realizada avaliação da ferida cirúrgica quanto à presença de deiscência da sutura, infecção (avaliada pela presença de secreção purulenta) e reação inflamatória (avaliada pela presença de dor e edema). Este procedimento foi realizado a cada 48 horas durante 30 dias. O exame físico completo foi realizado diariamente, onde foram aferidos os seguintes parâmetros fisiológicos: frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), coloração de mucosas, temperatura retal (T^oR) e movimentação ruminal (MR).

5.4.4 Procedimentos pós-operatórios

No período pós-operatório administrou-se fenilbutazona⁴ (4 mg/kg, i.v.) a cada 24 horas durante 3 dias e cloridrato de ranitidina⁵ (2 mg/kg, i.v) a cada 24 horas, durante 3 dias. A terapia antimicrobiana foi realizada com sulfadoxina com trimetoprima⁶ (30 mg/kg, i.m) uma vez ao dia por 5 dias. Foi realizado o curativo da ferida cirúrgica com gaze estéril umedecida em solução fisiológica e o animal foi mantido com bandagem estéril até a retirada dos pontos, com quinze dias de pós-operatório.

5.4.5 Eutanásia e coleta dos ossos

Após 180 dias de pós operatório, os animais foram submetidos a eutanásia para a coleta dos ossos III/IV metacarpianos. O procedimento foi realizado seguindo

⁸Equipalazone Injetável®, Marcolab, Duque de Caxias, R.J., Brasil.

⁹Cloridrato de Ranitidina®, Novafarma, Anápolis, G.O., Brasil.

¹⁰Borgal®, Intervet do Brasil, Cotia, S.P., Brasil.

o seguinte protocolo: cloridrato de xilazina⁷ (1 mg/kg, i.v), após 5 minutos, tiopental sódico⁸ (12,5 mg/kg, i.v) e cloreto de potássio 19,1%⁹ (até que ocorresse a parada cardiorrespiratória). Após a morte e coleta dos ossos, os animais foram descartados através do sistema de descarte de carcaças do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

5.4.6 Preparo das peças para ensaios

As peças foram removidas dos animais após a eutanásia, dissecadas (Figura 11), envolvidas por compressas embebida em solução fisiológica NaCl 0,9% (Figura 12) e posteriormente congeladas a -20°C como descrito por An Bensen (2000). As peças foram retiradas do *freezer* e colocadas em uma caixa térmica contendo solução fisiológica NaCl 0,9%, as quais permaneceram embebidas até seu completo descongelamento (Figura 13) para a realização dos ensaios.

Figura 11 - Mostrando o III/IV ossos metacarpianos dissecados

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: A) Ilustração de um par de III/IV ossos metacarpianos dissecados. B) Ilustração dos 6 pares de III/IV ossos metacarpianos dissecados.

¹¹Rompum®, Bayer Saúde Animal, São Paulo, S.P., Brasil

¹²Thiopentax®, Cristália, Itapira, S.P., Brasil.

¹³Cloreto de Potássio®, Halex Istar, Goiânia, G.O., Brasil.

Figura 12 - Ossos envolvidos em compressas e embebida em solução

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Ilustração dos pares de III/IV ossos metacarpianos envolvidos em compressas. embebidos em solução fisiológica NaCl 0,9% para preservação e congelamento.

Figura 13 - Descongelamento das peças

Legenda: Ilustração das peças descongelando em caixa térmica embebida em solução fisiológica de NaCl 0,9% para realização dos ensaios biomecânicos.

5.4.7 Avaliação Biomecânica

A avaliação biomecânica foi feita por meio de ensaio de flexão em três pontos. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Ortopedia e Traumatologia Comparada do Departamento de Cirurgia da FMVZ – USP, sob supervisão do Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno e colaboração do Biotecnólogo Cesar Augusto Martins Pereira, do Laboratório de Biomecânica–IOT-HC-FMUSP, realizado em máquina universal de ensaios mecânicos KRATOS®, modelo KE3000MP, *software*: TRACOMP – W95 (TRCU61285) dotada de célula de carga (dinamômetro) de 3000

kgf e resolução de 4 escalas, travessão móvel com registro de deformação com resolução de 0,01mm e velocidade de deformação de 5 mm/min a 500 mm/min.

Para o ensaio mecânico de flexão em três pontos os ossos foram posicionados com sua superfície palmar (mais plana) apoiada sobre duas bases cônicas distantes 5cm entre si, de modo que a falha óssea ficasse posicionada à mesma distância entre as bases. A carga foi aplicada na superfície dorsal por um atuador cônico no ponto médio do osso, onde foram criadas as falhas ósseas, com velocidade de deslocamento de 5 milímetros (mm) por minuto (m) até o momento da fratura do osso (Figura 14).

Durante o ensaio mecânico o *software* gerava gráficos de força x deformação, de onde foram calculadas as seguintes propriedades biomecânicas:

- Força máxima: é conceituada como a modificação mecânica, sendo que a força pode atuar deformando osso ou alterando seu estado de movimento. No momento da fratura, o osso continua a se deformar sem oferecer resistência e é ilustrada graficamente como o ponto mais alto do gráfico, representada através da fórmula:

$$F = m \cdot a$$

Onde:

- F= força
- m= massa
- a= aceleração

- Deformação máxima: conceitualmente corresponde à deformação medida no pico do gráfico, nos ensaio de flexão, denominada de flecha. Pois não é a deformação sofrida ao longo do osso e sim o quanto que o osso envergou em relação a sua posição sem carga.
- Rigidez: Conceitualmente, a rigidez é definida como o quanto o objeto se deforma a medida que a ele é aplicada uma força durante a fase de deformação elástica, representada por uma linha reta no gráfico. Dessa forma o valor de rigidez é dado pela fórmula:

$$R = \frac{\Delta F}{\Delta d}$$

Onde:

- R = Rigidez
- ΔF = Variação da força durante a deformação elástica
- Δd = Variação da deformação elástica

Para que o cálculo da rigidez se desse na fase de deformação elástica, foi avaliado o coeficiente de correlação dos pontos do gráfico onde se considerou como uma linha reta. Quando o coeficiente de correlação é igual a 1, considera-se que os pontos do gráficos estão perfeitamente dispostos em uma linha reta. Dessa forma, quanto mais próximo a 1 for o coeficiente de correlação, mais próximos os pontos estão dispostos em uma linha reta.

➤ Momento de deflexão (momento): Conceitualmente o momento se define como o momento de uma força em um ponto é igual a magnitude da força multiplicada pelo comprimento da distância mais curta entre o ponto e a linha de ação de força. Dessa forma o valor de do momento de deflexão é dado pela fórmula:

$$M = F_{\text{máx}} \times \frac{L}{4}$$

Onde:

- M = Momento de deflexão
- $F_{\text{máx}}$ = Força máxima, que é o momento da fratura, onde o osso continua a se deformar sem oferecer resistência e é ilustrada graficamente como o ponto mais alto do gráfico.
- $L/4$ = Valor da distância entre os apoios (5 cm) dividida por 4 , dessa forma $L/4$ foi de 12,5 mm.

Figura 14 - Demonstração do ensaio de flexão em três pontos

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Ilustração do ensaio de flexão em três pontos. Nota-se duas bases fixas na porção inferior e um atuador no centro, colocado sob o ponto do enxerto. Ensaio realizado com uma máquina universal de ensaios mecânicos KRATOS®, modelo KE3000MP, *software*: TRACOMP – W95 (TRCU61285) dotada de célula de carga (dinamômetro) de 3000 kgf e resolução de 4 escalas, travessão móvel com registro de deformação com resolução de 0,01mm e velocidade de deformação de 5 mm/min a 500 mm/min.

6 RESULTADOS

Como descrito anteriormente os dados avaliados foram força máxima, deformação máxima, rigidez e momento de deflexão (momento).

Considerando essas propriedades biomecânicas foram feitas as avaliações estatísticas descritivas dos dados relativos a essas propriedades biomecânicas.

Além da análise descritiva, também foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon para comparação entre os grupos Controle e grupo com Biomaterial, quanto às propriedades biomecânicas, pressupondo o pareamento das amostras definido no delineamento experimental. Também foram construídos gráficos de valores individuais para estudo da dispersão individual e distribuição dos dados, e de gráfico de dispersão para expor o padrão de associação entre carga e deformação nos dois grupos de animais.

Todos os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do *software* Minitab 16. Nos testes de hipóteses utilizou-se o nível de significância igual a 0,05.

6.1 FORÇA MÁXIMA

A tabela 1, ilustra os valores de força máxima (N) de todas as peças testadas, bem como a análise estatística descritiva dos grupos controle e biomaterial.

O gráficos 1 e 2, ilustram os valores de força máxima (N) de todas as peças testadas, bem como a análise estatística descritiva dos grupos controle e biomaterial.

Tabela 1 - Valores de força máxima e análise descritiva dos grupos controle e biomaterial (N)

Ovelha	Grupo Controle	Grupo Biomaterial
7	282,75	296,25
8	255	294
9	369,75	327
10	324	387,75
11	348	276
12	465	432,75
Média	340,8	335,6
Mediana	336,0	311,6
Desvio Padrão	73,9	61,7
Mínimo	255,0	276,0
Máximo	465,0	432,8
CV (%)	21,7	18,4

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Valores da média, mediana, desvio padrão, força máxima e mínima, e coeficiente de variância (CV) da força máxima em newton (N).

Gráfico 1 - Ilustra a dispersão dos pontos através da mediana da força máxima. Nota-se a pariedade entre os pontos da mediana da força máxima entre os membros controle e com biomaterial

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Gráfico de pontos ilustrando a mediana entre os membros controle e com biomaterial. Nota-se a pariedade entre os pontos da mediana da força máxima entre os membros controle e com biomaterial.

Gráfico 2 - Ilustra a diferença da força máxima entre o grupo controle e com biomaterial. Nota-se que a média do grupo controle, numericamente, foi discretamente maior que do grupo com biomaterial

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Gráfico de coluna ilustra a mediana entre os membros controle e com biomaterial. Nota-se uma discreta diferença da mediana da força máxima entre os membros controle e com biomaterial.

Após a avaliação descritiva dos valores de força máxima, foi aplicado o teste de Wilcoxon, com nível de significância de 0,05, para avaliar se houve diferença estatística entre os grupos testados. O valor P encontrado no teste estatístico aplicado foi 0,753, sendo maior que 0,05, o que revela que não foi encontrada diferença estatisticamente significantes entre os grupos.

6.2 DEFORMAÇÃO MÁXIMA

A tabela 2, ilustra os valores de deformação máxima (mm) de todas as peças testadas, bem como a análise estatística descritiva dos grupos controle e biomaterial.

O gráficos 3 e 4, ilustram os valores de deformação máxima (mm) de todas as peças testadas, bem como a análise estatística descritiva dos grupos controle e biomaterial.

Tabela 2 - Valores da deformação máxima (mm) e análise descritiva dos grupos controle e biomaterial

Ovelha	Grupo Biomaterial	Grupo Controle
7	2,67	1,94
8	2,34	2,07
9	1,77	3,15
10	1,83	1,9
11	3,61	1,97
12	2,79	3,08
Media	2,5	2,4
Mediana	2,5	2,0
Desvio Padrão	0,7	0,6
Mínima	1,8	1,9
Máxima	3,6	3,2
CV (%)	27,4	25,3

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015).

Legenda: Valores da média, mediana, desvio padrão, deformação máxima e mínima, e coeficiente de variância (CV) da deformação máxima em milímetros (mm).

Gráfico 3 - Ilustra a dispersão dos pontos através da mediana da deformação máxima. Nota-se a pariedade entre os pontos da mediana da deformação máxima entre os membros controle e com biomaterial

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Gráfico de pontos ilustrando a mediana entre os membros controle e com biomaterial. Nota-se a pariedade entre os pontos da mediana da deformação máxima entre os membros controle e com biomaterial, exceto um ponto do grupo biomaterial.

Gráfico 4 - Ilustra a diferença da deformação máxima entre o grupo controle e com biomaterial. Nota-se que a mediana do grupo com biomaterial é maior no gráfico quando comparado com o controle

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Gráfico de coluna ilustrando a mediana da deformação máxima entre os membros controle e biomaterial. Nota-se a que o grupo biomaterial deformou mais que o membro controle.

Após a avaliação descritiva dos valores de deformação máxima, foi aplicado o teste de Wilcoxon, com nível de significância de 0,05, para avaliar se houve diferença estatística entre os grupos testados. O valor P encontrado no teste estatístico aplicado foi 0,753, sendo maior que 0,05, o que revela que não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

6.3 RIGIDEZ

A tabela 3, ilustra os valores de rigidez (N/mm) de todas as peças testadas, bem como a análise estatística descritiva dos grupos controle e com biomaterial.

O gráficos 5 e 6, ilustram os valores de rigidez (N/mm) de todas as peças testadas, bem como a análise estatística descritiva dos grupos controle e com biomaterial.

Tabela 3 - Valores da rigidez (N/mm) e análise descritiva dos grupos controle e biomaterial

Ovelha	Grupo Biomaterial	Grupo Controle
7	229,70	197,67
8	147,61	203,23
9	254,12	237,40
10	309,09	263,93
11	97,56	243,23
12	282,17	327,28
Media	220,0	245,5
Mediana	241,9	240,3
Desvio Padrão	81,6	47,3
Mínima	97,6	197,7
Máxima	309,1	327,3
CV (%)	37,1	19,3

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Valores da média, mediana, desvio padrão, rigidez máxima e mínima, e coeficiente de variância (CV) da rigidez em N/mm.

Gráfico 5 - Ilustra a dispersão dos pontos através da mediana da rigidez. Nota-se a pariedade entre os pontos da mediana da deformação máxima entre os membros controle e com biomaterial

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Gráfico de pontos ilustrando a mediana entre os membros controle e com biomaterial da rigidez. Nota-se a pariedade entre os pontos da mediana da rigidez entre os membros controle e com biomaterial, exceto dois pontos do grupo com biomaterial.

Gráfico 6 - Ilustra a diferença da mediana da rigidez entre o grupo controle e com biomaterial. Nota-se que a mediana do grupo com biomaterial é maior no gráfico quando comparado com o controle

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Gráfico de coluna ilustrando a mediana da rigidez entre os membros controle e com biomaterial. Nota-se a que o grupo com biomaterial foi discretamente mais rígido que o membro controle.

Após a avaliação descritiva dos valores de rigidez, foi aplicado o teste de Wilcoxon, com nível de significância de 0,05, para avaliar se houve diferença estatística entre os grupos testados. O valor P encontrado no teste estatístico aplicado foi 0,463, sendo maior que 0,05, o que revela que não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

6.4 MOMENTO DE DEFLEXÃO (MOMENTO)

A tabela 4, ilustra os valores do momento de deflexão (N.mm) de todas as peças testadas, bem como a análise estatística descritiva dos grupos controle e biomaterial.

O gráficos 7 e 8, ilustram os valores do momento de deflexão (N.mm) de todas as peças testadas, bem como a análise estatística descritiva dos grupos controle e biomaterial.

Tabela 4 - Valores do momento de deflexão (N.mm) e análise descritiva dos grupos controle e com biomaterial

Ovelha	Grupo Biomaterial	Grupo Controle
7	1,48	1,41
8	1,47	1,27
9	1,63	1,84
10	1,93	1,62
11	1,38	1,74
12	2,16	2,32
Media	1,67	1,70
Mediana	1,55	1,68
Desvio Padrão	0,30	0,37
Mínimo	1,38	1,27
Máximo	2,16	2,32
CV (%)	18,4	21,7

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Valores da média, mediana, desvio padrão, momento de deflexão máxima e mínima, e coeficiente de variância (CV) do momento de deflexão em N.mm.

Gráfico 7 - Ilustra a dispersão dos pontos através da mediana do momento de deflexão. Nota-se a pariedade entre os pontos da mediana do momemto de deflexão entre os membros controle e com biomaterial

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Gráfico de pontos ilustrando a mediana entre os membros controle e com biomaterial no momento de deflexão. Nota-se a pariedade entre os pontos da mediana do momento de deflexão entre os membros controle e com biomaterial.

Gráfico 8 - Ilustra a diferença da mediana do momento de deflexão entre o grupo controle e biomaterial. Nota-se que a mediana do grupo com controle é discretamente maior no gráfico quando comparado com o grupo biomaterial

Fonte: (ALMEIDA, L. E. S, 2015)

Legenda: Gráfico de coluna ilustrando a mediana do momento de deflexão entre os membros controle e com biomaterial. Nota-se a que o grupo controle foi discretamente mais elevado que o grupo biomaterial.

Após a avaliação descritiva dos valores de momento de deflexão, foi aplicado o teste de Wilcoxon, com nível de significância de 0,05, para avaliar se houve diferença estatística entre os grupos testados. O valor P encontrado no teste estatístico aplicado foi 0,753, sendo maior que 0,05, o que revela que não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

7 DISCUSSÃO

7.1 OVINO COMO ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO

Os ovinos são animais ruminantes que apresentam peso médio entre 30 a 80 kg e que têm sido utilizados para experimentação em ortopedia. Segundo Newman et al. (1995) esses animais apresentam estrutura óssea semelhante a dos seres humanos, no que diz respeito a carga que suportam, estrutura, articular e regeneração óssea.

Segundo Kon et al. (2010), devido ao maior peso suportado, os ovinos são vantajosos para experimentação em ortopedia quando comparados aos animais de pequeno porte, como os ratos. Seguindo o mesmo pensamento, pode-se considerar que os ovinos também são vantajosos em estudos de ortopedia quando se tem como objetivo desenvolver técnicas para o uso em grandes animais, como os equinos, por exemplo.

Atualmente, há uma tendência mundial para a diminuição do número de animais para experimentação devido a conscientização da população quanto ao bem estar animal, contudo uma grave redução do número de animais pode influenciar negativamente na avaliação estatística dos resultados. Considerando esses fatores, nesse estudo foram utilizadas 6 ovelhas, que não representa um número grande de animais, mas possibilitou avaliação estatística adequada.

Outro fator a ser considerado na escolha da espécie de experimentação é o custo de manutenção e área para alojamento dos animais e, nesse aspecto, os ovinos levam desvantagem quando comparados com animais de laboratório. Algumas estratégias podem ser utilizadas para diminuir o número de animais em estudos de ortopedia sem prejudicar a avaliação estatística. Segundo Moreira (2014), quando se necessita de avaliação mecânica dos ossos, o uso de ensaios não destrutivos, permite a realização de diversos ensaios utilizando o mesmo espécime, o que diminui significativamente a necessidade de eutanasiar um maior número de animais.

Outra estratégia, como utilizado por Babiker (2013), Marcondes (2014) e Nobrega (2014), é o uso de um membro, como grupo testado e o membro

contralateral, do mesmo animal como grupo controle. Segundo os mesmos autores, esse método também evita variações individuais com relação à resposta ao tratamento estudado, o que aumenta a precisão estatística, e consequentemente reduz a necessidade de grande número de animais. Contudo, em determinados estudos, pode ocorrer interações sistêmicas entre o membro experimentado e o membro controle, por exemplo, quando se utiliza fármacos ou fatores de crescimento na consolidação de falhas ósseas, como citado por Müller et al. (2004).

7.2 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E CIRÚRGICO

Por serem ruminantes, os ovinos necessitam de períodos de jejum hídrico e alimentar superiores a outras espécies de animais para evitar complicações comuns a essa espécie, tais como refluxo gastroesofágico e timpanismo ruminal, neste sentido utilizou-se, neste projeto de pesquisa, o período de 48 horas de jejum alimentar e 12 horas de jejum hídrico, conforme recomendação da literatura (TURNER; MCLLWRAITH, 2002). Seguindo o mesmo protocolo anestésico utilizado por Petrizzi et al. (2007), em estudo com falhas ósseas em ovinos, determinou-se o protocolo anestésico citado anteriormente no capítulo Material e Método, e assim como observado por ele, nesse estudo, o protocolo mostrou-se adequado quanto a analgesia transoperatória.

Pôde-se observar que o período entre o início da anestesia e o início da cirurgia foi de aproximadamente 40 minutos, quando foi feito todo o preparo cirúrgico e preparação do monitoramento anestésico. Esse período não foi considerado longo devido à experiência da equipe e a quantidade de pessoas envolvidas no experimento.

O procedimento cirúrgico em si, teve um tempo médio de 40 minutos. A única dificuldade encontrada durante a realização da técnica proposta, foi que, algumas vezes, a trefina se deslocava no início da perfuração, mas essa dificuldade foi contornada inclinando levemente a perfuradeira no início da perfuração e posteriormente mantendo-a perpendicular ao eixo ósseo. Outra forma de evitar essa dificuldade poderia ser o uso de uma broca ou fresa para realizar a perfuração, como utilizado por Zanetti (2008), contudo esta conduta não foi testada.

O uso da radiografia transoperatória foi de fundamental importância para a determinação correta do local para confeccionar a falha, de modo que evitou prolongamento no período de anestesia e, conseqüentemente diminuiu a possibilidade de complicações anestésicas e erros quanto ao local da falha.

Diversos protocolos analgésicos pós operatórios foram encontrados na literatura em experimentos com falhas ósseas em ovinos, assim como Petrizzi et al. (2006), Kon et al. (2010) e Hahn et al. (2011). No presente estudo foi utilizada fenilbutazona, na dose de 4,4 mg/kg uma vez ao dia, por três dias. Assim como observado pelos autores citados, que utilizaram carprofeno, cetoprofeno e naloxona, o uso da fenilbutazona mostrou-se efetivo, de modo que não foram observados sinais de dor no período pós-operatório, a partir das observações e análises realizadas.

7.3 FALHA ÓSSEA

O tamanho da falha óssea que pode ser produzida varia de animal para animal. As ovelhas toleram falhas maiores quando comparadas a cães e felinos, assim como o tamanho do implante a ser testado (PEARCE et al., 2007). Contudo neste estudo optou-se por avaliar em ovelhas, por se tratarem de animais de grande porte e serem bem aceitos nas comissões científicas.

Diversos autores (NUSS et al., 2006; PICADO; GARCIA, 2007; MARCONDES, 2014) relatam ocorrência de fraturas no período pós operatório de experimentos com criação de falhas ósseas.

Um dos fatores que podem estar relacionados a essas complicações é o tamanho da falha em relação à espessura do osso. Neste estudo foi utilizado falhas de 5 mm de diâmetro no III/IV metacarpianos de ovelhas, que correspondeu a falhas de 34,5% a 38,7% do diâmetro ósseo mensurado no sentido latero-medial e, diferentemente do relatado por Nuss et al. (2006), Picado e Garcia (2007) e Marcondes (2014), não ocorreram fraturas ósseas em nenhum dos animais.

Marcondes (2014), avaliando a biocompatibilidade do compósito de quitosana, hidroxiapatita e colágeno em diáfise proximal de ovinos com falhas ósseas, relatou a ocorrência de fraturas em 25% dos animais. A falha óssea utilizada por Marcondes

(2014) foi unicortical de 7 mm de diâmetro, contudo não relatou a proporção do tamanho da falha em relação ao diâmetro ósseo.

Petrizzi et al. (2007) avaliaram a consolidação óssea após a utilização de naloxana e gluconato de cálcio em ovelhas apresentando peso médio de 56 quilogramas com falhas bicorticais de 4 mm no osso III/IV metacarpianos de ovinos, e não relataram quaisquer problemas em sua avaliação clínica e histológica, nem quanto a possíveis fraturas ao longo do período avaliado. Mesmo não informando o diâmetro dos ossos, o peso médio das ovelhas utilizadas superou o peso médio das ovelhas utilizadas no presente estudo (35 quilogramas), indicando que possivelmente a falha realizada por Petrizzi et al. (2007) foi proporcionalmente inferior a utilizada no atual estudo.

Ao avaliar os tamanhos das falhas utilizadas por Marcondes (2014) e Petrizzi et al. (2007) e as utilizadas no presente estudo, é possível considerar que o tamanho da falha é fundamental na ocorrência de complicações pós operatórias, de modo que a determinação de um padrão auxiliaria na determinação do método para futuras pesquisas.

Marcondes (2014) também relatou dificuldade quanto a contenção destes animais, que possivelmente colaborou com a ocorrência das fraturas. Já Newman et al. (1995) avaliando diferentes espécies de animais para experimentação em osteopenia, considera as ovelhas animais dóceis e fáceis de manusear.

Mesmo com Newman et al. (1995) considerando as ovelhas animais dóceis, deve-se considerar o sistema de criação e raça, pois são fatores que influenciam diretamente no manejo dos ovinos.

Apesar de não ter considerado a docilidade dos ovinos previamente, no presente estudo foram realizados apenas exames clínicos diários, diferentemente do relatado de Marcondes (2014), a qual realizou avaliação radiográfica, ultrassonográfica e termográfica em tempos pré-determinados. Dessa forma, além do tamanho da falha, a necessidade de maior manipulação diária dos animais, provavelmente predispõe à ocorrência de acidentes.

7.4 PÓS OPERATÓRIO E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

O acompanhamento clínico dos animais permitiu avaliá-los, onde observou-se pouco edema no local da falha, não demonstraram dor à palpação, nem observou-se secreção ou deiscência da ferida de pele. Também não foi notado claudicação e os animais apresentavam-se confortáveis, sem sinais de dor.

Segundo a literatura diversos protocolos podem ser utilizados para eutanásia de ovinos, como o utilizado por Viateua et al. (2007) e Hahn et al. (2011) que necessitaram de eutanásia em seus estudos. Esses autores utilizaram apenas altas doses de barbitúricos (60mg/kg/IV) para que ocorresse intoxicação dos ovinos.

A eutanásia de todos os animais do presente estudo fora realizada em conformidade com a Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo de número 2962/2013). Considerando o protocolo utilizado, em todos os animais ocorreu a descensibilização previamente a aplicação do cloreto de potássio, e a parada cardiorrespiratória ocorreu aproximadamente 30 segundos após, sem apresentar quaisquer intercorrência durante o procedimento.

7.5 PREPARO DAS PEÇAS

Logo após a eutanásia dos animais, o III/IV metacarpianos dos ovinos foram desarticulados na região proximal e distal e dissecados com o objetivo de isolar apenas o tecido ósseo. A dissecação foi realizada por meio de uma incisão na face dorsal dos ossos por toda sua extensão, remoção de tecidos tendíneos, ligamentosos e capsulares restando, portanto, apenas o tecido ósseo, assim como realizado Müller et al. (2004) em tíbias de ratos.

Após a dissecação o osso foi o congelado em *freezer* envolvido em compressa umedecida com solução fisiológica e posteriormente descongelada para o ensaio mecânico, como descrito anteriormente. Esse método possibilitou a otimização do uso do laboratório, pois todos os ensaios foram realizados no mesmo dia, mesmo com a criação das falhas realizadas em momentos diferentes. Essa mesma

otimização dos ensaios mecânicos também foi relatada por Moreira (2014) avaliando mecanicamente o preenchimento de falhas em terceiro metacarpiano de equinos.

Segundo An e Bensen (2000) e Frankel e Nordin (2014) todas as formas de armazenamento podem alterar as propriedades mecânicas do osso, principalmente devido a desidratação e desnaturação protéica. Devido a esse fato, optou-se pelo descongelamento dos ossos submersos em solução fisiológica dentro de caixas térmicas, de modo que o descongelamento ocorreu em aproximadamente 12 horas, evitando, assim a desidratação e aumento repentino de temperatura.

7.6 ENSAIO BIOMECÂNICO

Os testes biomecânicos podem ser realizados com diversas funcionalidades, sendo para testar implantes, interface osso/implante e avaliar a consolidação de fraturas (DALMOLIN et al., 2013). Portanto a avaliação mecânica é considerada apenas uma das ferramentas para avaliar a consolidação óssea, sendo que foi com este propósito, a ferramenta escolhida no presente estudo.

O osso é considerado um material anisotrópico, que por definição, é um material que se comporta diferentemente na dependência da carga a ele submetida. Dessa forma, diferentes tipos de ensaios mecânicos podem ser utilizados para avaliar o tecido ósseo, tais como ensaios de compressão, tração, torção, flexão, entre outros. No presente estudo foram utilizados apenas ensaios de flexão em três pontos.

Inicialmente o objetivo era a utilização de ensaios de flexão em quatro pontos, como utilizados por Florin et al. (2005) e Emi (2014). Contudo, em ensaios piloto realizados, observou-se a fratura óssea ocorria no ponto de contato do osso com o atuador, distante da falha óssea, ilustrando que a maior concentração de carga não estava ocorrendo no local da falha. Por esse motivo, optou-se pela realização do ensaio de flexão em três pontos com o atuador aplicando a carga diretamente sobre a região da falha, como descrito por Müller et al. (2004), e após novo ensaio piloto, notou-se que a fratura ocorria no local da falha.

Devido à anatomia do osso escolhido, não foi necessário nenhum dispositivo de fixação do osso à máquina de ensaios, pois a superfície palmar plana desse osso

apoiava-se perfeitamente nos apoios metálicos, de modo que o osso permanecia bem fixo ao longo do ensaio.

7.7 A UTILIZAÇÃO DO COMPÓSITO A BASE DE QUITOSANA, HIDROXIAPATITA E COLÁGENO NO TECIDO ÓSSEO

O trabalho de Amaral (2006) e Marcondes (2014) apresenta a mesma formulação que o compósito utilizado neste estudo, mas estes autores avaliaram a biocompatibilidade no tecido subcutâneo de ratos e a osteointegração e biocompatibilidade em falhas ósseas de ovelhas, respectivamente.

Segundo Munhoz et al. (2014) o colágeno se destaca para formação de compostos osteocondutores por ser um componente orgânico natural do osso. Assim como o colágeno, a hidroxiapatita também é um componente natural do tecido ósseo e, segundo Amaral (2006) é um material ideal para formulação de compósitos.

A quitosana pode ser associada a diversos biomateriais para formação de compósitos com diferentes propriedades mecânicas e aplicação em diferentes locais do organismo, assim como Martins (2010) que avaliou o uso de hidrogel de quitosana em defeitos osteocondrais em equinos, e Moreira (2014) que utilizou a quitosana associada ao trifosfato de cálcio para formação de compósito rígido para aplicação em locais de demanda mecânica. Devido às características particulares de cada biomaterial, no presente estudo optou-se por associar os três biomateriais.

Diversos trabalhos citam diferenças na consolidação óssea com o uso de biomateriais, assim como Viateau et al. (2007) e Dornbusch et al. (2010), sendo que avaliação mecânica é uma ferramenta importante para avaliar a consolidação óssea, no que diz respeito a resistência mecânica do tecido ósseo, como citado por Müller et al. (2004) e Zanetti (2008).

Marcondes (2014) avaliou a consolidação de falhas ósseas de ovelhas, após enxerto com o mesmo compósito utilizado no presente trabalho por meio histologia, termografia, radiologia e ultrassonografia. Observou que com 60 dias o compósito não apresentou rejeição e permitiu a invasão de tecido ósseo, comportando-se como

material osteocondutor. Contudo não quantificou a evolução da reparação óssea e não avaliou a resistência óssea após esse período.

Já Munhoz et al. (2014) citaram a baixa capacidade osteogênica de blendas de quitosana, hidroxiapatita e colágeno devido à permanência do defeito ósseo em falhas criadas na calvária de ratos preenchidos com blendas, os autores citaram que não houve a osteointegração em virtude da presença de tecido conectivo em grande quantidade na região central do implante, após 8 semanas da implantação.

Mesmo utilizando o mesmo biomaterial e períodos semelhantes de avaliação histológica, é possível observar grandes diferenças entre os resultados de Marcondes (2014) e Munhoz et al. (2014). Esse fato provavelmente se deve a diferença entre as espécies utilizadas para experimentação.

Utilizando o mesmo material para preenchimento de falhas que Marcondes (2014), no presente estudo foi realizada a avaliação mecânica dos ossos III/IV metacarpianos de ovinos, por meio de ensaio de flexão em três pontos. Observou-se que os ossos testados se comportaram biomecanicamente iguais aos ossos do grupo controle. Esse fato provavelmente se deu devido à intensa consolidação óssea observada aos 180 dias, o que corrobora com os achados de Marcondes (2014) que mostraram que o biomaterial testado permite a consolidação óssea.

Neste projeto de pesquisa, na análise macroscópica, todas as falhas apresentaram-se preenchidas por tecido ósseo e invaginação do perióstio para dentro da falha, o que dificultou a identificação da falha tanto no membro controle, quanto no membro com biomaterial. O mesmo foi observado por Nóbrega (2014) ao avaliar o preenchimento de falhas ósseas no terceiro metacarpiano de equinos com poliuretano de mamona. Essa invaginação do perióstio para dentro da falha corrobora com a grande capacidade osteogênica do perióstio citado por Getty (1986).

Na avaliação dos resultados foi possível observar uma grande variação dos valores máximos e mínimos em todas as grandezas avaliadas (força máxima, rigidez, deformação máxima e momento de deflexão). Essa variação provavelmente se deu devido diferença do tamanho dos animais utilizados no estudo. Como em todos os casos, o membro tratado pertencia ao mesmo animal do membro controle, a análise estatística foi pareada, de modo que esta diferença de porte dos animais não influenciou os resultados e não houve diferença entre os grupos.

8 CONCLUSÃO

Conclui-se que o compósito a base de quitosana, hidroxiapatita e colágeno não interferiu nas propriedades biomecânicas, assim como, rigidez, momento, força máxima e deformação máxima dos ossos III/IV metacarpianos de ovinos, quando avaliados por teste de flexão em três pontos, 180 dias após a realização do procedimento cirúrgico.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, G. S.; SHIMANO, A. C.; PICADO, C. H. F. Ação da atividade física sobre as propriedades mecânicas dos fêmures e tíbias de ratas osteopênicas. **Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal**, v. 14, n. 5, p. 242-245, 2006.

AMARAL, M. B. **Citotoxicidade in vitro e biocompatibilidade in vivo de compósitos a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

AMENDOLA, G. F.; RAISER, A. G.; SOARES, J. M. D.; BECKMANN, D. V. Aspectos biomecânicos compressivos de diáfises femorais caninas conservadas em glicerina a 98% ou em mel. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1341-1345, 2007.

AN, Y. H.; DRAUGHN, R. A. **Mechanical testing of bone and the bone-implant interface**. New York: CRC Press. 2000. p. 87-102.

AUER, J. A.; VON RECHENBERG, B.; BOHNER, M.; HOFMANN-AMTENBRINK, M. Bone grafts and bone replacements. In: AUER, J. A.; STICK, J. A. **Equine surgery**. 4th ed. St. Louis: Elsevier, 2012. p.1081-1095.

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

BARROS, R. V.; CAL ABAD, C. C.; DAL'MOLIN KISS, M. A. P.; SERRÃO, J. C. Massa óssea e atividade física na infância e adolescência. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 7, n. 1, p. 109-118, 2008.

BELLOTTI, J. C.; TAMACHI, M. J. S. Propêutica do osso. In: BELLOTTI, J. C.; TAMAOKI, M. J. S. **Propêutica ortopédica e traumatológica**. Porto Alegre: Artmed, 2013. Cap. 3, p. 39-45.

CALORI, G. M.; MAZZA, E.; COLOMBO, M.; RIPAMONTI, C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? **Journal of Care Injured**, v. 42, p. 56-63, 2011.

CAVASSANI, M. M.; MORAES, J. R. E.; FILHO, J. G. P. Função osteoindutora de fragmentos ósseos conservados em glicerina a 98%. Estudo experimental em ratos. **Ciência Rural**, v. 31, n. 3, p. 445-448, 2001.

CURCELLI, E. C. **Efeito da heparina sódica e da enoxaparina na consolidação de fratura de tibia do rato**: avaliação clínica, anatomopatológica e biomecânica. 1999. 140 f. Dissertação (Mestre em Cirurgia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 1999.

DALMOLIN, F.; FILHO, S. T. L. P.; CORTES, A. M.; BRUN, M. V.; CAUDURU, C. R.; SCHOSSLER, J. E. W. Biomecânica óssea e ensaios biomecânicos- fundamentos teóricos. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1675-1682, 2013.

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

DORNBUSCH, P. T.; ARAUJO, I. G. R.; TASQUETTI, U. I.; PIMPÃO, C. T. PRADO, A. M. B.; HUSSNI, C. A. Avaliação radiográfica da aplicação do polímero de mamona em falhas ósseas induzidas em equinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 15, n. 1, p. 01-08, 2010.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. Aparelho locomotor. In:_____. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v. 1, Cap. 2, p. 32-39.

EMI, E. T. P. **Caracterização das propriedades mecânicas de osso irradiado, utilizando ensaios destrutivos e não destrutivos**. 2014. 52 f. Dissertação (Mestre em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

FLORIN, M.; ARZDORF, M.; LINKE, B.; AUER, J. A. Assessment of Stiffness and Strength of 4 Different Implants Available for Equine Fracture Treatment: A Study on a 20°Oblique Long-Bone Fracture Model Using a Bone Substitute. **Veterinary Surgery**, v. 34, p. 231–238, 2005.

FRAJACOMO, F. T. T.; FALCAI, M. J.; FERNANDES, C. R.; SHIMANO, A. C.; GARCIA, S. B. Adaptações Biomecânicas do osso cortical de camundongos submetidos a três diferentes modalidades de exercício. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 328-332, 2013.

FRANCO, K. L.; BORGES, A. P. B.; VILÓRIA, M. I. V.; FERNANDES, E. S.; FEHLBERG, A. F. Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita sintética associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tíbia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 4, p. 1-7, 2001.

GETTY, R. Osteologia. In:_____. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. Cap. 1, p. 19-33.

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

HEINI, P. F.; BERLEMANN, U.; KAUFMANN, M.; LIPPUNER, K.; FANKHAUSER, C.; LANDUYT, P. Augmentation of mechanical properties in osteoporotic vertebral bones

– a biomechanical investigation of vertebroplasty efficacy with different bone cements. **European Spine Journal**, v. 10, p. 164–171, 2001.

HOLANDA, A. J. **Estudos dos efeitos da orientação das fibras de colágeno nas propriedades mecânicas de flexão e de impacto dos ossos**. 1999. 55 f. Mestre (Mestre em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.

KESSLER, S.; WOHLFART, M.; IGNATIUS, A.; PUHL, W.; CLAES, L.; GUNTHER, K. P. Histomorphological histomorphometrical and biomechanical analysis of ceramic bone substitutes in a weight-bearing animal model. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 13, n. 2. p. 191-195, 2002.

KON, E.; MURAGLIA, A.; CORSI, A.; BIANCO, P.; MARCACCI, M.; MARTIN, I.; BOYDE, A.; RUSPANTINI, P.; CHISTOLINI, I. P.; ROCCA, M.; GIARDINO, R.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 49. p. 328-337, 2000.

KON, E.; FILARDO, G.; DELCOGLIANO, M.; FINI, M.; SALAMANNA, F.; GIAVARESI, G.; MARTIN, I.; MARCACCI, M. Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 11, n. 220, p. 1-12, 2010.

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

KONG, L.; AO, Q.; WANG, A.; GONG, K.; WANG, X.; LU, G.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Preparation and characterization of a multilayer biomimetics scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 22, p. 223-239, 2007.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

LIU, H.; LI, H.; CHENG, W.; YANG, Y.; ZHU, M.; ZHOU, C. Novel injectable calcium phosphate/chitosan composites for bone substitute materials. **Acta Biomaterialia**, n. 2, p. 557-565, 2006.

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

LU, J. X.; ABOUT, I.; STEPHAN, G.; LANDUYT, P.; DEJOU, J.; FIOCCHI, M.; LEMAITRE, J.; PROUST, J. P. Histological and Biomechanical Studies of Two Bone Colonizable Cements in Rabbits. **Bone**, v. 25, n. 2, p. 41–45, 1999.

MARCONDES, G. M. **Avaliação da interação biológica entre compósito de quitosana, colágeno e hidroxiapatita e tecido ósseo ovino**. 2014. 175 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MARKEL, M. D. Fracture biomechanics. In: NIXON, A. J. **Equine fracture repair**. Philadelphia: Saunders, 1996. p.10-18.

MARTINS, C. A. Q. **Estudo da resistência de ossos submetidos a processo de reparação induzidos por biomateriais e enxerto homólogo**. 2001. 68 f. Dissertação (Mestrado em Educação Física) - Universidade do Estado de Santa Catarina, 2001.

MARTINS, E. A. N. **Estudo da biocompatibilidade do gel de quitosana associada ao fosfato de glicerol para reparação de defeitos osteocondrais induzidos experimentalmente na tróclea do tallus de equinos**. 2010. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MILLIS, D. L.; MARTINEZ, S. A. Bone grafts. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 3. ed. Philadelphia : Saunders, 2003. Cap. 133, p. 1875-1891.

MOREIRA, R. C. **Estudo biomecânico do terceiro metacarpiano de equinos**. 2008. 55 f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

MÜLLER, S. S.; CURCELLI, E. C.; SARDENBERG, T.; ZUCCON, A.; JÚNIOR, J. L. C.; PADOVANI, C. R. Análise clínica e biomecânica do efeito do diclofenaco de sódico na consolidação da fratura da tíbia do rato. **Act Ortopédica Brasileira**, v. 12, n. 4, p. 197-204, 2004.

MUNHOZ, M. A. S.; HIRATA, H. H.; MACHADO, E. G.; CUNHA, M. R.; PLEPIS, A. M. G.; YOSHIOKA, S.; MARTINS, V. C. Estudo experimental do reparo de defeitos ósseos cranianos de ratos com blendas poliméricas de colágeno, quitosana e hidroxiapatita. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 24., 2014, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2014.

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

NEWMAN, E.; TURNER, A. S.; WARK, J. D. The potential of sheep for the study of osteopenia: Current status and comparasion with other animal models. **Bone**, v. 16, n. 4, p. 277-284, 1995.

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

NORDIN, M.; FRANKEL, V. H. Biomecânica do osso. In: NORDIN, M.; FRANKEL, V. H. **Biomecânica básica do sistema músculo esquelético**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 21-50.

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

ÖZKAYA, N.; LEGER, D. Introdução à Biomecânica / Terminologia e Conceitos Básicos. In: NORDIN, M.; FRANKEL, V. H. **Biomecânica básica do sistema músculo esquelético**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 2-17.

PANJABI, M. M. Biomechanical evaluation of spinal fixation devices: I. A conceptual framework. **Spine**, v. 13, n. 10, p. 1129-1134, 1988.

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

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

PETRIZZI, L.; MARISCOLI, M.; VALBONETTI, L.; VARASANO, V.; LANGHOFF, J. D.; VON RECHENBERG, B. Preliminary study on the effect of parenteral naloxone, alone and in association with calcium gluconate, on bone healing in an ovine “drill hole” model system. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 8, n. 43, p. 1-9, 2007.

PICADO, C. H. F.; GARCIA, F. L. Correção de falhas ósseas diáfisárias: transporte ósseo fixado com placa. **Act Ortopédica Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 47-49, 2007.

RABEA, E. I.; BADAWEY, M. E. T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; WALTER STEURBAUT, W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. **American Chemical Society**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

REIS, R. L.; TUZLAKOGLU, K.; BAAS, E.; YANG, Y.; EL HAJ, A.; CUNHA-REIS, C. Influence of porosity and fibre diameter on the degradation of chitosan fibre mesh scaffolds and cell adhesion. **Journal of Materials Science: materials in medicine**, v. 18, p. 195-200, 2007.

SOD, G. A.; MITCHELL, C. F.; HUBERT, J. D.; MARTIN, G. S.; GILL, M. S. In vitro biomechanical comparison of locking compression plate fixation and limited-contact dynamic compression plate fixation of osteotomized equine third metacarpal bones. **Veterinary Surgery**, v. 37, n. 3, p. 283–288, 2008.

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

STEFANES, S. A.; FILHO, J. G. P.; OLIVEIRA, B. J. N. A.; SHIMANO, A. C.; PAULIN, J. B. P.; VOLPON, J. B. Padronização de modelo para testes biomecânicos com coluna vertebral cervical de suínos. **Veterinária Notícias**, v. 15, n. 1, p. 51-58, 2009.

STEVENSON, A. Enxertos ósseos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. v. 2, cap. 127, p. 2006-2017.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering application. **Journal Royal of the Society Interface**, v. 6, p. 311-324, 2009.

TENCER, A.; HOLMES, R.; MOONEY, V.; BUCHOLZ, R. A coralline hydroxyapatite bone graft substitute. preliminary report. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 188, p. 252-262, 1984.

TONHI, E.; PLEPIS, A. M. G. Obtenção e caracterização de blendas de colágeno-quitosana. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.

TURNER, A. S.; MCLLWRAITH, C. W. Anestesia e fluidoterapia no animal de grande porte-paciente cirúrgico. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo: Roca, 2002. Cap. 2, p. 9-40.

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

VITAL, C. C.; BORGES, A. P. B.; FONSECA, C. C.; TSIOMIS, A. C.; CARVALHO, T. B.; FONTES, E. B.; SENA, M. P.; FÓFANO, G. Biocompatibilidade e comportamento de implantes de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 175-183, 2006.

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

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

ZABEU, J. L. A.; MERCADANTE, M. T. Substitutos ósseos comparados ao enxerto ósseo autólogo em cirurgia ortopédica – Revisão sistemática da literatura. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 43, n. 3, p. 59-68, 2008.

ZANETTI, L. S. S. **Avaliação da interface osso/implante após o uso de copolímero de PLA/PGA associado a osso autógeno em coelhos. Estudo biomecânico e imunohistoquímico.** 2008. 83 f. Tese (Doutor em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

ZHANG, Y.; ZHANG, M. Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 61, n. 1, p. 1-8, 2002.

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