

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**

**CHRISTIANO PAVAN MATEUS**

**Avaliação do Composto Ósseo de Ricinus (C.O.R.) granulado e Hidroxiapatita (HAP-91) na osteointegração. Estudos: histológico, morfométrico e densitométrico.**

São Carlos  
2013

CHRISTIANO PAVAN MATEUS

**Avaliação do Composto Ósseo de Ricinus (C.O.R.) granulado e Hidroxiapatita (HAP-91) na osteointegração. Estudos: histológico, morfométrico e densitométrico.**

Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de materiais

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice

São Carlos  
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,  
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS  
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

M425a Mateus, Christiano Pavan  
Avaliação do Composto Ósseo de Ricinus (C.O.R.)  
granulado e hidroxiapatita (HAP-91) na osteointegração.  
Estudos: histológico, morfométrico e densitométrico. /  
Christiano Pavan Mateus; orientador Prof. Dr. Gilberto  
Orivaldo Chierice. São Carlos, 2013.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em  
Ciências e Engenharia de Materiais e Área de  
Concentração em -- Escola de Engenharia de São Carlos  
da Universidade de São Paulo, 2013.

1. C.O.R. granulado. 2. HAP-91. 3. histologia. 4.  
morfometria. 5. densitometria. 6. software. I. Título.

## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Médico Veterinário **CHRISTIANO PAVAN MATEUS**.

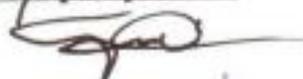
Título da tese: "Avaliação do composto ósseo de ricinus (C.O.R.) granulado e hidroxiapatita (HAP-91) na osteointegração. Estudos: histológico, morfométrico e densitométrico."

Data da defesa: 06/11/2013

### Comissão Julgadora:

### Resultado:

Prof. Titular **Gilberto Orivaldo Chierice (Orientador)**  
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC)

Aprovado  


Profa. Dra. **Ana Maria Minarelli Gaspar**  
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Araraquara)

APROVADO  

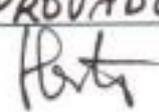

Dr. **Salvador Claro Neto**  
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC)

APROVADO  


Prof. Dr. **Mario Jefferson Quirino Louzada**  
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Araçatuba)

APROVADO  


Prof. Titular **Luciano da Fontoura Costa**  
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

APROVADO  


Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de  
Materias:

Prof. Titular **Waldek Wladimir Bose Filho**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos, dentro de um contexto normativo, sempre nos trarão interrogações, são muitas as pessoas que estão nesse contexto.

À Conspiração Universal, na idealização de um trabalho conclusivo-informativo.

À minha família, principalmente à minha mãe, companhia das conversas no almoço com aquele cafezinho esperto, e pela sua óptica do filho ter chegado lá.

Ao grupo do Biotério, integrado por mãos zelosas nos cuidados dos nossos “amiguinhos”, que nos proporcionam títulos acadêmicos.

À Fabiana Moraes, companheira e colaboradora da Clínica Veterinária *Quatro Patas*, ajudando na instrumentação cirúrgica e nos cuidados pós-cirúrgicos dos nossos “amiguinhos”.

Ao Professor e Orientador Doutor Gilberto Orivaldo Chierice, pela oportunidade de minha expansão volumétrica no conhecimento

Ao Colaborador Doutor Salvador Claro Neto do Instituto de Química de São Carlos, por sua presença serena.

À Professora Doutora Ana Maria Minarelli Gaspar da Faculdade de Odontologia de Araraquara –UNESP, por sua grandiosa colaboração no estudo histológico.

Ao Professor Doutor Mário Jefferson Quirino Louzada da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, por sua imensa colaboração e alavanca no estudo imagiológico.

Aos Técnicos do Laboratório de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pela preparação das peças cirúrgicas e pela montagem das lâminas.

Ao Antonio José Reimer, o Toninho do Instituto de Química (Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros), por sua presença.

Ao Professor Doutor Luciano da Fontoura Costa do Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de compartilhar meus ensejos na busca imagiológica.

No contexto geral, todas as pessoas em agradecimento, são grandes veias irrigando o centro, fazendo com que se nutram as emoções e razões afloradas pelo ensejo de descobrir uma nova faceta temporal.

## EPIGRAFE

“É fundamental diminuir a distância entre o que se diz e o que se faz, até que, num dado momento, a tua fala seja a tua prática.”

*Paulo Freire*  
(1921-1997)

## RESUMO

MATEUS, C. P. ***Avaliação do Composto Ósseo de Ricinus (C.O.R.) granulado e Hidroxiapatita (HAP-91) na osteointegração. Estudos: histológico, morfométrico e densitométrico.*** 2013. 81f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais - EESC/IFSC/IQSC da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

No estudo da osteointegração, os resultados adquiridos através dos *softwares* analisadores de imagens contribuirão para que se tenha uma melhor visualização da interface tecido biológico/material implantado. O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de estudos histológico, morfométrico e densitométrico, as interfaces tecido ósseo/materiais implantados em comparação com o grupo controle (coágulo), descrevendo qualitativa e quantitativamente os resultados dessas análises. Foram selecionados 16 coelhos, *Oryctolagus cuniculus*, com idade de 90 dias, sendo estes divididos em quatro grupos de quatro animais (G1, G2, G3 e G4), com períodos pós-operatórios de sete, 15, 21 e 35 dias. Em cada animal, foram feitos dois defeitos ósseos nas tíbias direitas, preenchidos com o biomaterial Composto Ósseo de Ricinus (C.O.R.) granulado e o Grupo Controle (coágulo); na tíbia esquerda, preencheu-se com o biomaterial Hidroxiapatita (HAP-91). Após a eutanásia, as peças cirúrgicas foram removidas, identificadas e submetidas às análises. A análise histológica evidenciou, para os dois biomateriais, um grande aporte de células osteoprogenitoras e, com o avanço dos períodos experimentais, a deposição de um tecido ósseo mais desenvolvido. Estes resultados qualitativos corroboraram com a análise morfométrica, evidenciando a osteointegração pela aproximação das corticais ósseas. Com o estudo densitométrico, pôde-se acompanhar, por imagens tridimensionais e coloridas, o desempenho de cada biomaterial implantado e o grupo controle com o tecido ósseo. Concluiu-se que os dois biomateriais implantados se comportam de uma maneira muito desejável para que se constituam como uma escolha de materiais substitutos da reposição óssea.

Palavras-chave: C.O.R. granulado, HAP-91, histologia, densitometria, morfometria, software

## ABSTRACT

MATEUS, C. P. ***Evaluation of Compound Bone of granulated Ricinus (C.O.R.) and Hydroxyapatite (HAP-91) on the osseointegration in rabbits. Studys: histological, morphometric and densitometric.*** 2013. 81f. Thesis (Doctoral). Graduate Program in Science and Materials Engineering - EESC / IFSC / IQSC at the University of São Paulo, São Carlos, 2013.

In the study of osseointegration, the results acquired through the images analysis softwares, contribute in order to have a better view of the biological tissue/ material implanted interface. The aim of this study was to evaluate through studies: histological, morphometric and densitometric, the interactions of bone tissue / implanted materials in comparison with the control group (clot), and describing qualitatively and quantitatively the results of these analyzes. Were selected 16 rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, with 90 days of age and divided into four groups of four animals (G1, G2, G3 and G4), and postoperative periods of seven, 15, 21 and 35 days. In each animal, two bone defects were made on the right tibia, and were filled with the (C.O.R.) Compound Bone of granulated Ricinus biomaterial and control group (clot); and in the left tibia, filled it with (HAP-91) Hydroxyapatite biomaterial. After euthanasia, the tibial bone was removed, identified and submitted for analyzes. The histological analysis showed for both biomaterials, a large amount of osteoprogenitor cells and, with the advancement of the experimental periods, the deposition of more developed bone tissue. These qualitative results corroborated with the morphometric analysis, showing the osseointegration by approximation of the cortical bones. With the densitometric study, could be accompanied, by three-dimensional images and colorful, the performance of each implanted biomaterial and the control group with the bone tissue. It was concluded that both implanted biomaterials behave in a manner very desirable to be constituted as a choice of substitute materials for the bone replacement.

Keywords: granulated C.O.R., HAP-91, histology, densitometry, morphometry, software

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	08
2 OBJETIVO.....	10
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	11
3.1 Implante Composto Ósseo de Ricinus granulado (C.O.R.) .....	11
3.2 Implante Hidroxiapatita (HAP-91).....	11
3.3 Estudo Histológico.....	11
3.3.1 Estudo Histológico – Composto Ósseo de Ricinus granulado (C.O.R.) ....	14
3.3.2 Estudo Histológico - Hidroxiapatita ( HAP-91).....	16
3.4 Estudo Morfométrico .....	18
3.5 Estudo Densitométrico .....	23
4 MATERIAL .....	25
4.1 Apresentação dos materiais-implantes.....	25
4.2 Animais do experimento .....	27
5 MÉTODOS .....	27
5.1 Grupos experimentais .....	27
5.2 Procedimentos pré e pós-operatórios.....	28
5.3 Protocolo anestésico .....	28
5.4 Procedimento cirúrgico.....	29
5.5 Eutanásia .....	33
5.6 Fluxograma das peças cirúrgicas.....	33
5.6 Procedimento Radiográfico .....	33
5.6 Procedimento Histológico.....	34
5.6 Procedimento Morfométrico .....	34
5.6 Análise Estatística .....	35
5.6 Procedimento Densitométrico .....	35
6 RESULTADOS .....	36
6.1 Avaliação clínica.....	36
6.2 Avaliação histológica .....	36
6.2.1 Grupo experimental G1 (7 dias) .....	36
6.2.1.1 Composto Ósseo de Ricinus granulado (C.O.R.) .....	35
6.2.1.2 Hidroxiapatita (HAP-91).....	38
6.2.1.3 Controle.....	41
6.2.2 Grupo experimental G2 (15 dias) .....	42
6.2.2.1 Composto Ósseo de Ricinus granulado (C.O.R.).....	42
6.2.2.2 Hidroxiapatita (HAP-91).....	44
6.2.2.3 Controle.....	46
6.2.3 Grupo experimental G3 (21 dias) .....	48
6.2.3.1 Composto Ósseo de Ricinus granulado (C.O.R.).....	48
6.2.3.2 Hidroxiapatita (HAP-91).....	49
6.2.3.3 Controle.....	51
6.2.4 Grupo experimental G4 (35 dias) .....	53
6.2.4.1 Composto Ósseo de Ricinus granulado (C.O.R.).....	53
6.2.4.2 Hidroxiapatita (HAP-91).....	54
6.2.4.3 Controle.....	56
6.3 Avaliação Morfométrica.....	57

6.4 Avaliação Densitométrica .....	60
7. DISCUSSÃO .....	61
8. CONCLUSÕES .....	69
REFERÊNCIAS .....	70
ANEXO A- Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal .....	76
APÊNDICE A - Protocolo Histológico .....	77
APÊNDICE B - Metodologia Densitométrica .....	78

## 1 Introdução

Na Medicina Veterinária, assim como na Medicina e na Odontologia, as pesquisas que tangem à busca pela compreensão da atividade do material implantado com o tecido biológico, necessitam de resultados detalhados desta interação interfacial.

O estudo histológico é apresentado como uma técnica minimamente detalhista no monitoramento dos componentes celulares presentes na formação tecidual.

A resposta do tecido ósseo a uma lesão consiste em uma sequência histológica definida, ordenada e bem diferenciada de arranjos morfológicos, dos quais resulta a cicatrização do tecido ósseo lesionado; após passar por esse processo, o tecido ósseo apresenta uma forma bastante semelhante à sua estrutura inicial (NACER, 2009).

Empregar substâncias químicas que facilitem a reparação óssea por meio de processos de osteogênese, osteoindução e osteocondução, é alvo de pesquisas constantes (LEGEROS, 2002).

Os biomateriais, sejam de preparados ósseos de material natural ou sintético, apresentam as propriedades requeridas de um material composto do osso ideal, as quais sejam: biocompatibilidade, biodegradabilidade, habilidade de iniciar a osteogênese, composição e propriedades mecânicas similares àquelas do osso, além de serem tolerados de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos vitais (MORAES, 2002).

O contato do biomaterial com o tecido biológico através da interface irá influenciar uma resposta celular/tecidual, ativando, assim, a sequência ordenada e diferenciada do arranjo morfológico, e obtendo resultados detalhados (CAMPOS, 2007).

Segundo Grassi (2006), compreender o comportamento da célula frente ao biomaterial é altamente relevante para a compreensão do fenômeno de osteointegração, no qual a diferenciação celular, a formação de matriz osteoide e a subsequente mineralização desta são necessárias na formação da interface.

A osteointegração é vista como um contato muito próximo entre osso e implante, e o interesse pela engenharia de superfície tem sido entendido como uma tendência natural e importante. A resposta tecidual óssea - a qual abrange taxa,

quantidade e qualidade - está relacionada com as propriedades importantes da superfície do implante. Como exemplo, a sua composição é crítica para a adsorção de proteínas e a adesão celular (NOVAES Jr. et al., 2010).

O procedimento histológico, juntamente com a análise morfométrica, corroboram na obtenção de resultados em que se deseja avaliar a interface tecido ósseo/material implantado na ocorrência da neoformação óssea.

Morfometria é definida como a análise quantitativa dos componentes da morfologia óssea, tais como volume, área, perímetro e espessura. As medidas morfométricas expressam a quantidade de tecido ósseo e as taxas de formação e reabsorção óssea (VICENTINI, 2006).

A importância desse tipo de análise também foi confirmada nos estudos de Grandi (2007), relatando ser a análise quantitativa essencial para estudos que objetivam avaliar a efetividade de novas modalidades terapêuticas na neoformação óssea.

Em um contexto qualitativo, uma análise embasada na ciência radiológica poder ser empregada. Na medida em que é uma técnica de monitoria visual da arquitetura óssea, possibilita-se, dessa forma, a visualização da estrutura óssea gerada pelo filme radiográfico.

Esse recurso tem ganhado maior atenção com o advento da ciência da computação, com direcionamento especial à densitometria, que interpretará qualitativamente o teor mineral ósseo do filme radiográfico por meio da medição da densidade óptica, a qual apresentará imagens tridimensionais e coloridas (LOUZADA, 1998).

Estudos da avaliação densitométrica de processos fisiológicos normais e de situações que possam afetar a qualidade do tecido ósseo têm sido realizados quantitativamente, como a correlação da idade cronológica com a densidade óssea, a ação de medicamentos no metabolismo ósseo, as alterações hormonais e as condições patológicas (LOUZADA et al., 2001).

Mediante o que foi pesquisado, este estudo avalia as informações histológicas e suas derivações no contexto de imagens computacionais, complementando-as com a análise qualitativa no uso da imagem digitalizada, para que se tenha uma melhor compreensão das interações interfaciais tecido ósseo/materiais implantados em comparação com o grupo controle. Os resultados obtidos são interpretados e apresentados por análise descritiva qualitativa e quantitativa.

## **2 Objetivo**

Analisar as interações interfaciais tecido ósseo/materiais implantados [Composto Ósseo de Ricinus (C.O.R.) Granulado e Hidroxiapatita (HAP-91)], comparando-as com o Grupo Controle (coágulo), além de apresentar, por meio de análises histológica, morfométrica e densitométrica, os resultados qualitativos e quantitativos.

### **3 Revisão da Literatura**

#### **3.1 Implante Composto Ósseo de Ricinus (C.O.R.) Granulado**

O Composto Ósseo de Ricinus (C.O.R.) granulado, por apresentar, em suas características de formulação, propriedades que poderiam ser importantes no campo de materiais da reconstrução do tecido ósseo, foi caracterizado pelo Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros (GQATP) da Universidade de São Paulo pelos seguintes processos: análise termoanalítica (MATEUS, 2009); calorimetria exploratória diferencial (DSC); análise termogravimétrica (TGA) e análise dinâmico-mecânica (DMA); difratograma de raios-X; ensaios de tração, compressão e dureza (AZEVEDO et al., 2009); microscopia de luz (MATEUS, 2010); tomografia computadorizada, e imuno-histoquímica (SARAN, 2011).

O uso dessas técnicas mostrou que o material polimérico – Composto Ósseo de Ricinus (C.O.R.) granulado – possui atividade osteocondutora, propiciando a osteogênese e as propriedades mecânicas requeridas, como ressalta Claro Neto (1997).

#### **3.2 Implante Hidroxiapatita (HAP-91)**

A Hidroxiapatita apresenta semelhança química com os tecidos ósseo e dentário, o que motivou o grupo de pesquisa do laboratório JHS<sup>®</sup> a sintetizar, a partir do calcário, a biocerâmica hidroxiapatita (HAP-91<sup>®</sup>), material empregado na reconstituição óssea. As técnicas utilizadas para a sua caracterização foram: difração de raios-X; espectrofotometria de energia dispersiva; infravermelho; espectroscopia de absorção atômica; microscopia de luz, e microscopia eletrônica de varredura, transmissão e retrodispersão (BICALHO et al., 2008).

No estudo de Duarte et al. (2006), relatou-se que a hidroxiapatita atua como um substrato para a osteogênese, classificando-a como um material osteocondutivo.

#### **3.3 Estudo Histológico**

A resposta do tecido ósseo a uma lesão consiste em uma sequência histológica definida, ordenada e bem diferenciada de arranjos morfológicos, dos

quais resulta a cicatrização do tecido ósseo lesionado, o qual apresenta uma forma bastante semelhante à sua estrutura inicial (NACER, 2009).

O processo natural do reparo do tecido ósseo inicia-se imediatamente após a lesão tecidual e divide-se em duas fases distintas: a vascular e a celular, caracterizando um estágio inflamatório. A vasoconstrição inicial forma coágulos para a interrupção do fluxo sanguíneo local e, em seguida, os restos celulares e os coágulos são removidos pelos macrófagos. Inicia-se, então, a proliferação de células osteoprogenitoras, próxima ao local lesionado, e os osteoblastos dão origem ao trabeculado ósseo, constituído de tecido ósseo imaturo e desordenado. Esse trabeculado unirá provisoriamente as porções do osso fraturado e dará origem à formação do calo ósseo, por ossificação endocondral e intramembranosa (NACER, 2009).

O tecido ósseo, frente a situações nocivas, possui características adaptativas; na prática ortopédica, a rápida formação de tecido conjuntivo nas reparações de defeitos ósseos, nas alterações anatômicas e nos desarranjos funcionais ocasionados por perda óssea segmentar ou por fraturas impede ou dificulta a neoformação óssea entre os limites do tecido lesionado. Essa dificuldade ocorre em razão de o tecido conjuntivo apresentar velocidade de proliferação e migração celular maior do que o tecido ósseo. Note-se que essa alteração morfofuncional resultante do processo regenerativo pode conduzir a vários procedimentos cirúrgicos para a sua adequada correção (NACER, 2009).

Tais situações podem ser minimizadas com os benefícios do uso dos biomateriais para reconstrução, substituição ou preenchimento dos defeitos ósseos (NACER, 2009).

O tecido ósseo é composto por células e uma matriz extracelular, e se torna mineralizado pela deposição de hidroxapatita cálcica, conferindo rigidez e força ao osso. O tecido ósseo tem três tipos de células distintas: os osteoblastos ou células de formação óssea; os osteoclastos ou células de reabsorção óssea, aos quais essas funções estão intimamente ligadas, e os osteócitos, que são osteoblastos aprisionados dentro de lacunas na matriz óssea e que, gradualmente, param de secretar a matriz não mineralizada, denominada osteoide. (LOPES; CANHÃO; FONSECA, 2007).

Os osteoblastos formam junções estreitas com os osteoblastos adjacentes e possuem regiões com uma membrana plasmática especializada na veiculação e na

secreção vesicular, sendo essa a forma pela qual os osteoblastos se diferenciam e adquirem a habilidade de secretar a matriz óssea (LOPES; CANHÃO; FONSECA, 2007).

Os osteócitos, variação fenotípica dos osteoblastos maduros, são as células mais numerosas encontradas no tecido ósseo; essas células se comunicam umas com as outras e com o meio circundante através de extensões de suas membranas plasmáticas (LOPES; CANHÃO; FONSECA, 2007).

A fim de equilibrar formação e reabsorção óssea em indivíduos saudáveis, os osteoblastos secretam fatores que regulam a diferenciação de osteoclastos, e, por sua vez, os osteócitos secretam fatores que regulam a atividade de ambos, osteoblastos e osteoclastos. Durante a diferenciação, essas células expressam uma característica padrão de genes que as distingue de outros tipos celulares, com capacidade de diferenciar os fibroblastos que produzem o colágeno tipo  $\alpha$ , que é expresso pelo princípio da diferenciação osteoblástica e é o principal componente estrutural da matriz óssea (LOPES; CANHÃO; FONSECA, 2007).

Portanto, os osteócitos são induzidos a agir como mecanossensores, instruindo os osteoclastos para onde e quando reabsorver o osso, e aos osteoblastos, onde e quando formá-lo (LOPES; CANHÃO; FONSECA, 2007).

De acordo com a descrição de Lopes, Canhão e Fonseca (2007), o tecido ósseo está sendo constantemente reabsorvido pelos osteoclastos e, em seguida, substituído pelos osteoblastos, em um processo chamado remodelação óssea.

Essa coordenação surge da ligação entre osteoblastos e osteoclastos, a qual é mediada pela liberação dos fatores de crescimento do tecido ósseo durante a reabsorção (LOPES; CANHÃO; FONSECA, 2007).

O remodelamento ósseo depende da atividade integrada dos osteoblastos para a produção de tecido neoformado, dos osteócitos para a manutenção da resistência e dos osteoclastos para a lise do tecido ósseo. Esse processo flui no decorrer do crescimento ósseo normal ou após o tecido ósseo ser lesionado (NACER, 2009).

Nacer (2009) descreve sobre o processo de restabelecimento da anatomia vascular, constituindo este um dos eventos precoces que ocorrem durante a osteogênese em determinadas situações. A angiogênese pode estar associada à maior reabsorção osteoclástica da matriz óssea, atuando de forma reversa ao esperado. Assim, se as condições forem favoráveis, o processo de reparo se dá por

uma série de fases, até que o tecido ósseo esteja totalmente consolidado. Contudo, deve-se levar em conta que o tipo de consolidação não será o mesmo e constante em todas as circunstâncias.

### **3.3.1 Estudo Histológico - Composto Ósseo de Ricinus granulado (C.O.R.)**

No estudo de Calixto et al. (2001), foi testada a biocompatibilidade de um floculado derivado do óleo de mamona implantado em alvéolos dentais de ratos, por meio de análise histométrica (contagem diferencial de pontos), no terço apical, nos períodos experimentais de 1, 2, 3 e 6 semanas. O estudo demonstrou um atraso de 13% a 20% no reparo alveolar dos ratos implantados. Histologicamente, os autores observaram uma menor neoformação óssea associada a maiores volumes percentuais de tecido conjuntivo e de remanescentes de coágulo sanguíneo. Verificou-se, com isto, a biocompatibilidade e a capacidade de osteointegração direta do material implantado.

No estudo de Ramalho et al. (2004), também foi utilizado o método descritivo semiquantitativo na avaliação histológica de blocos pré-polimerizados de polímero de mamona. Essa análise foi baseada no conhecimento dos aspectos condizentes a inflamação, formação de tecido conjuntivo fibroso e quantidade do material encontrada no leito receptor. Os autores concluíram que a neoformação óssea, no processo regenerativo dos defeitos ósseos confeccionados, deu-se pela osteocondução.

No estudo de Laureano Filho et al. (2007), comparando-se a matriz de osso desmineralizado de origem humana, DEMBONETM, e a resina poliuretana na forma granulada, AUG-EX<sup>®</sup>, foi demonstrada, por parâmetros pré-estabelecidos, uma análise qualitativa do reparo do defeito ósseo na calvária de coelhos, nos períodos de quatro, sete e 15 semanas. No período inicial de avaliação, quatro semanas, foi possível identificar a presença de partículas do material rodeadas por tecido conjuntivo fibroso no interior do defeito ósseo, a presença de osteoide e pouca quantidade osteoblástica com os dois materiais implantados. No período de sete semanas, foram observadas partículas dos materiais envolvidos por tecido conjuntivo fibroso e ósseo, sendo que a neoformação óssea iniciou-se a partir das margens do defeito. No grupo de DEMBONETM, observou-se grande quantidade de

tecido conjuntivo, enquanto que no grupo AUG-EX<sup>®</sup>, deu-se o fechamento quase que total do defeito por tecido ósseo maduro. Os pesquisadores concluíram, pela análise histológica, que os materiais influenciaram positivamente na neoformação óssea.

No estudo proposto por Borges et al. (2007) para avaliar histologicamente a ação do polímero derivado do óleo de mamona na forma de grânulos implantados nas tíbias de cães aos 30, 60, 120 e 180 dias de experimento, foi demonstrada a biocompatibilidade do implante por sua presença na cavidade formada e pela ausência de reação a corpo estranho, apresentando-se como um espaçador biológico. Observou-se a presença de numerosas células da linhagem osteogênica, sendo que os osteoblastos estavam nas adjacências do material quando este se apresentava em fragmentos menores.

Nacer (2009) utilizou da avaliação histológica descritiva, um método semiquantitativo, para analisar o uso do polímero de mamona acrescido de carbonato de cálcio e associado com os dopantes sílica e zircônia. Os resultados foram tabulados de maneira a se observar, nos três períodos estudados (15, 30 e 60 dias), a disposição dos valores quantificados da presença ou não de neoformação óssea, de fibroblastos, pseudocápsula fibrosa, reação inflamatória, células gigantes, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Concluiu-se que a osteocondução foi a principal via para a regeneração óssea, comportando-se o biomaterial como um arcabouço receptivo, que facilitou a neoformação óssea com uma maior quantidade estimada de tecido ósseo maduro.

Na avaliação histológica feita por Ramalho et al. (2009), os autores obtiveram como resultados, aos 270 dias de implantação do material pré-moldado de polímero de mamona no seio nasal de macacos-prego (*Cebus apella*), o remodelamento ósseo, caracterizado por inúmeras células osteogênicas, e a inexistência de células inflamatórias ou de reação a corpo estranho. Nos fragmentos do polímero de mamona em meio ao tecido ósseo neoformado, havia diferentes graus de mineralização e a presença de fibras colágenas, que se encontravam próximas ao local de inserção do polímero que não havia sido absorvido; note-se que o mesmo não sofreu extrusão no período observado. Esses autores concluíram que o implante de polímero de mamona foi biocompatível e não induziu a neoformação óssea.

No estudo da avaliação histológica qualitativa com o material implantado Composto Ósseo de Ricinus granulado no osso íliaco de coelhos, nos períodos de

45, 70 e 120 dias, Mateus (2010) pôde verificar a crescente modificação da estrutura inicial para a deposição de nova formação óssea, sobressaindo fibroblastos e abundante presença de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea. Esse material foi, então, considerado um material biocompatível e biologicamente ativo.

Saran (2011) utilizou a análise histológica descritiva qualitativa para informar a presença ou a ausência do processo inflamatório em cilindros moldados de polímero de mamona aos 90, 120 e 150 dias, adotando o critério de seqüência biológica do reparo do tecido ósseo. Foi possível notar que, no período experimental de 90 dias, a área estudada apresentava uma linha reversa óssea com espessa camada de tecido ósseo neoformado, reforçando a característica da biocompatibilidade desse material.

### **3.3.2 Estudo Histológico – Hidroxiapatita (HAP-91)**

No estudo histológico avaliado por Duarte et al. (2006) sobre o padrão de reparação óssea, os autores puderam qualificar o tecido ósseo neoformado e a osteointegração da hidroxiapatita sintética (HAP-91 + lipossoma do tipo DRV), obtendo-se um compósito de hidroxiapatita absorvível; este foi implantada no processo alveolar da mandíbula de cães aos 8, 15, 21, 42, 60 e 120 dias de experimento. Os resultados mostraram a presença de partículas de HAP-91 rodeadas por um trabeculado ósseo e áreas de grande neovascularização no período de 42 dias. Na conclusão do estudo, a hidroxiapatita apresentou propriedade osteocondutora e acelerou a reparação tecidual óssea.

Vital et al. (2008) demonstraram por estudo histológico aos quatro, oito, 15, 30 e 60 dias de experimento, que o biomaterial hidroxiapatita (HAP-91) associado à lignina no preenchimento de falha óssea experimental na tíbia de coelhos não apresentou reação de corpo estranho. No oitavo dia, foi observada a presença desorganizada de tecido conjuntivo frouxo nas bordas das falhas ósseas e de tecido conjuntivo fibroso ao redor das partículas de HAP-91, além de pequena área de neoformação óssea circundando o material. Aos 15 dias, a HAP-91 estava envolvida por um trabeculado ósseo mais organizado, tecido conjuntivo denso e intensa vascularização; e, aos 30 dias, a falha óssea estava totalmente preenchida por um trabeculado ósseo mais organizado. Concluíram que a melhor resposta óssea obtida

no preenchimento da falha óssea com HAP-91 associada à lignina ficou mais evidenciada aos 15 e 30 dias de experimento, e classificando-a como biocompatível.

Na análise histológica descritiva de biocompatibilidade e biocondução do compósito hidroxiapatita (HAP-91) – lignina, implantado na tíbia de coelhos aos oito, 30, 60, 90 e 120 dias, Martinez, Pacheco e Vargas (2009) puderam interpretar a regeneração tissular com base na proliferação e na diferenciação celular do tecido cicatricial, da neoformação óssea. Verificaram, também, a integração do composto ao novo tecido ósseo e a maturidade do tecido ósseo neoformado, da regeneração da medula óssea e da fagocitose do composto experimentado. Os resultados mostraram que o tempo necessário para a regeneração óssea foi o mesmo para o grupo controle, sendo um indicativo da característica osteocondutora da hidroxiapatita, que é capaz de guiar o crescimento de novo tecido ósseo, inclusive acima do canal medular. Concluíram, com base nos resultados histológicos, que a HAP-91 associada à lignina se mostrou biocompatível e osteocondutora, favorecendo a osteointegração.

Carlo et al. (2009) avaliaram, por análise histológica qualitativa aos oito, 45 e 90 dias de experimento, a biocompatibilidade do compósito hidroxiapatita (HAP-91) + poli-hidroxibutirato (PHB) na fabricação de implantes reabsorvíveis para a osteossíntese, tendo esse compósito sido implantado no osso olécrano. Os resultados histológicos mostraram a presença de um novo trabeculado ósseo entremeado por tecido conjuntivo denso vascularizado, aos oito dias; e nos períodos de 45 e 90 dias, observou-se o aparecimento de um trabeculado ósseo mais organizado. Concluíram que o compósito é biocompatível e se integra ao tecido ósseo, associando a bioatividade da HAP-91 às características mecânicas do PHB.

Jin Lee et al. (2010) avaliaram o efeito da hidroxiapatita, nas apresentações em pó (500-700  $\mu\text{m}$ ) e cilíndrica, sobre a osteointegração em defeitos tibiais de coelhos aos 30, 45 e 60 dias de experimento. As análises histológica e morfométrica foram realizadas pelo *software* de análise de imagens (KS 300<sup>®</sup>). Nos resultados, a integração do implante de hidroxiapatita ocorreu após uma resposta imunológica inicial, com a formação de um novo tecido ósseo dentro do enxerto. Concluíram que as formas em pó e cilíndrica da hidroxiapatita podem agir como substitutos ósseos nesse modelo de defeito tibial e que a hidroxiapatita em pó mostrou melhores resultados no crescimento ósseo em comparação à forma cilíndrica, a qual obteve melhores resultados em uma morfologia sustentada.

Na avaliação histológica qualitativa da HAP-91 implantada no osso ilíaco de coelhos aos 45, 70 e 120 dias de experimento, Mateus (2010) verificou que o material estava envolto por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea, apresentando fibras colágenas e discreto número de fibroblastos. Concluiu que o material HAP-91, estudado nos períodos experimentais propostos, obteve uma crescente modificação da sua estrutura inicial para a deposição de um tecido ósseo neoformado, atribuindo os resultados às suas propriedades de ser biocompatível e biologicamente ativo.

Notodihardjo et al. (2012) estudaram, por avaliação histológica, aos 30 dias de experimento, o implante de hidroxiapatita (HAP) e o seu misto com a proteína óssea morfogenética (BMP) em medidas variáveis de tamanho de poros (entre 300 e 500  $\mu\text{m}$ ), tendo sido aplicados em defeitos de tamanhos críticos em calvária de ratos. Nos achados histológicos, o grupo controle apresentava uma pequena quantidade de osso trabecular que, gradualmente se tornava mais delgado na parte central do defeito, visualizando-se tecido vascular. A composição dessa formação óssea variou de células osteoblásticas para células osteoides, que foram vistas mais na área externa do que na área interna do defeito. No grupo com HAP, foi observado um misto de células que estavam alinhadas, em formações que circundavam os grânulos, e células mesenquimais imaturas, embora nem osso nem tecido cartilaginoso fossem identificados. O tamanho dos poros de HAP dita se o osteoblasto poderá invadi-la e o tamanho apropriado para tal é de 150 a 500  $\mu\text{m}$ . No estudo, os autores concluíram que trabalhar com HAP veicula o fornecimento de um suporte para melhorar a estabilidade estrutural e apresentar uma melhor matriz para células de ligação e migração no processo de cicatrização óssea. Além disso, a HAP pode agir como um carregador de BMP, e o misto de HAP com BMP provou ser uma relação de sincronização positiva, em termos de osteoindução na cicatrização óssea.

### **3.4 Estudo Morfométrico**

Egan, Brennan e Pignolo (2012) definem a morfometria como o exame dos tecidos com base na mensuração quantitativa da organização e da estrutura microscópica, usando-a para fornecer informações sobre a resposta celular (p. ex.: migração e inflamação); a patologia celular (p. ex.: lesões ateroscleróticas e

crescimento tumoral), e os distúrbios osteometabólicos. Note-se que esses parâmetros requerem dois tipos de medidas: perímetro e distância entre os segmentos definidos de interesse. Essas medidas básicas traduzem os índices morfométricos primários, incluindo volume tecidual, volume ósseo, volume do osteoide e superfície de mineralização.

Esses autores ainda relatam que, dentre as vantagens das análises morfométricas, há a possibilidade de estas serem feitas com o uso do *software* de reconhecimento de imagens assistidas e o desenvolvimento de uma sofisticada abordagem para avaliar a microestrutura óssea. Comercialmente, há programas disponíveis que permitem aumentar a automação da análise morfométrica; contudo, esses programas podem ser caros, requerendo a compra de câmeras e computadores. Portanto, a disponibilidade, com um custo menos substancial, de um método alternativo, que mantenha a precisão comparável, faria as análises morfométricas serem prontamente mais acessíveis para os pesquisadores, nos diversos campos de investigação.

Egan, Brennan e Pignolo (2012) utilizaram os *softwares* Adobe Photoshop® e Image J® para se determinar a neoformação óssea, incluindo: volume tecidual ( $\text{mm}^3$ ), volume ósseo ( $\text{mm}^3$ ) e volume osteoide ( $\mu\text{m}^3$ ).

Marquezan et al. (2011) citam que a área óssea trabecular – em vez do conteúdo mineral ósseo fornecido pela densitometria óssea, como uma análise quantitativa –, é avaliada para se ter um parâmetro da qualidade óssea. Para a análise da área óssea trabecular, os métodos histológicos e morfométricos são considerados padrões-ouro.

De acordo com Matos, Araújo e Paixão (2008), o uso de experimentos com modelos animais para estudar a osteointegração mostra-se eficaz por responder a questões relacionadas com a maioria dos meios efetivos para o tratamento humano, enquanto que, com os estudos histológicos, há o fornecimento somente de resultados qualitativos. Os autores também informam que o acervo literário sobre o padrão morfométrico (quantitativo) da osteointegração natural é escasso, ou seja, esse parâmetro não se mostra, ainda, suficientemente estudado.

Em suas avaliações com a técnica de morfometria na cicatrização óssea fibular por modelo de osteotomia sem fixação, Matos, Araújo e Paixão (2008) fizeram análise de três cortes histológicos por animal, com aumento de 200x, determinando a área de calo ósseo. Essa área é definida por regiões associadas a

uma significativa espessura periosteal, como, por exemplo, a área em que a espessura do osso cortical tenha mais do que dobrado. As avaliações morfométricas de todos os campos do microscópio foram realizadas usando-se um teste de retícula monocular com dez linhas paralelas e 100 pontos contidos numa grade (área total:  $10.500 \mu\text{m}^2$ ). Os referidos autores concluíram que os resultados pela avaliação morfométrica mostraram-se compatíveis com a consolidação óssea achada em outros modelos experimentais que são discutidos na literatura.

No estudo de Carvalho et al. (2010), os autores utilizaram a técnica de morfometria óssea em ratas castradas e tratadas com tibolona, na avaliação da microestrutura óssea trabecular. A análise dos cortes transversais das tíbias e dos fêmures concentrou-se nas regiões medular ( $\text{mm}^2$ ) e cortical ( $\mu\text{m}$ ). A densidade óssea, em porcentagem, da epífise dos cêndilos femorais foi realizada pelo *software* ImagePro Plus 4.5., tendo sido acoplado às imagens um graticulo contendo 100 pontos. Os autores concluíram que o uso prolongado de alta dose de tibolona não melhora de forma significativa a qualidade óssea, mas houve preservação da massa óssea cortical nas diáfises femoral e tibial, permitindo qualificar e quantificar de forma segura as estruturas ósseas, e desempenhando, dessa forma, importante papel no estudo de determinados distúrbios metabólicos e seus tratamentos.

Na avaliação da biocompatibilidade de nanopartículas de hidroxiapatita no reparo ósseo de tíbias, Gasperini (2010) descreveu o uso da análise morfométrica das lâminas histológicas, avaliando-as por microscopia de luz para evidenciar o tecido ósseo e as fibras colágenas. Essas imagens permitiram avaliações qualitativas e quantitativas da região relacionada ao local enxertado, pela análise do *software* ImagePro Plus<sup>®</sup> (Media Cybernetics), para mensurar as características do osso neoformado e sua interface. Na análise estatística, utilizaram-se os *softwares* GraphPad InStat 3.1 e GraphPad Prism 4.0, comparando as densidades ósseas por área de osso neoformado e de tecido conjuntivo na região entre as corticais do defeito da tíbia. O estudo concluiu que o biomaterial sintetizado se mostrou biocompatível e osteocondutor.

No experimento de Vasconcellos et al. (2010), os autores utilizaram a análise morfométrica para avaliar a porcentagem de neoformação óssea da interface implante/tecido ósseo, calculando a quantidade de tecido ósseo invaginante no interior dos poros do implante pelo *software* Image J 1.4<sup>®</sup>, o qual aferiu o percentual total da área da interface implante/tecido ósseo. Eles concluíram pela análise

morfométrica que, ao aumentar a porosidade e o tamanho dos poros, há um efeito positivo direto na quantidade do crescimento do tecido ósseo neoformado.

Jin Lee et al. (2010) avaliaram, em defeitos tibiais de coelhos, o efeito da hidroxiapatita nas apresentações em pó (500-700  $\mu\text{m}$ ) e cilíndrica, sobre a osteointegração em 30, 45 e 60 dias de experimento. A análise morfométrica foi realizada pelo *software* de análise de imagens (KS 300<sup>®</sup>). O volume de osso neoformado foi expresso em média  $\pm$  desvio-padrão e a análise de variância, pela correção de Bonferroni, para avaliação dos grupos ( $p < 0,05$ ). Nos resultados, a integração do implante de hidroxiapatita ocorreu após uma resposta imunológica inicial, com a formação de tecido ósseo novo dentro do enxerto. Os autores concluíram que as formas em pó e cilíndrica da hidroxiapatita podem agir como substitutos ósseos nesse modelo de defeito tibial e que a hidroxiapatita em pó mostrou melhores resultados no crescimento ósseo em comparação com a forma cilíndrica, a qual obteve melhores resultados em uma morfologia sustentada.

No experimento de Bastos et al. (2010), utilizando-se a técnica morfométrica na análise da área óssea trabecular e da cicatrização óssea nas tíbias de ratos hipertensos aos oito dias, considerou-se importante esse estudo da hipertensão, pois tal quadro pode estar ligado a um aumento na mobilização de cálcio a partir do osso, com as perdas aumentadas de cálcio pelos rins, para uma ativação secundária do hormônio paratireoideo. No procedimento morfométrico, todas as avaliações dos cortes histológicos centrais de cada defeito e do grupo controle foram executadas pelo *software* ImagePro<sup>®</sup> (Media Cybernetics). As imagens digitais compostas foram criadas pela combinação de duas pequenas imagens e esse procedimento foi executado para permitir a visão total do defeito e a obtenção das imagens com melhor nível de aumento para as avaliações. A análise percentual da área óssea neoformada foi calculada pela neoformação óssea ( $\text{mm}^2$ ) dividida pela área total ( $\text{mm}^2$ ), considerada como 100%. Os resultados mostraram que a porcentagem da área óssea total foi significativamente menor nos ratos hipertensos, quando comparados ao grupo controle. Os autores concluíram, por meio desse estudo, que o fator hipertensão prejudica a cicatrização óssea e reduz a área óssea total, indicando que os indivíduos com hipertensão poderiam ser um grupo de risco para estas desordens ósseas.

Maiorana et al. (2011) avaliaram o efeito da osteointegração com o uso da técnica morfométrica na reabsorção de osso cortical autógeno, empregando

grânulos de osso bovino inorgânico. Mostraram, por imagens coloridas, os componentes de interesse rotulados digitalmente. As análises morfométricas resultaram em 19,3% de osso jovem, 1,8% de osso maduro, 52,4% de tecido conjuntivo e 47,6% na fração de tecido mineralizado na área de interesse. Concluíram que a técnica se mostrou pertinente à proposta do estudo.

Rokn et al. (2011) observaram, por meio de exames histológico e morfométrico, a osteointegração de dois tipos de materiais para enxertia. Os exames permitiram avaliar quatro variáveis qualitativas: intensidade da inflamação, de acordo com o infiltrado linfocitário ao redor do material do enxerto ósseo (uso da grade); presença de reação de corpo estranho pela presença de células gigantes (uso da grade); quantidade de tecido ósseo regenerado, analisado por imagem digital das amostras. Nessa análise, o *software* SigmaScan Pro Image 5.0 calculou o número de *pixels* nas diferentes partes da imagem e a média do número de *pixels* do osso regenerado de 1 mm<sup>2</sup> de área selecionada para avaliação das medidas quantitativas (formação óssea e permanência do material de enxertia); a outra análise variável verificou a permanência do material substituto. Concluíram que o modelo usado de enxertia em coelhos com hidroxiapatita gerou menos tecido ósseo quando comparado com osso bovino inorgânico e grupo controle, embora as diferenças na formação óssea não fossem significativas.

Ao avaliarem enxertos ósseos de cerâmica bifásica de hidroxiapatita e de cimento fosfato de cálcio por análise morfométrica do reparo ósseo, Guimarães et al. (2011) observaram que, nas imagens captadas pelo *software* ImagePro Plus<sup>®</sup>, puderam mensurar as áreas de neoformação óssea, avaliando-se, dessa forma, o processo de evolução do reparo ósseo. Os resultados morfométricos, analisados num conjunto de *pixels* das áreas totais do trabeculado ósseo neoformado, evidenciaram que os grupos submetidos aos biomateriais de preenchimento ósseo indicam valores de áreas de trabeculados ósseos superiores aos dos grupos controle, porém sem associação estatística significativa entre os grupos. A análise morfométrica utilizada permitiu detectar a presença de osso no defeito e quantificar o tamanho da área de neoformação, concluindo que a análise quantitativa é essencial para estudos que objetivam avaliar a efetividade de novas modalidades terapêuticas na neoformação óssea.

Vilela et al. (2012) estudaram a análise morfométrica da resposta inflamatória e da necrose em incisivo central reimplantado de ratos tratados com baixo nível de

laserterapia, de laser diodo de onda contínua- InGaAlP<sup>®</sup> (Quasar Medical). O *software* Imagelab<sup>®</sup> analisou, aos 15, 30 e 60 dias de experimento, a porcentagem das áreas de reabsorção radicular. Pôde-se notar um aumento da reabsorção radicular em ambos os grupos no decorrer dos períodos experimentais e diferenças estatisticamente significantes. Concluíram que diferentes parâmetros de laser precisam ser testados e que é necessário, ainda, realizar estudos clínicos para se avaliarem os efeitos dessa ferramenta terapêutica para esse particular tipo de trauma.

No estudo sobre avaliação morfométrica do reparo em defeitos críticos em calvária de ratos, realizados com broca trefina ou instrumento piezoelétrico e preenchidos com material de enxertia, Campista (2012) selecionou, para a análise, três cortes histológicos da região central do defeito e suas imagens. As imagens foram selecionadas com aumento 5x e analisadas pelo *software* Axiovision 4.8.2<sup>®</sup> (Carl Zeiss), fazendo o delineamento da área total (mm<sup>2</sup>) e da área com osso neoformado. Na análise estatística, as médias (M) e os desvios-padrão (DP) da quantidade de osso neoformado foram descritos em porcentagem de área e concluiu-se que, pela metodologia comparativa utilizada, não houve diferença significativa.

### 3.5 Estudo Densitométrico

A 'qualidade óssea' é um termo frequentemente considerado como densidade óssea, de acordo com Marquezan et al. (2011).

A qualidade óssea inclui aspectos fisiológicos e de ordem estrutural, além de grau de mineralização do tecido ósseo. Aspectos de metabolismo ósseo, maturação, matriz intracelular e vascularidade também têm sido enfatizados.

Na observação de Marquezan et al. (2011), a classificação mais aceita é baseada nas quantidades de osso trabecular e cortical mostradas nas radiografias pré-operatórias. Essa classificação, contudo, depende da subjetividade do avaliador durante a avaliação radiográfica. Um método menos subjetivo para avaliar a qualidade óssea trabecular e cortical consiste em verificar a densidade mineral

óssea (DMO). A densitometria óssea é tomada como um padrão-ouro por quantificar a DMO na Endocrinologia e na Traumatologia.

A definição de um quadro clínico de desmineralização óssea relaciona-se com a determinação da DMO, servindo como base no estabelecimento de um protocolo terapêutico e um monitoramento dos pacientes acometidos, e contribuindo para o prognóstico de possíveis alterações.

A DMO é resultante de um processo dinâmico de formação e reabsorção do tecido ósseo, a remodelação. Esse processo correlaciona-se com as propriedades mecânicas do tecido ósseo, ocorrendo em ciclos, ao longo da vida orgânica (WAJNSZTEJN, 2010).

A DMO assume importância clínica e experimental nas áreas relacionadas à saúde, contribuindo com o diagnóstico e o monitoramento seriado em doenças osteometabólicas, na predição do risco de fraturas e no auxílio nas intervenções cirúrgicas e terapêuticas, possibilitando, assim, estratégias preventivas, direta ou indiretamente, em relação ao metabolismo ósseo (RIBEIRO, 2004).

A Densitometria Óptica Radiográfica (ODR) é um dos métodos descritos para se determinar a DMO.

A mensuração da densidade mineral óssea por meio da densitometria óptica em radiografia permite a avaliação seqüencial das variações do conteúdo mineral ósseo do esqueleto, por um método não invasivo (WAJNSZTEJN, 2010).

Essa técnica mensura a DMO por meio de imagens radiográficas, apresentando grande importância na área de pesquisa científica e clínica, auxiliando a compreender e avaliar o processo de mineralização óssea com boa precisão, reprodutibilidade, fácil aplicabilidade e com reduzido tempo de execução. É importante ressaltar também que, na densitometria óptica em radiografia, não há a necessidade de qualquer procedimento anestésico (RIBEIRO, 2004).

Alves e Sterman (2010), em seus estudos com a utilização dessa metodologia, mostraram a necessidade de uma padronização acurada para minimizar a variação dos dados obtidos, atentando-se para o tempo de exposição, o filme radiográfico e o posicionamento.

Assim, como meio de solucionar o problema da falta de padronização, elaboraram-se um referencial densitométrico, o penetrômetro, usado em análise quantitativa, e a cunha, para análise qualitativa da DMO, ambos confeccionados do material alumínio. Esse material é possuidor de uma curva de absorção da radiação-

X idêntica à do tecido ósseo, sendo o recurso adotado por Louzada (1994) em seus estudos para a conversão dos valores da densidade radiográfica em valores equivalentes em milímetros de alumínio (mmAl).

Louzada (1998) e Pelissoni et al. (2003) estudaram a utilização do programa de densitometria óptica radiográfica (ODR) para um melhor entendimento do processo de reparo ósseo nos diferentes tipos de modelos biológicos (cão e coelho) e, quando comparada com os resultados histológicos e as radiografias convencionais, a técnica mostrou-se muito eficaz.

No experimento de Monti (2005), utilizando-se o estudo radiográfico densitométrico em mandíbulas de suínos submetidos à osteotomia com brocas de baixa e alta rotação, a técnica do ODR possibilitou a apresentação em cores dos valores da densidade óptica das regiões osteotomizadas e das áreas adjacentes, em uma avaliação qualitativa da DMO. É interessante ressaltar que o resultado constitui um referencial visual da neoformação óssea.

## **4 Material**

### **4.1 Apresentação dos Materiais–Implantes**

✓ C.O.R\* - Composto Ósseo de Ricinus granulado (Figura 1). É um polímero vegetal osteointegrável derivado do óleo de mamona composto de pré-polímero e poliol na concentração de 1:0,7 e carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) na concentração de 33 %, sendo apresentado comercialmente com 5g x 450  $\mu\text{m}$  de granulometria. É autorizado para uso médico pelo registro ANVISA: nº 1.03.056.9.0009. De acordo com o fabricante, Poliquil Araraquara Polímeros Químicos Ltda., o C.O.R. granulado é um biomaterial usado na reestruturação óssea, indicado no reparo neurocirúrgico, reconstrução óssea, fixação de próteses, e como preenchedor de espaço ósseo na cirurgia ortopédica e odontológica. Para ser empregado, os grânulos devem ser adicionados a solução salina de NaCl (0,9%), sangue ou osso esponjoso.



Figura 1. Apresentação do Composto Ósseo de Ricinus Granulado

✓ HAP-91\*\* - Hidroxiapatita (Figura 2). É uma biocerâmica fosfocálcica<sup>1</sup>, com apresentação comercial de 0,5g x 20 mesh de granulometria. É autorizada pelo registro ANVISA nº 1.04.057.2.0001. De acordo com o fabricante, JHS Laboratório Químico Ltda (Sabará, MG), o biomaterial é utilizado no preenchimento de alvéolos após extração, na regularização do rebordo alveolar, e deformidades ósseas nas cirurgias ortopédicas e odontológicas.



Figura 2. Apresentação da Hidroxiapatita

\*Poliquil Polímeros Químicos Ltda., Araraquara, SP.

\*\* JHS Laboratório Químico Ltda., Sabará, MG.

## 4.2 Animais do Experimento

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado com o protocolo n° 173/2010 pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (ANEXO A).

Foram selecionados 16 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), fêmeas, provenientes do Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu, aos 90 dias de idade e com peso médio de 2,65 kg.

## 5 Métodos

### 5.1 Grupos Experimentais

Os coelhos foram separados aleatoriamente em quatro grupos de quatro animais. Foram alojados em gaiolas com comedouros e bebedouros individuais, e houve o fornecimento de ração padronizada Natural Coelhos<sup>N.C.</sup> (Purina<sup>®</sup>)<sup>a</sup> e água *ad libitum*.

Na Tabela 1, os coelhos foram identificados em grupos, conforme o período de observação pós-operatória e eutanásia, os materiais implantados e o grupo controle (coágulo).

Tabela 1 - Distribuição dos grupos conforme os períodos de observação pós-operatória, os materiais implantados e o grupo controle (coágulo)

GRUPOS	PERÍODO EXPERIMENTAL (DIAS)	MATERIAIS IMPLANTADOS	GRUPO CONTROLE
G1	7	C.O.R. / HAP-91	CONTROLE
G2	15	C.O.R. / HAP-91	CONTROLE
G3	21	C.O.R. / HAP-91	CONTROLE
G4	35	C.O.R. / HAP-91	CONTROLE

## 5.2 Procedimentos Pré e Pós-operatórios

No procedimento pré-operatório, os coelhos tiveram jejum alimentar de oito horas, precedendo a anestesia. Fez-se a tricotomia na região a ser operada. Materiais e campos cirúrgicos foram autoclavados na Autoclave Stermax. Foi instaurada como analgesia preemptiva Sulfato de Morfina<sup>b</sup>, na dose de 1 mg.kg<sup>-1</sup> por via intramuscular, a cada 6 horas/24 horas, e o uso de Cloridrato de Tramadol<sup>c</sup>, na dose de 2 mg.kg<sup>-1</sup> por via intramuscular, a cada 8 horas/72 horas. Como antibioticoterapia, instaurou-se o uso de Enrofloxacin<sup>d</sup>, na dose de 1 mg.kg<sup>-1</sup> a cada 24 horas/7 dias.

Usou-se degermante Digluconato de Clorexidina a 4%<sup>e</sup> nas feridas cirúrgicas. No décimo dia, as suturas foram removidas.

## 5.3 Protocolo Anestésico

Optou-se pelo uso do plano anestésico dissociativo com os agentes Xilazina<sup>f</sup> e Tiletamina-Zolazepam<sup>g</sup>, por potencializar adequado relaxamento muscular e

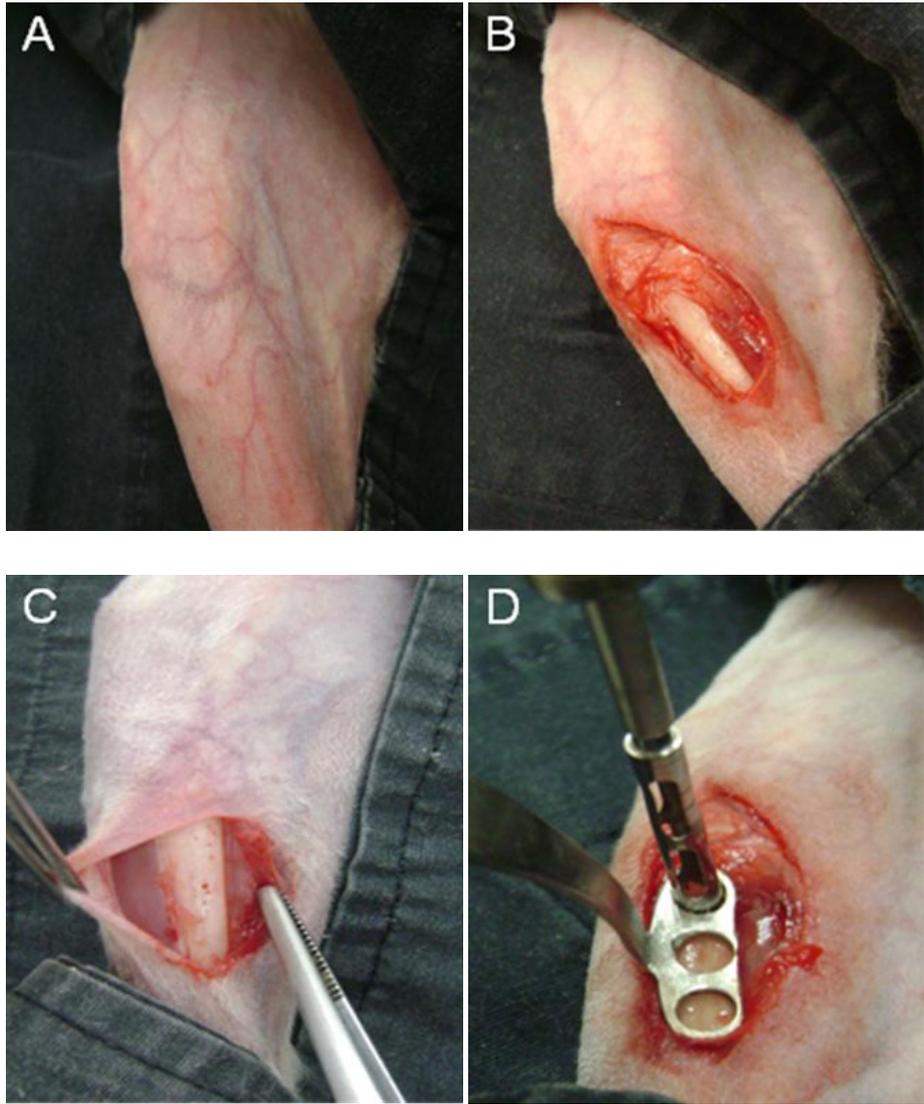
analgesia, conferindo segurança nos períodos trans e pós-cirúrgico. De acordo com Popilskis et al. (1991), empregou-se Xilazinana na dose de  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$  e Tiletamina-Zolazepam na dose de  $18 \text{ mg.kg}^{-1}$  por via intramuscular, na mesma seringa.

#### 5.4 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram posicionados em decúbito lateral sob colchonete térmico, com as regiões das articulações femorotibiopatellares tricotomizadas. Antissepsia com degermante Digluconato de Clorexidina a 4% e colocação de campos cirúrgicos fenestrados.

A técnica operatória empregada (Figura 3) baseou-se nos seguintes tempos cirúrgicos, discriminados conforme a sequência dos procedimentos:

- Vista medial da tíbia e abordagem cirúrgica anteromedial paralela à crista tibial na porção proximal da tíbia, incisando pele e subcutâneo (A) e (B); e
- Dissecção da fáscia crural e afastamento dos músculos fibular longo e tibial cranial, elevando e retraindo-os medialmente, proporcionando acesso através de separação muscular e elevação subperiosteal (C); e
- Gabarito e broca trefina de 4 mm de diâmetro externo (D) acoplada a um micromotor de baixa rotação (K) no gabinete odontológico; e
- Uso de um funil torneado (E) para o preenchimento dos orifícios com os biomateriais; e
- Calcador (F); e
- Na tíbia direita, foram feitos dois orifícios: um preenchido com o biomaterial Composto Ósseo de Ricinus (C.O.R.) granulado e o outro para o Grupo controle, somente com a presença de coágulo (G); na tíbia esquerda, o orifício foi preenchido com o biomaterial Hidroxiapatita (HAP-91) (H); e
- Após os preenchimentos, iniciou-se o plano de sutura em padrão contínuo entre os músculos fibular longo e tibial cranial com fio categute 3-0<sup>i</sup> (I); e
- A pele e tecido subcutâneo foram suturados em padrão simples interrompido com fio mononylon 3-0<sup>j</sup> (J).



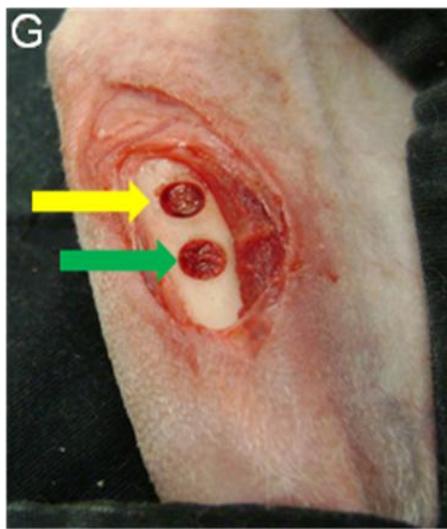




Figura 3 - Fotografias ilustrando o procedimento cirúrgico na tíbia: A) Vista panorâmica da região cirúrgica; B) Abordagem cirúrgica anteromedial da epífise proximal tibial, incisando pele e subcutâneo; C) Incisão e separação dos músculos fibular longo e tibial cranial, elevação e retração periosteal; D) Colocação do gabarito e trefina; E) Funil torneado para preenchimento; F) Calcador; G) Orifício Grupo Controle (seta amarela), orifício com o biomaterial C.O.R. (seta verde); H) Orifício com o biomaterial HAP-91(seta azul); I) Sutura dos músculos fibular longo e tibial cranial; J) Sutura de pele; K) Instrumentais utilizados e micromotor, e L) Gabinete odontológico.

## **5.5 Eutanásia**

Os animais foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico e à anestesia inalatória com o agente Isoflurano<sup>k</sup>. Verificando-se que os animais estavam em plano anestésico profundo, aplicou-se, por via cardíaca, o agente barbitúrico Tiopental Sódico<sup>l</sup>, até a supressão dos batimentos cardíacos.

## **5.6 Fluxograma das peças cirúrgicas**

Após as peças cirúrgicas serem removidas, estas foram colocadas separadamente e identificadas pelos grupos experimentais em recipientes com formol a 10%. Foram, então, direcionadas ao Laboratório de Biofísica da Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba (UNESP), para a realização do procedimento radiográfico.

Após o procedimento radiográfico, as peças cirúrgicas foram encaminhadas ao Laboratório do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, para a realização do procedimento histológico.

Concluído o trabalho histológico, as lâminas foram direcionadas para o Laboratório de Ictiologia Neotropical do Campus da Faculdade de Agronomia de Ilha Solteira – UNESP, onde se realizou a análise morfométrica.

## **5.7 Procedimento Radiográfico**

As tíbias dos quatro grupos experimentais foram colocadas superpostas num plano médio-lateral no chassi radiográfico 18x20 cm, com uma cunha de alumínio (liga 6063, ABNT) (Figura 4). Foram radiografadas no aparelho de raios-X CRX modelo SFH 730 (500 mA/150 kV), com a técnica radiográfica (38 kV, 0,08 s e 50 mA a uma distância de 80 cm do tubo de imagem), e reveladas na processadora automática Macrotec, modelo MX-2.

Após revelação, as radiografias foram encaminhadas para o procedimento densitométrico.

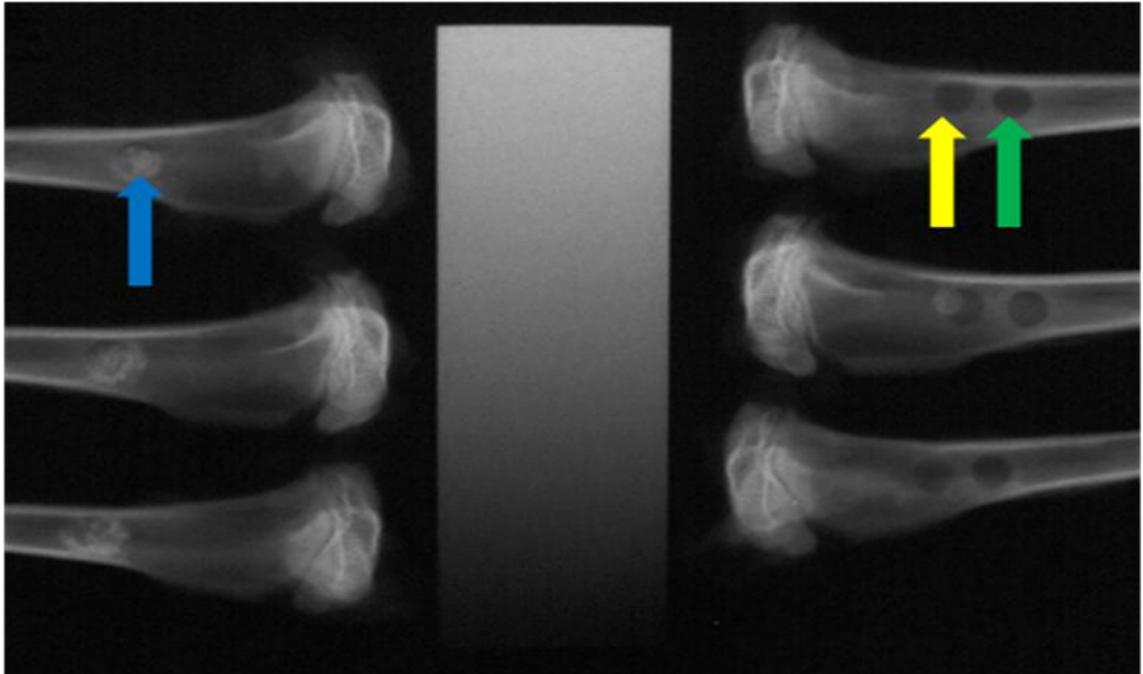


Figura 4. Radiografia do grupo experimental G1 com as tíbias superpostas e a cunha de alumínio. No lado esquerdo, se apresentam as tíbias com o biomaterial HAP-91 (seta azul); no lado direito, as tíbias com o biomaterial C.O.R. (seta verde) e o grupo controle (seta amarela).

### 5.8 Procedimento Histológico

O procedimento histológico seguiu o protocolo empregado pelo Laboratório de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP) (Apêndice A).

As lâminas foram analisadas e fotografadas no Fotomicroscópio Olympus BX51 com acoplador para fotos (DP71), a fim de se observarem qualitativamente as interações das interfaces tecido ósseo/materiais implantados, em comparação com o grupo controle (coágulo).

### 5.9 Procedimento Morfométrico

Nas análises morfométricas, as imagens digitalizadas das interfaces tecido ósseo/materiais implantados e do grupo controle (coágulo), nos quatro grupos experimentais, foram obtidas com a câmera AxionCam MRc5<sup>®</sup> acoplada ao microscópio AxionVision real. 4.8.2<sup>®</sup> (Zeiss).

A captura da imagem histológica foi feita com aumento de objetiva em 5x e a mesma foi processada pelo *software* AxionVision rel. 4.8.2.®. A imagem foi salva como TIFF (Tagged Image File Format) e utilizada pela seguinte metodologia:

- a) Com o arquivo da imagem histológica aberto, procurou-se posicionar a imagem no melhor ângulo para que fossem selecionados os pontos entre as extremidades corticais do defeito ósseo; e
- b) Com o recurso desse *software* e seu conjunto de medidas, obteve-se a unidade de comprimento em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) a ser analisada pela ferramenta *length*; e
- c) As medidas de comprimento dos cortes histológicos em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), nos quatro períodos experimentais com os materiais implantados (Figura 39) e o Grupo Controle (Figura 40), foram tabuladas e direcionadas à análise estatística.

### **5.9.1 Análise Estatística**

Na análise estatística, os valores das medidas do comprimento, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), entre as corticais ósseas, para determinar o comportamento de cada biomaterial e do grupo controle na osteointegração, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, à análise de variância não paramétrica e ao teste de comparação múltipla de Dunn.

As medidas obtidas foram apresentadas pelas médias, pelos desvios-padrão e pelas medianas.

O nível de significância adotado foi de 5%.

As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System).

### **5.10 Procedimento Densitométrico**

As imagens digitalizadas das radiografias foram armazenadas e usadas na análise qualitativa das interações dos materiais implantados e do grupo controle (coágulo) com o tecido ósseo.

Para o acompanhamento visual e tridimensional das imagens no processo de osteointegração, a coleta dos dados qualitativos deu-se pela inclusão de uma cunha de alumínio (liga 6063), usada como referencial densitométrico, sendo os dados processados pelo *software* analisador de imagens “ODR” inscrito no programa de análises numéricas MATLAB<sup>®</sup>.

O programa “ODR” forneceu imagens tridimensionais e coloridas, com o emprego da metodologia proposta no Apêndice B.

## **6. Resultados**

### **6.1 Avaliação Clínica**

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais, em suas gaiolas, se mantiveram tranquilos, não ocorrendo perda de peso e as feridas cirúrgicas mantendo-se íntegras.

### **6.2 Avaliação Histológica**

#### **6.2.1 Grupo Experimental G1 (sete dias)**

##### **6.2.1.1 Composto Ósseo de Ricinus (C.O.R.) granulado**

Nesse período, observou-se a presença dos granulados do material envoltos por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea, além de uma grande quantidade de células osteoprogenitoras iniciando a formação de um novo tecido ósseo (Figura 11). Na Figura 12, note-se que o material está envolto por uma grande atividade fibroblástica. Há também grande quantidade de células osteoprogenitoras, osteócitos, osteoblastos, vasos sanguíneos e tecido ósseo neoformado ao lado de um tecido ósseo maduro (Figura 13).

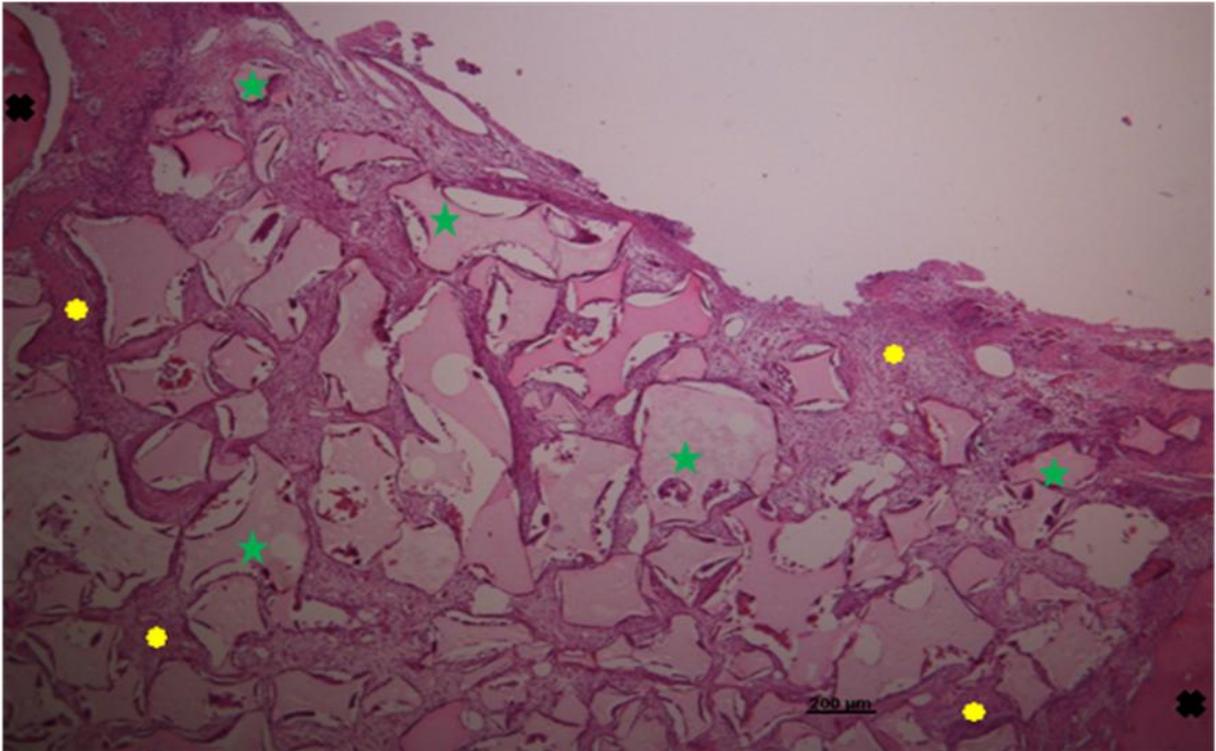


Figura 11. Grupo Experimental G1 – C.O.R. granulado (sete dias). Presença do material (★) entre as extremidades corticais ósseas ( ) e envolto por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (●), ocupando todo o trajeto do defeito ósseo. H.E.

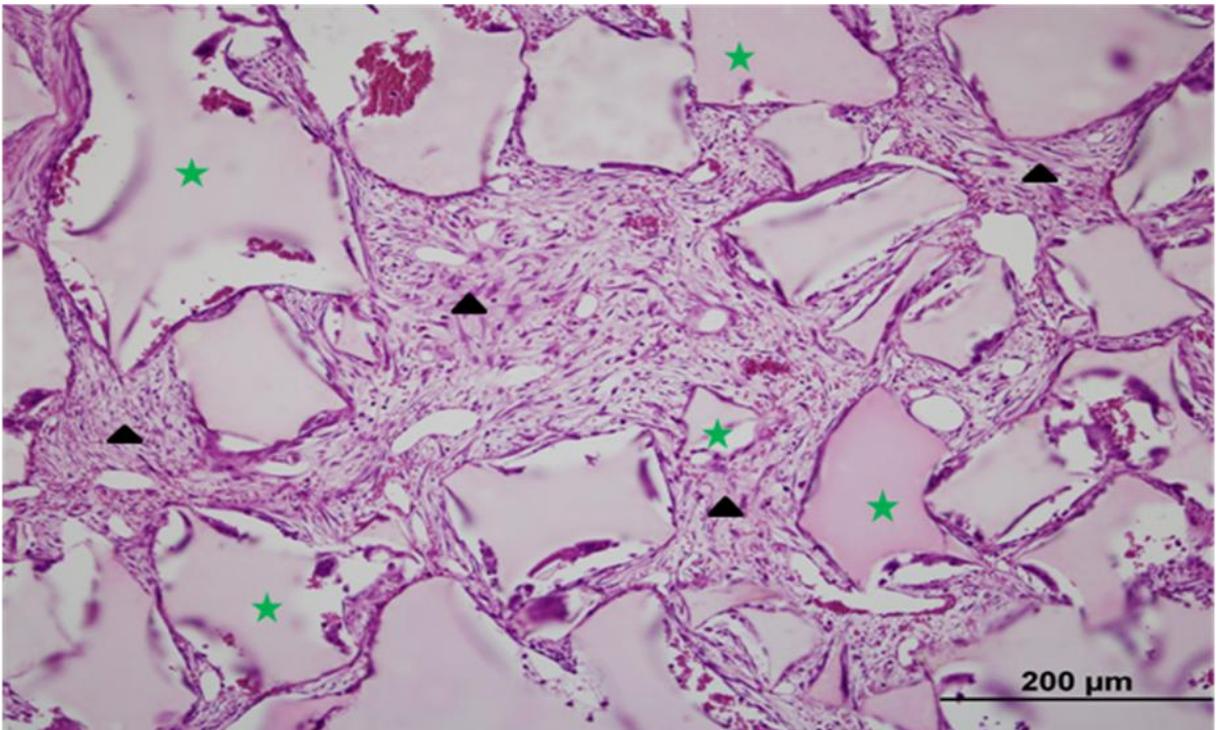


Figura 12. Grupo Experimental G1 – C.O.R. granulado (sete dias). Presença do material granulado (★) entremeadado por um grande aporte de fibras colágenas (▲). H.E.

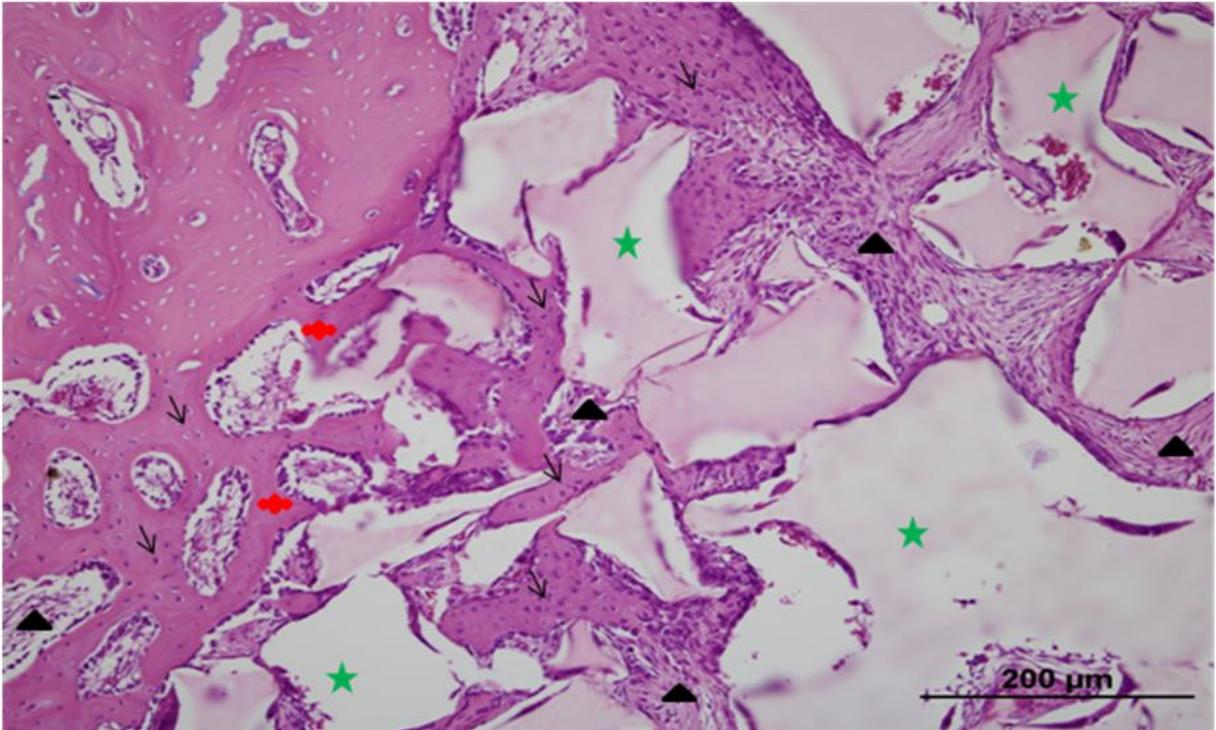


Figura 13. Grupo Experimental G1 – C.O.R. granulado (sete dias). Material (★) circundado pela presença de fibras colágenas (▲) e inúmeros osteócitos (↘) em meio a tecido ósseo neoformado (◆). H.E.

#### 6.2.1.2 Hidroxiapatita (HAP-91)

Nos animais desse grupo, observou-se a presença de um feixe de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea entre as extremidades corticais, e o material entremeado por tecido ósseo neoformado e tecido medular (Figura 14).

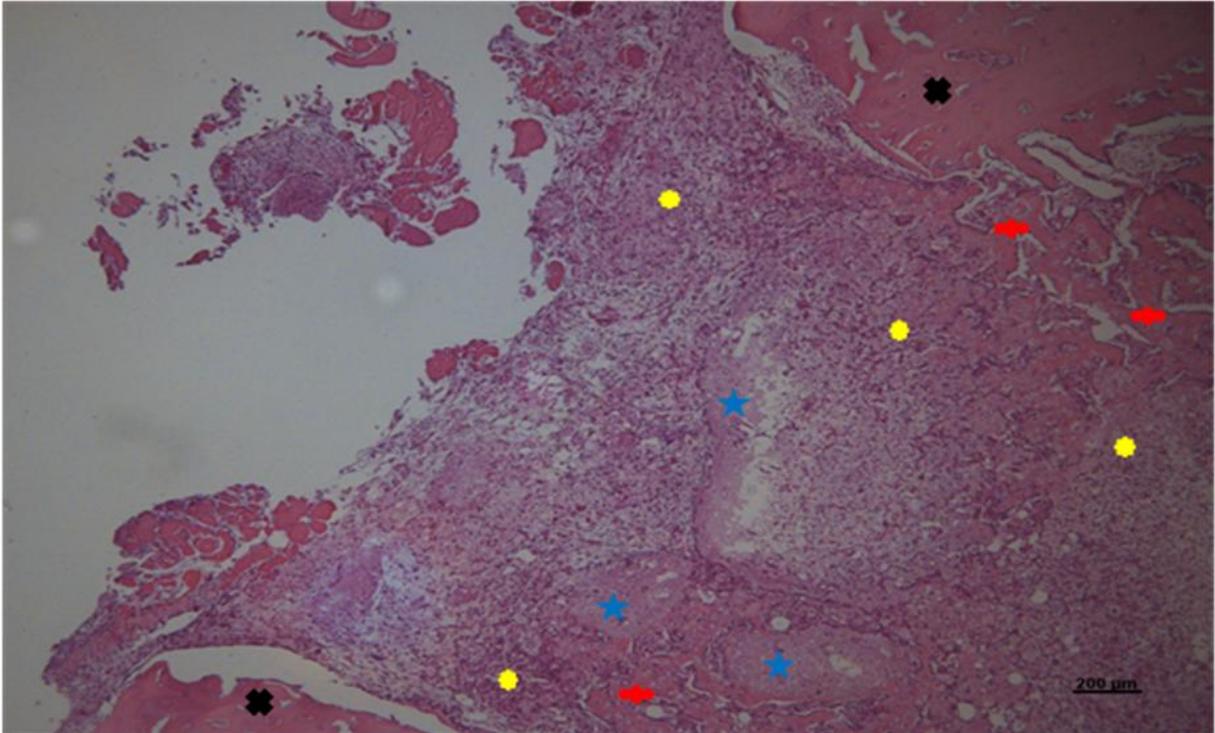


Figura 14. Grupo Experimental G1 – HAP-91 (sete dias). Observa-se o material implantado (★), tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (●), tecido ósseo neoformado (●) conjuntamente ao tecido medular em meio as corticais ósseas (★). H.E.

Na Figura 15, evidenciou-se o material envolto por células osteoprogenitoras, vasos sanguíneos e neoformação óssea, ao lado de um tecido ósseo mais organizado.

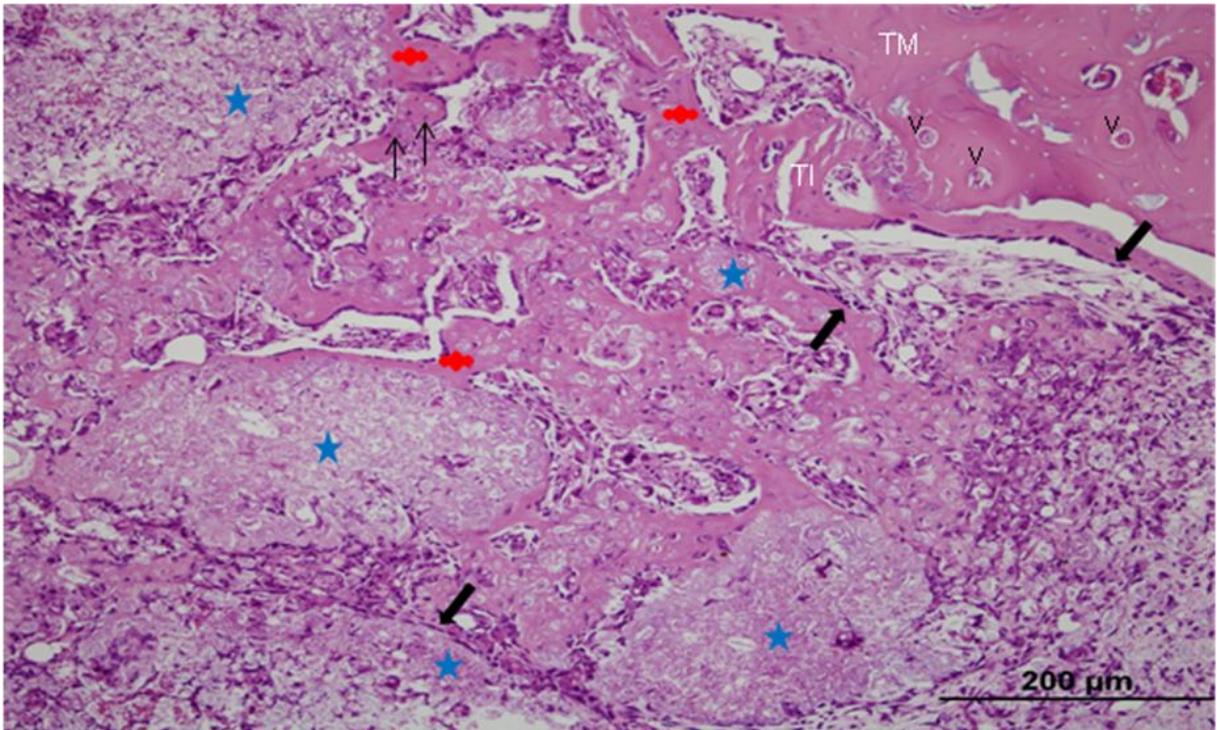


Figura 15. Grupo Experimental G1 – HAP-91 (sete dias). Evidenciando a presença do material (★) entremado ao tecido ósseo neoformado (◆) por vasos sanguíneos (v), osteoblastos (↙) e inúmeros osteócitos (↘) limítrofes ao tecido ósseo maduro (TM) e imaturo (TI). H.E.

Na Figura 16, em maior aumento, observa-se o material suplantado por células osteoprogenitoras, os vasos sanguíneos e a neoformação de tecido ósseo.

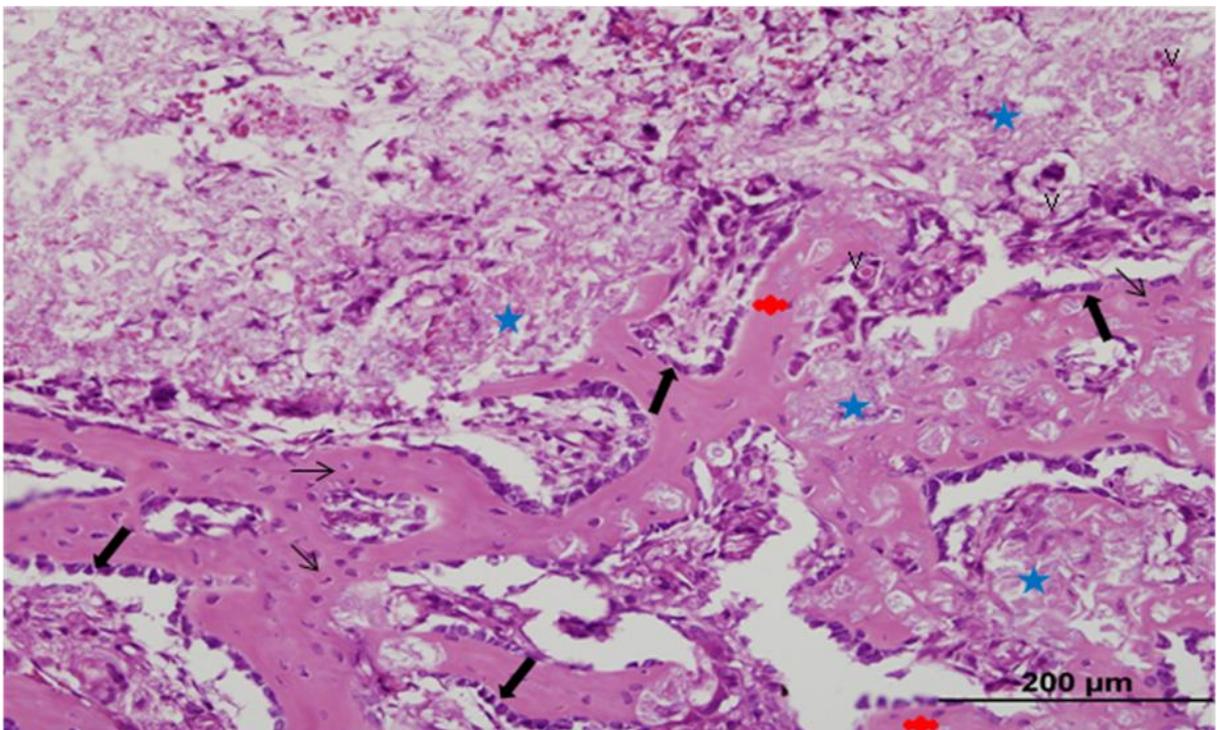


Figura 16. Grupo Experimental G1 – HAP-91 (sete dias). Material (★) entremado por tecido ósseo neoformado (◆) com a presença de inúmeros osteócitos (↘), osteoblastos (↙) e vasos sanguíneos (v). H.E.

### 6.2.1.3 Grupo Controle

Nos animais desse grupo, o canal medular é ocupado por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea e há formação de um trabeculado ósseo pouco espesso e desorganizado (Figura 17).

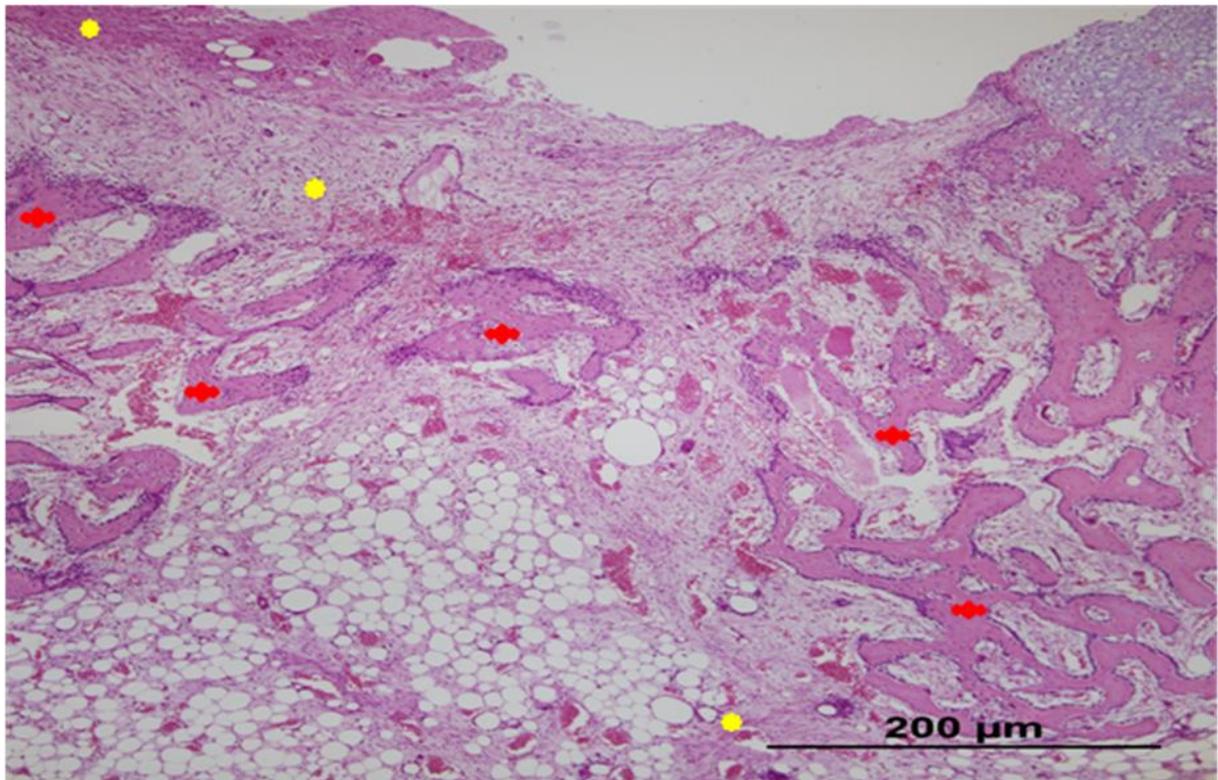


Figura 17. Grupo Experimental G1 – Grupo Controle (sete dias). Loja cirúrgica ocupada por extensa área de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (●) e a presença de um trabeculado ósseo imaturo e desordenado (◆). H.E.

Em maior aumento da região do defeito ósseo, evidenciou-se a presença de fibras colágenas com inúmeros fibroblastos e células osteoprogenitoras, com a formação de um novo tecido ósseo (Figura 18); ao lado do tecido ósseo pouco organizado, nota-se um tecido ósseo mais organizado.

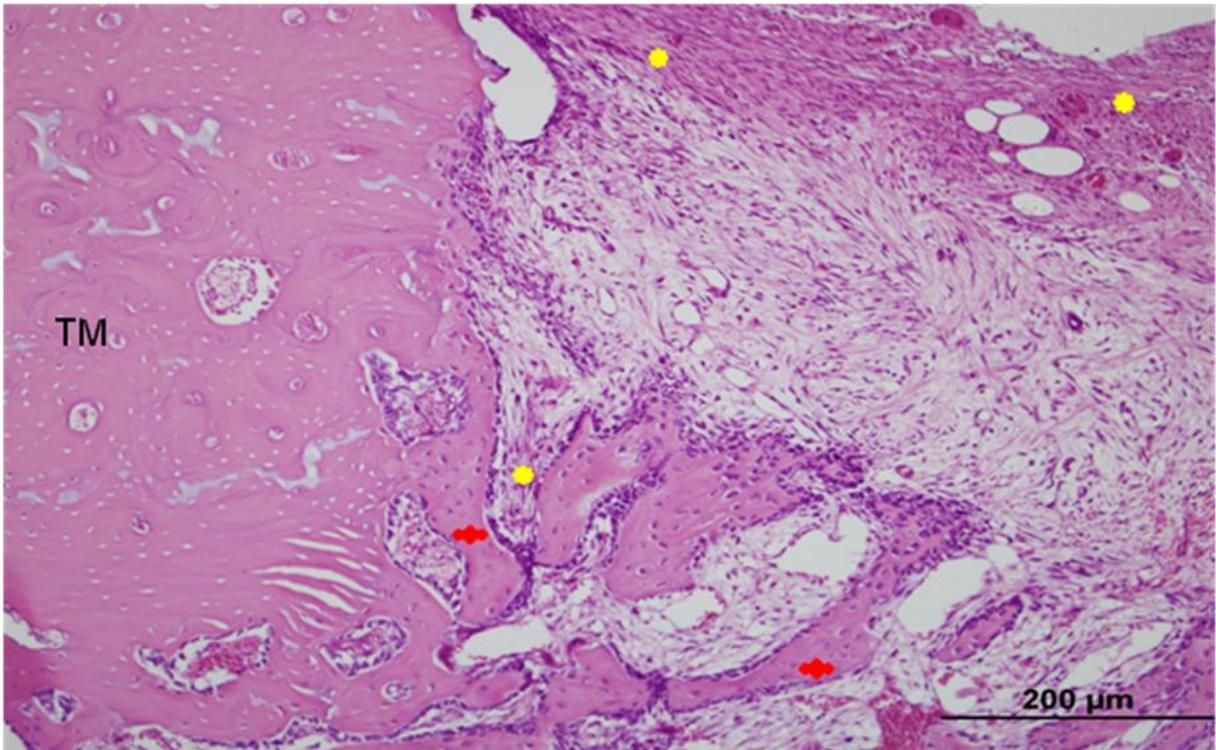


Figura 18. Grupo Experimental G1 – Grupo Controle (sete dias). Em maior aumento, evidencia-se grande quantidade de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (●) e formação de tecido ósseo pouco organizado (✚) ao lado de tecido ósseo maduro (TM). H.E.

## 6.2.2 Grupo Experimental G2 (15 dias)

### 6.2.2.1 Composto Ósseo de Ricinus (C.O.R.) granulado

Nesse período, observou-se a neoformação óssea com um grande aporte de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea, entremeado ao material granulado, se dirigindo para o centro do defeito (Figura 19). Na Figura 20, observa-se, em maior aumento, o material granulado envolto por grande quantidade de osteócitos, osteoblastos, vasos sanguíneos e um aporte de fibras colágenas.

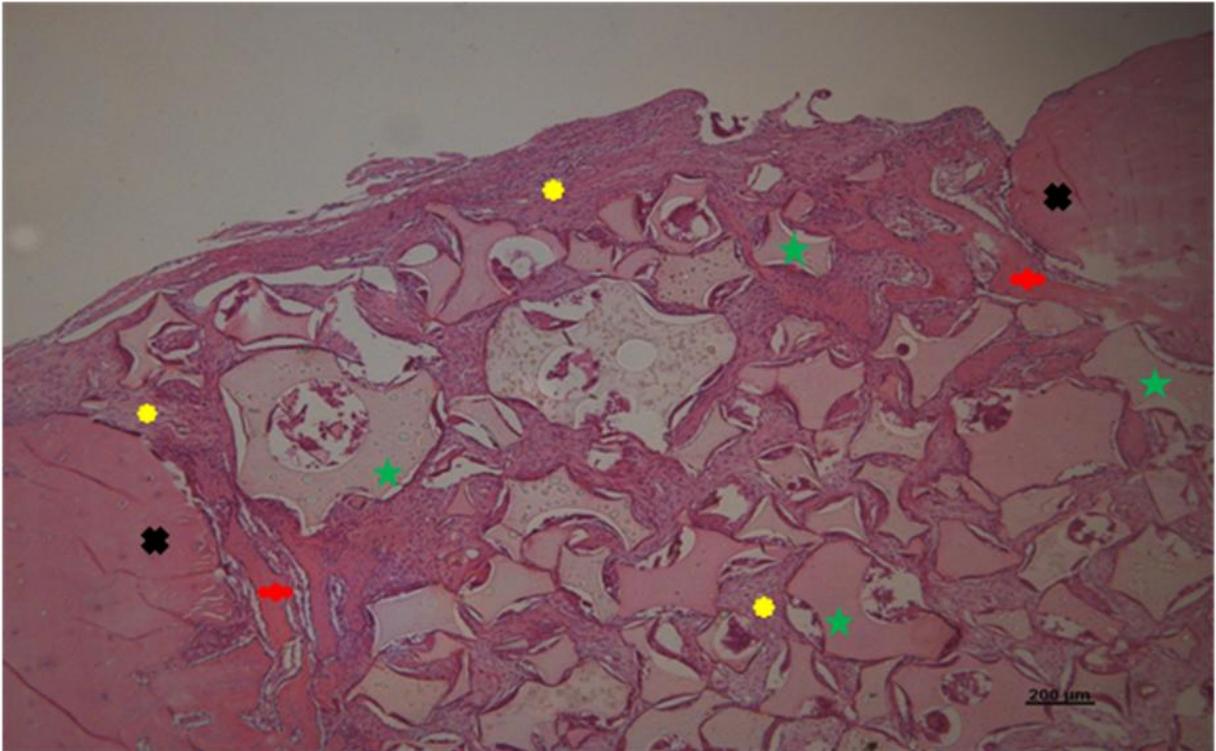


Figura 19. Grupo Experimental G2 – C.O.R. granulado (15 dias). Evidencia-se o material granulado (★) entremeadado a tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (★) e a uma nova formação tecidual óssea (★) entre as corticais ósseas (★). H.E.

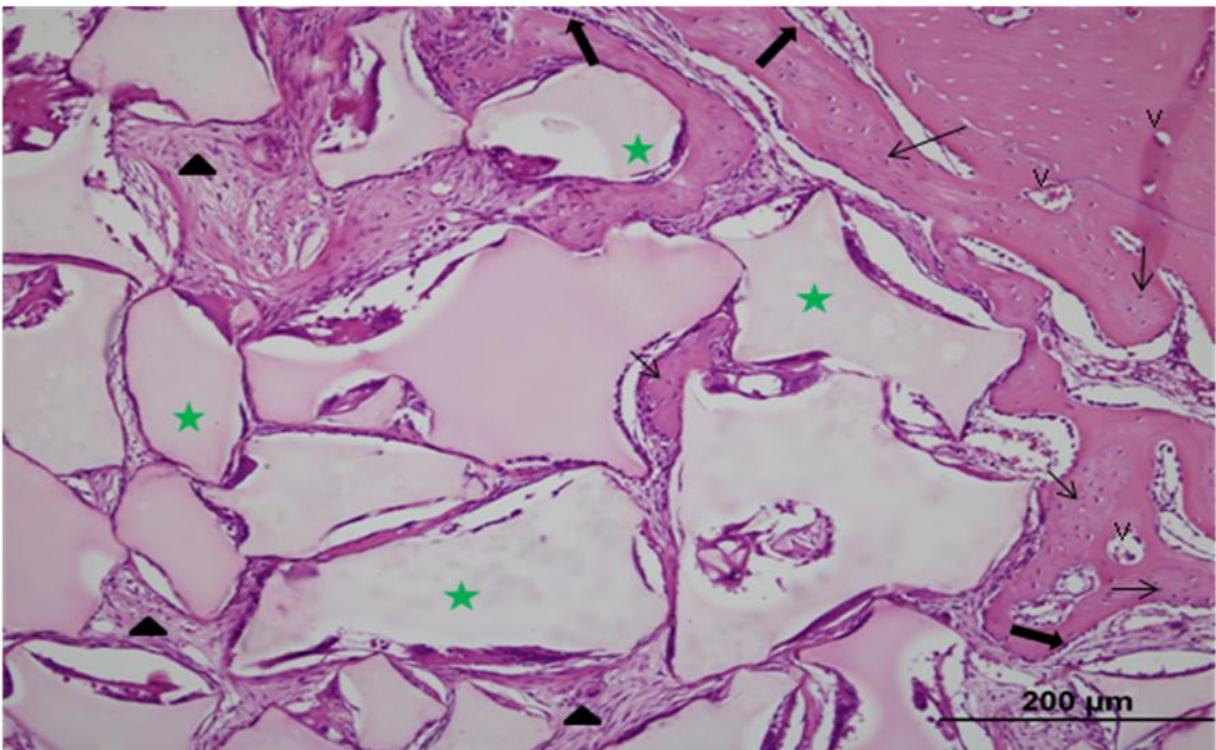


Figura 20. Grupo Experimental G2 – C.O.R. granulado (15 dias). Em maior aumento, observa-se o material (★) circundado por fibras colágenas (▲), inúmeros osteoblastos (↗), osteócitos (↘) e a presença de vasos sanguíneos (v). H.E.

### 6.2.2.2 Hidroxiapatita (HAP-91)

Nesse período, se observa a presença de uma neoformação óssea da periferia da cortical óssea para o centro do defeito ósseo. O material está circundado por uma grande quantidade de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (Figura 21).

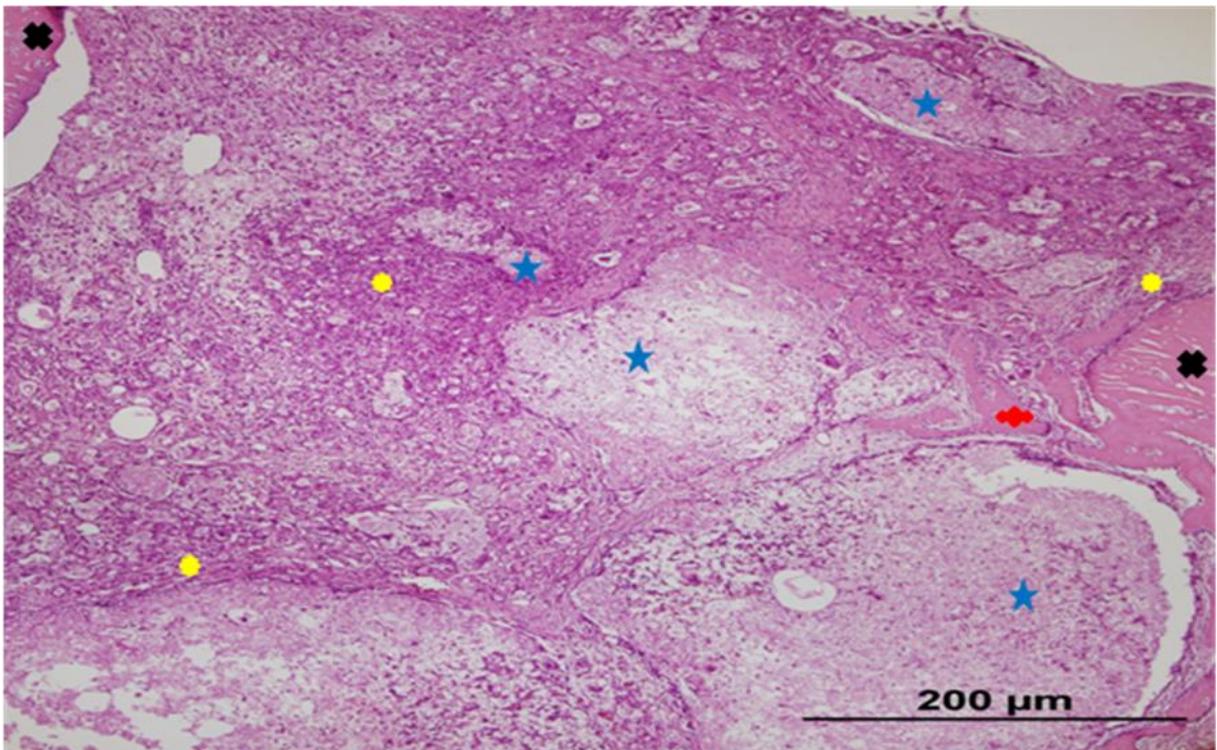


Figura 21. Grupo Experimental G2 – HAP-91 (15 dias). Presença do material (\*) ocupando a loja cirúrgica e entremeada por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (●) com formação de tecido ósseo neoformado (♦) adjacente as cortical óssea (\*). H.E.

Em maior aumento da Figura 22, o tecido conjuntivo sem diferenciação óssea encontra-se repleto de vasos sanguíneos, osteoblastos, fibroblastos e tecido ósseo imaturo.

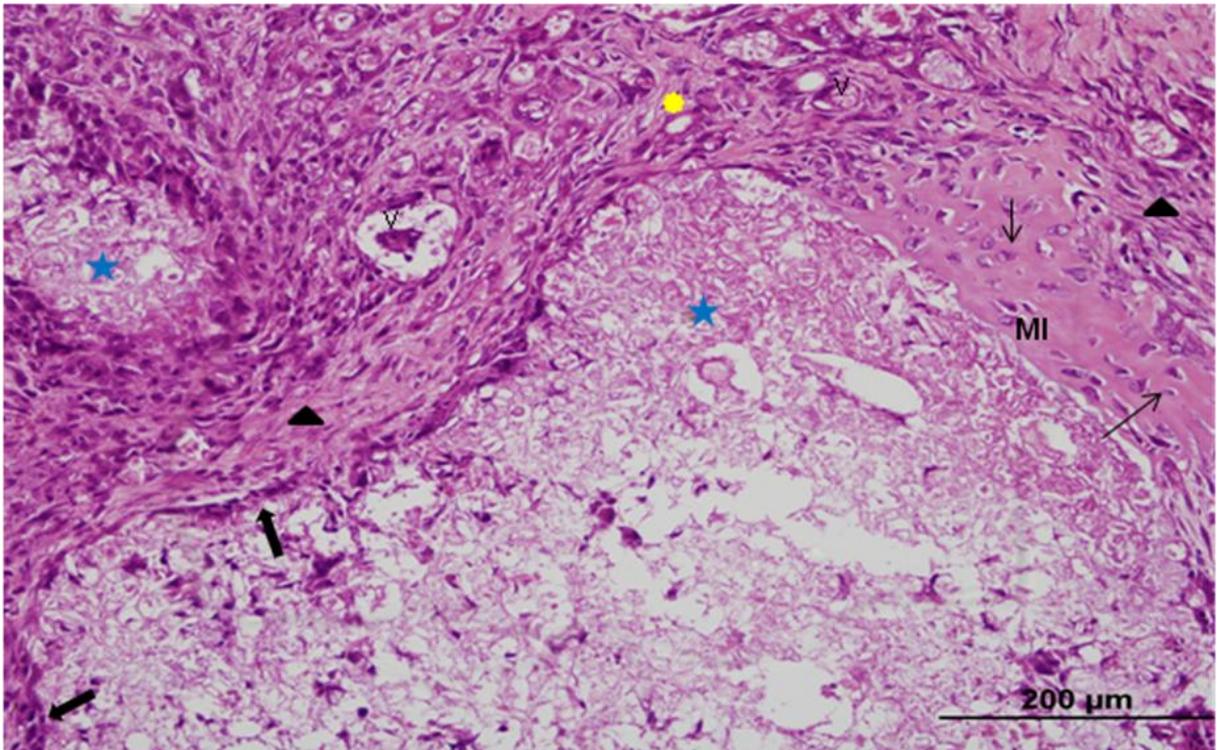


Figura 22. Grupo Experimental G2 – HAP-91 (15 dias). Observa-se resíduos do material (★) envolvidos por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (●), vasos sanguíneos (v), inúmeros osteoblastos (▲) e osteócitos (↘) na matriz óssea imatura (MI). H.E.

Notam-se, na Figura 23, resíduos do material na presença de feixes de fibras colágenas com um grande aporte de células osteoblásticas, fibroblásticas e osteócitos incluídos no novo tecido ósseo.

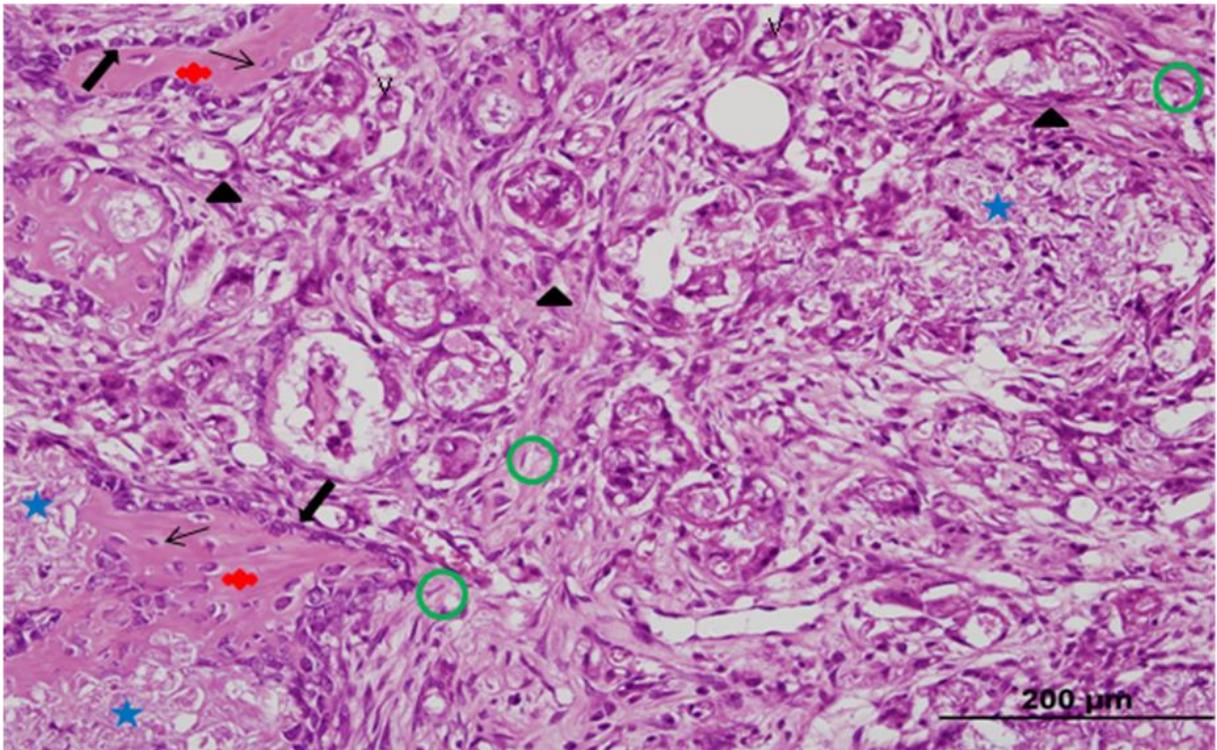


Figura 23. Grupo Experimental G2 – HAP-91 (15 dias). Em maior aumento nota-se resíduos do material (★) entremeado com grande quantidade de vasos sanguíneos (v), fibras colágenas (▲), osteócitos (↗), osteoblastos (↙), fibroblastos (○) e tecido ósseo neoformado (◆). H.E.

### 6.2.2.3 Grupo Controle

Nesse período, observou-se que, nesse grupo, há um direcionamento de formação aparentemente trabecular pouco espessa e a presença conjunta de tecido medular e tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (Figura 24). Em maior aumento dessa figura, visualiza-se um grande aporte de fibras colágenas com as células fibroblásticas entremeando o tecido medular com a neoformação óssea, sendo que esta se encontra repleta de células osteoblásticas e de osteócitos (Figura 25).

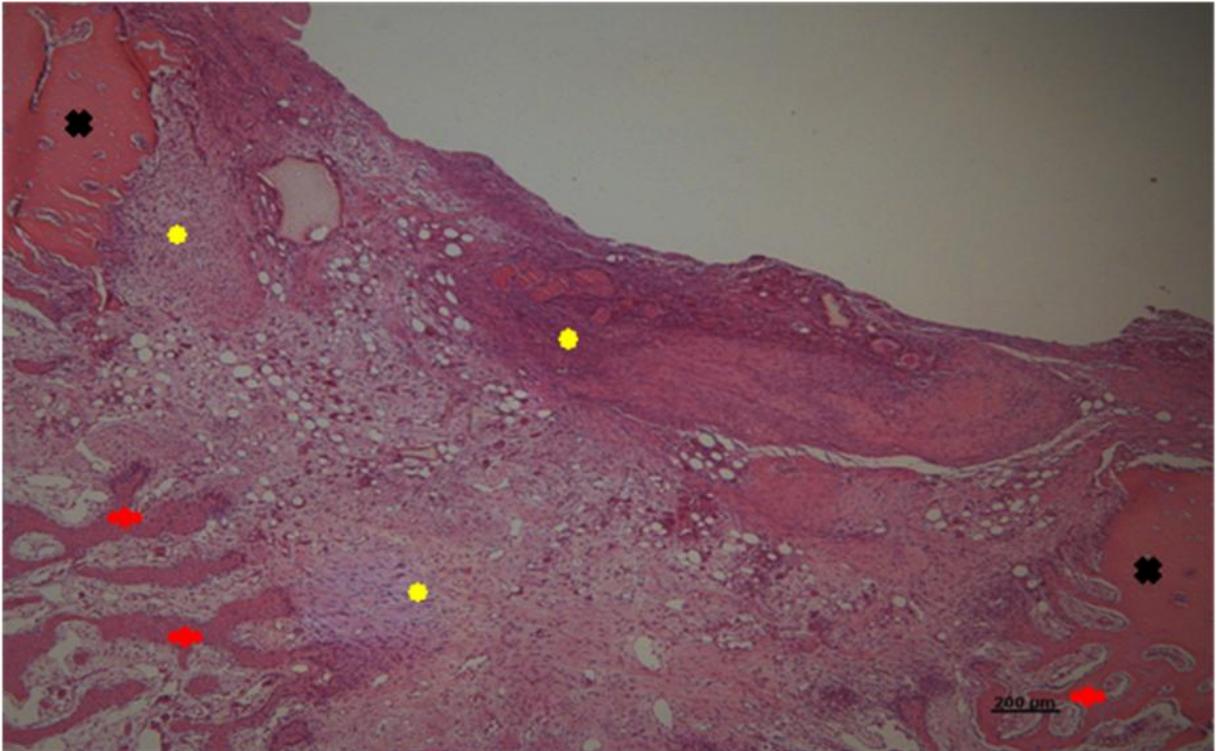


Figura 24. Grupo Experimental G2 – Grupo Controle (15 dias). Evidenciam-se áreas de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (●) com esparsas formações de um trabeculado ósseo desorganizado (◆) em meio às corticais ósseas (★). H.E.

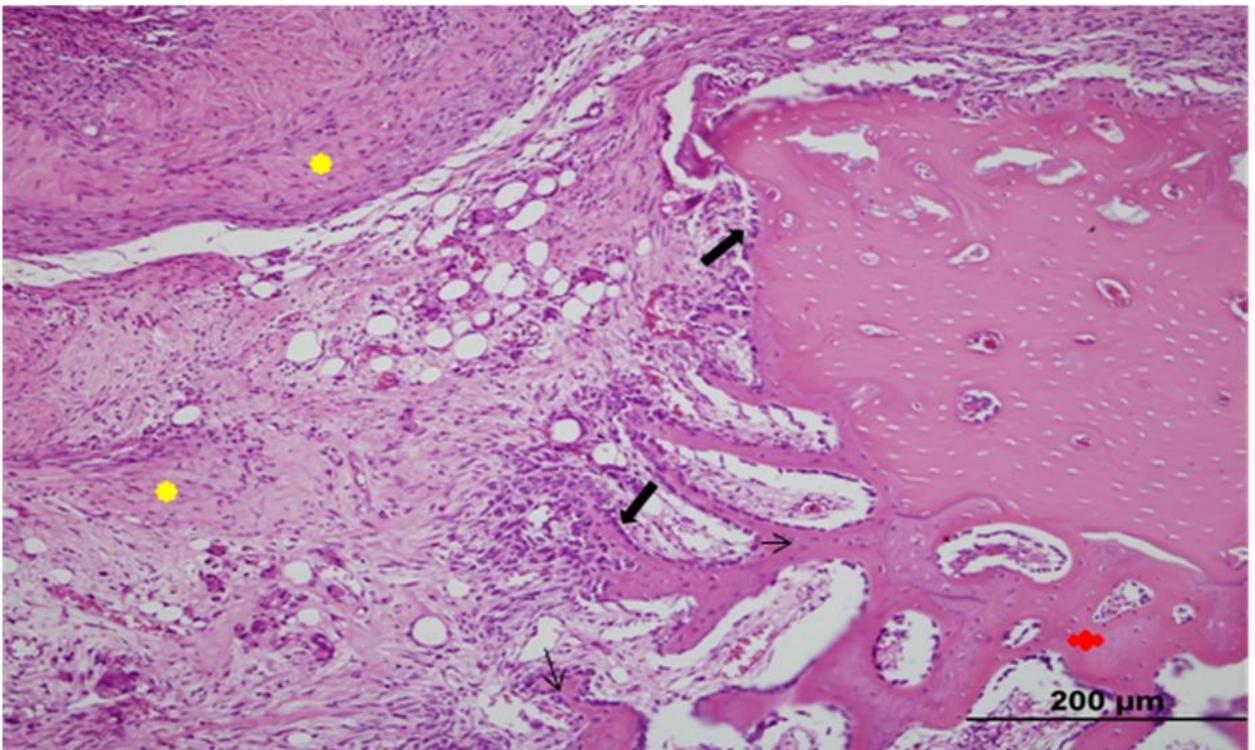


Figura 25. Grupo Experimental G2 – Grupo Controle (15 dias). Em maior aumento, evidencia-se grande quantidade de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (●), osteoblastos (↙), osteócitos (↘) difundidos em tecido ósseo neoformado pouco organizado (◆). H.E.

### 6.2.3 Grupo Experimental G3 (21 dias)

#### 6.2.3.1 Composto Ósseo de Ricinus (C.O.R.) granulado

Nesse período, evidenciou-se maior quantidade de aposição óssea entre o material granulado e sobressaíram-se áreas intergranulares com tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (Figura 26). Na Figura 27, em maior aumento, observou-se que o tecido ósseo neoformado é rico em osteoblastos e osteócitos, entremeando o material e áreas com tecido conjuntivo fibroso.

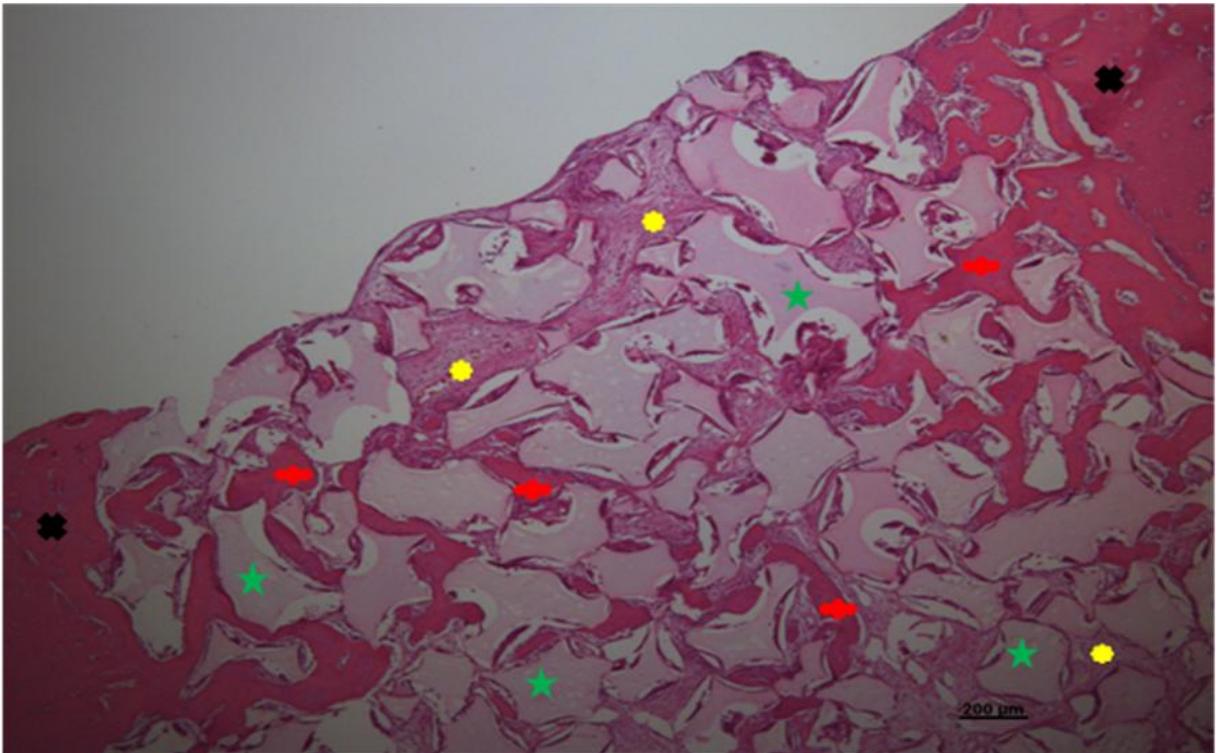


Figura 26. Grupo Experimental G3 – C.O.R. granulado (21 dias). Observa-se o material granulado (★) entre as extremidades corticais ósseas (✱) entremeado com uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado (♦) e tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (●). H.E.

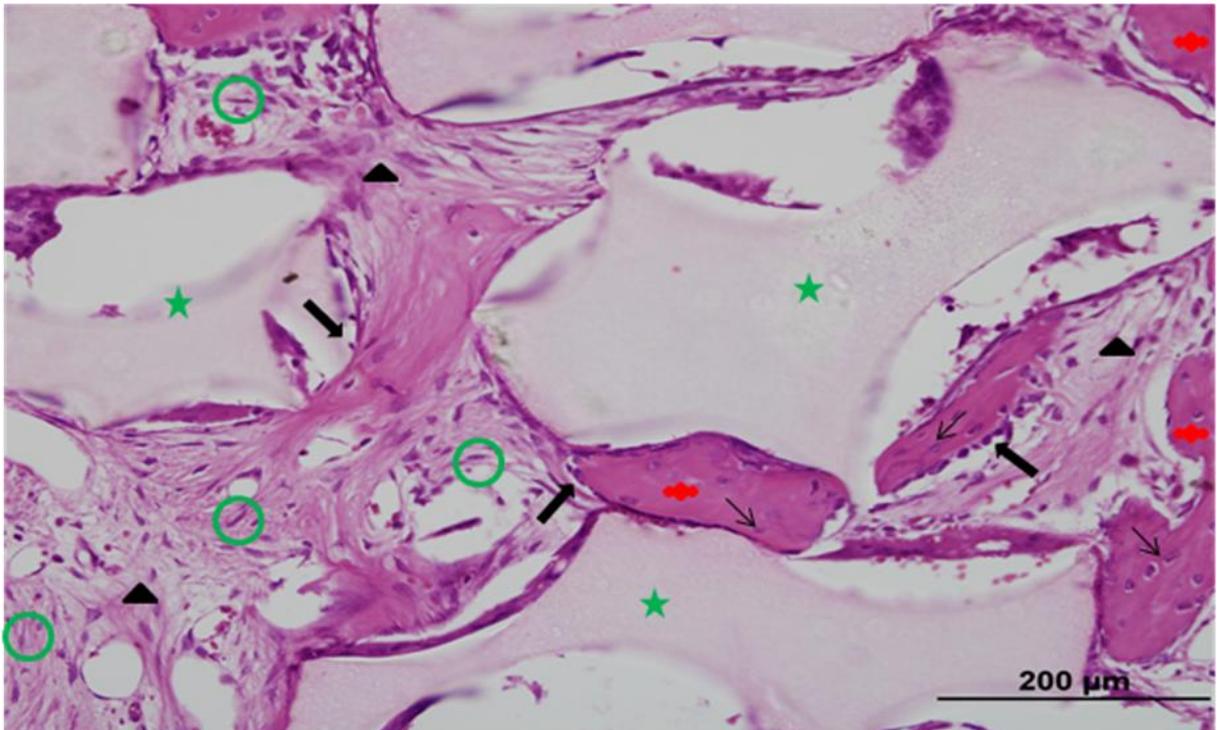


Figura 27. Grupo Experimental G3 – C.O.R. granulado (21 dias). Nota-se neste aumento, fragmentos do material (★) circundado por fibras colágenas (▲), fibroblastos (○), osteoblastos (↙), osteócitos (↘) e tecido ósseo neoformado (◆). H.E.

### 6.2.3.2 Hidroxiapatita (HAP-91)

Nesse grupo, observa-se a presença de um tecido ósseo mais organizado comunicando-se com as extremidades das corticais ósseas (Figura 28). Na Figura 29, evidencia-se pouca permanência do material em meio às células osteoprogenitoras. Em maior aumento, observa-se pouca quantidade do material e a presença de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea em seu interior, além de um grande aporte de células osteoprogenitoras (Figura 30).

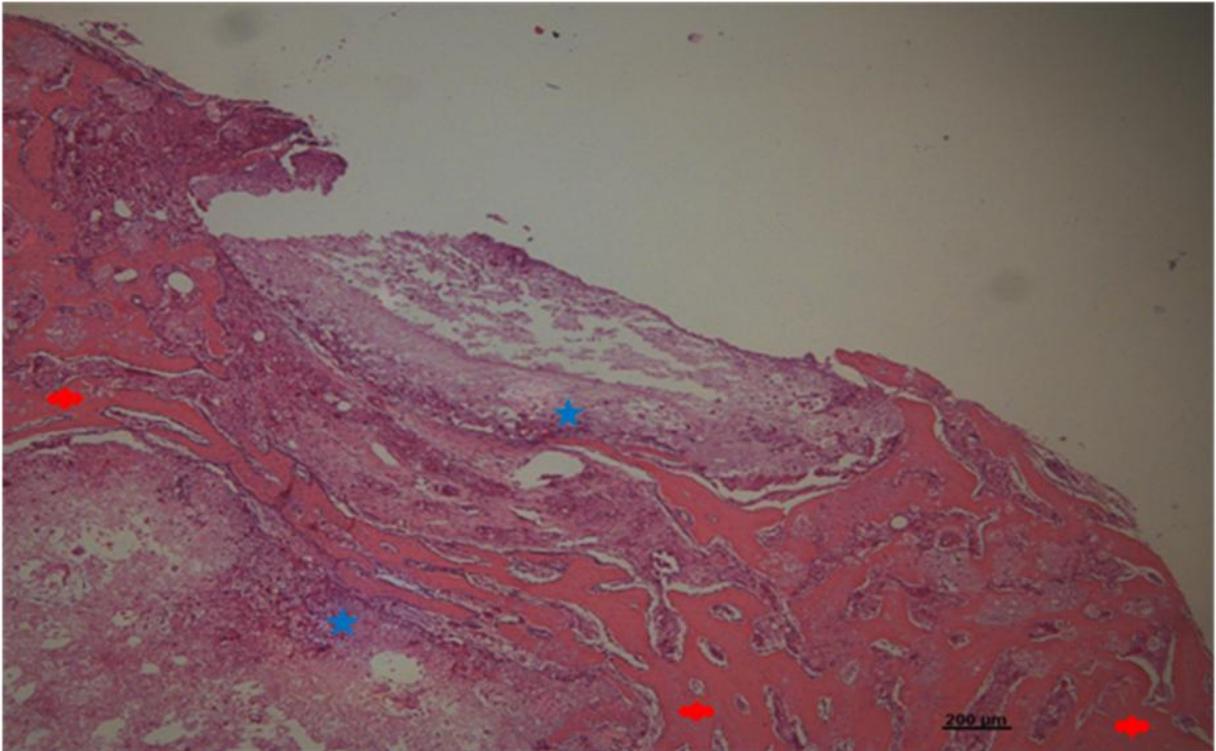


Figura 28. Grupo Experimental G3 – HAP-91 (21 dias). Observa-se o material (★) em meio a um trabeculado ósseo mais desenvolvido (◆). H.E.

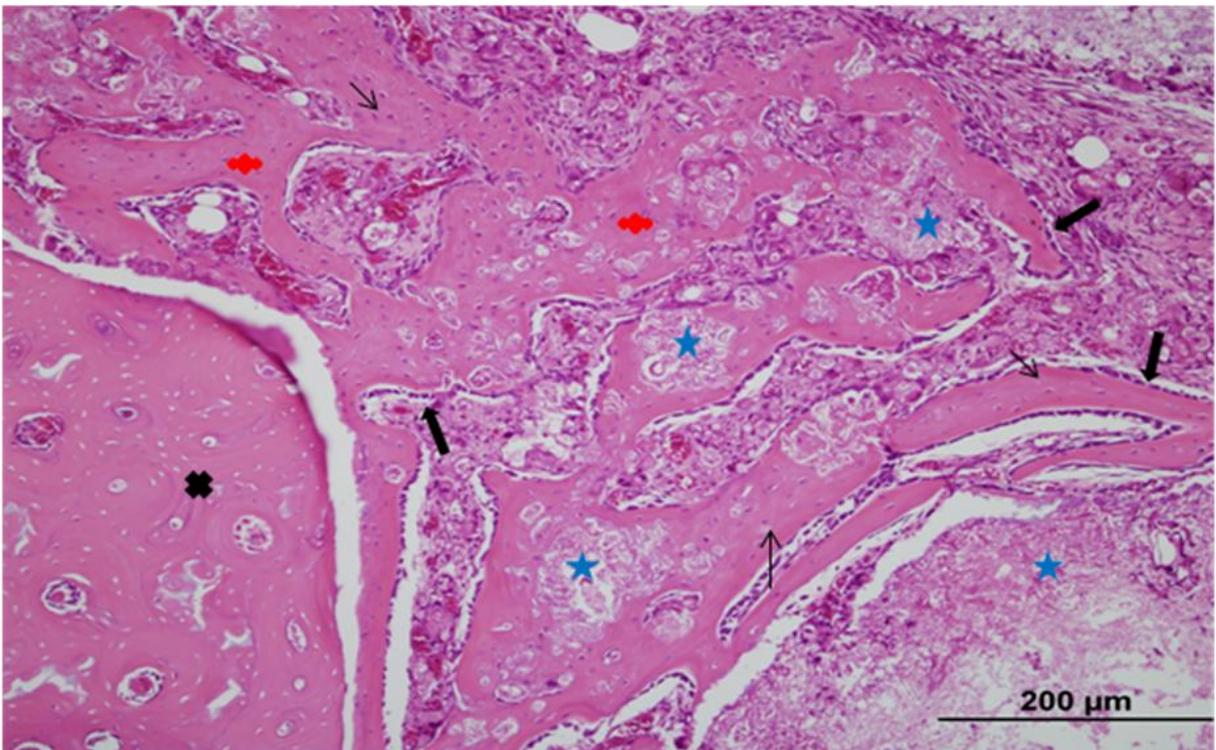


Figura 29. Grupo Experimental G3 – HAP-91 (21 dias). Observa-se resíduos do material (★), osteócitos (↗), osteoblastos (↙) em meio a um tecido ósseo neoformado e pouco organizado (◆), e ao lado de um tecido ósseo mais organizado (◆). H.E.

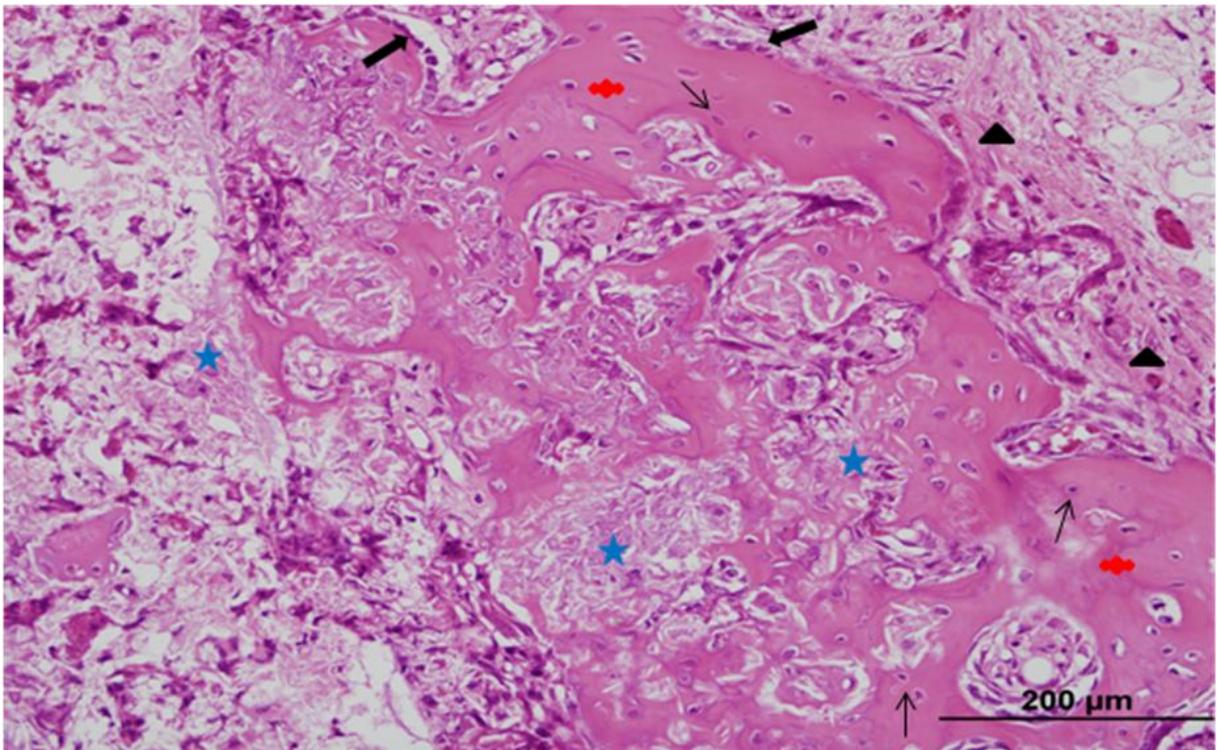


Figura 30. Grupo Experimental G3 – HAP-91 (21 dias). Resíduos do material (★), fibras colágenas (▲), osteócitos (↙) e osteoblastos (↗) em meio ao tecido ósseo neoformado (◆). H.E.

### 6.2.3.3 Grupo Controle

Nesse período, evidencia-se grande quantidade de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea e conteúdo medular entre as corticais ósseas (Figura 31). Em maior aumento, há tecido conjuntivo sem diferenciação óssea e conteúdo medular com a presença de intensa atividade fibroblástica (Figura 32).

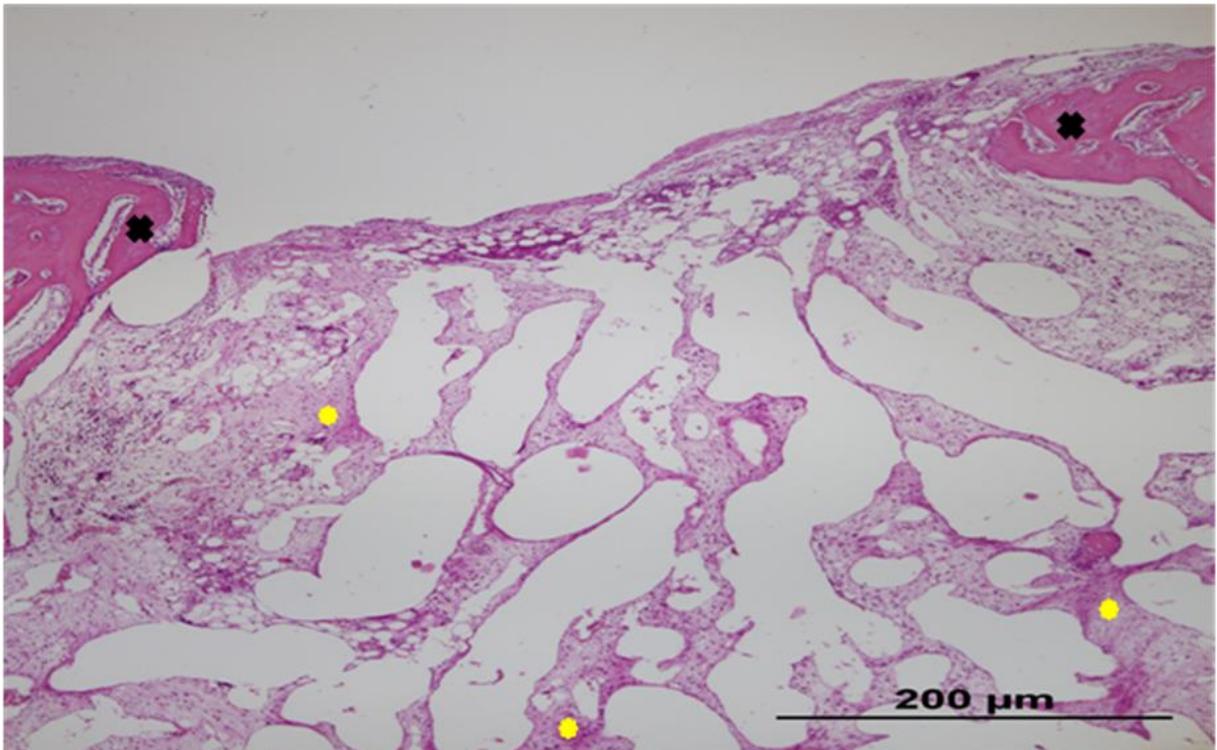


Figura 31. Grupo Experimental G3 – Grupo Controle (21 dias). Evidenciando grande deposição de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (●) entre as extremidades corticais ósseas (\*). H.E.

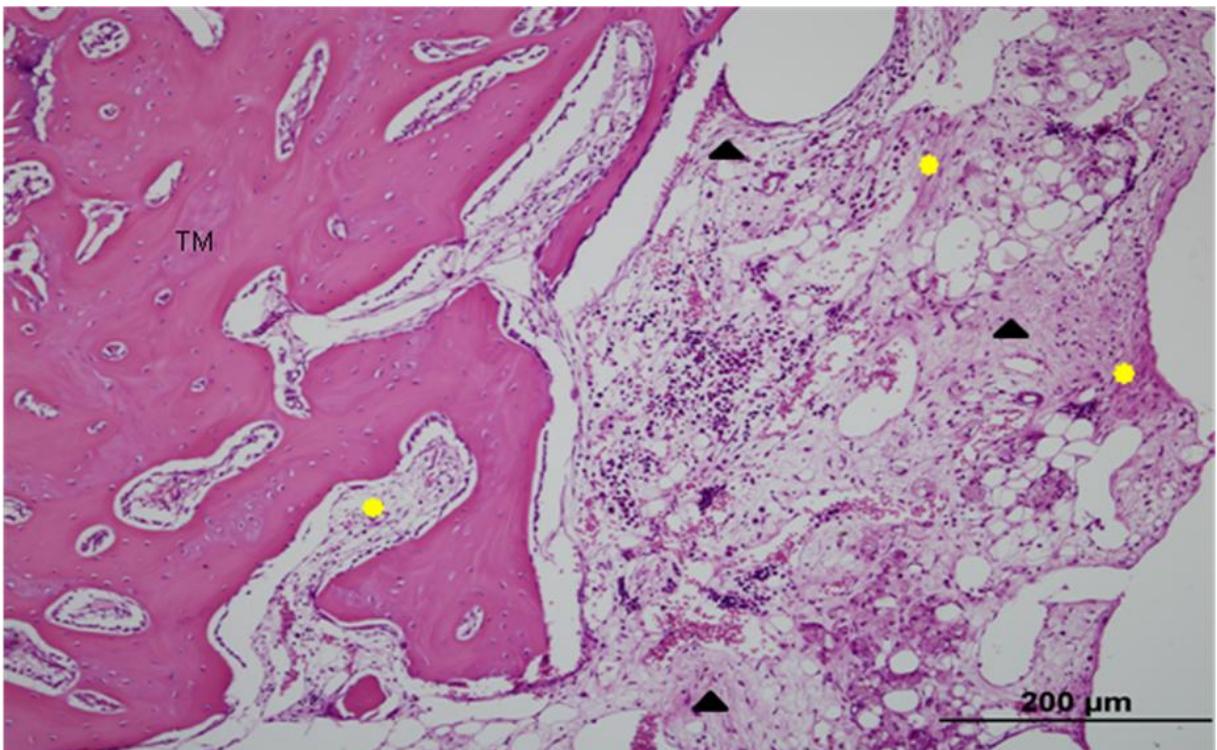


Figura 32. Grupo Experimental G3 – Grupo Controle (21 dias). Imagem da figura anterior em maior aumento evidenciando tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (●) e fibras colágenas (▲) ao lado de tecido ósseo maduro (TM). H.E.

## 6.2.4 Grupo Experimental G4 (35 dias)

### 6.2.4.1 Composto Ósseo de Ricinus (C.O.R.) granulado

Nesse período, a área implantada encontra-se mais enriquecida de uma neoformação óssea, mantendo-se com um grande aporte de fibras colágenas (Figura 33).

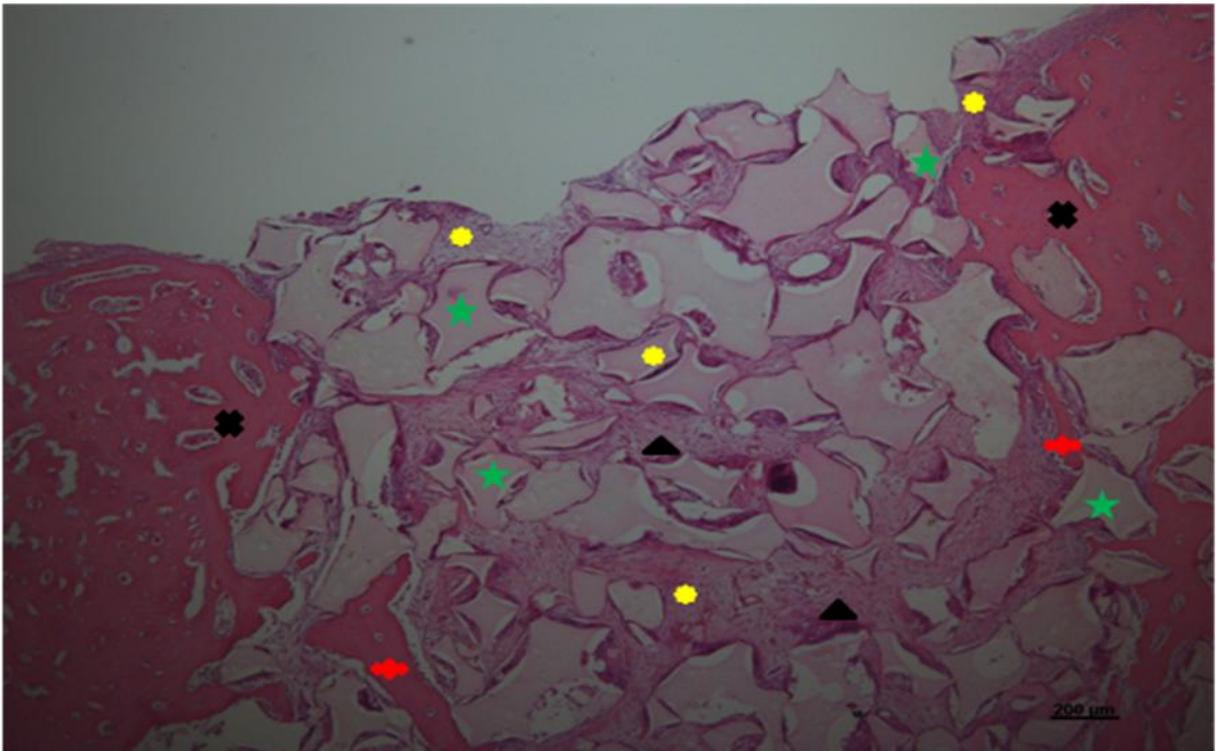


Figura 33. Grupo Experimental G4 – C.O.R. granulado (35 dias). Evidencia-se pouca quantidade do material granuloso (★) entre as extremidades corticais ósseas (○) e envolvido conjuntamente por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (●), fibras colágenas (▲) e tecido ósseo maduro (◆). H.E.

Em maior aumento, observa-se o material granuloso envolvido por um aporte de fibras colágenas com intensas atividades fibroblástica e osteoblástica, e a presença de um novo tecido ósseo (Figura 34).

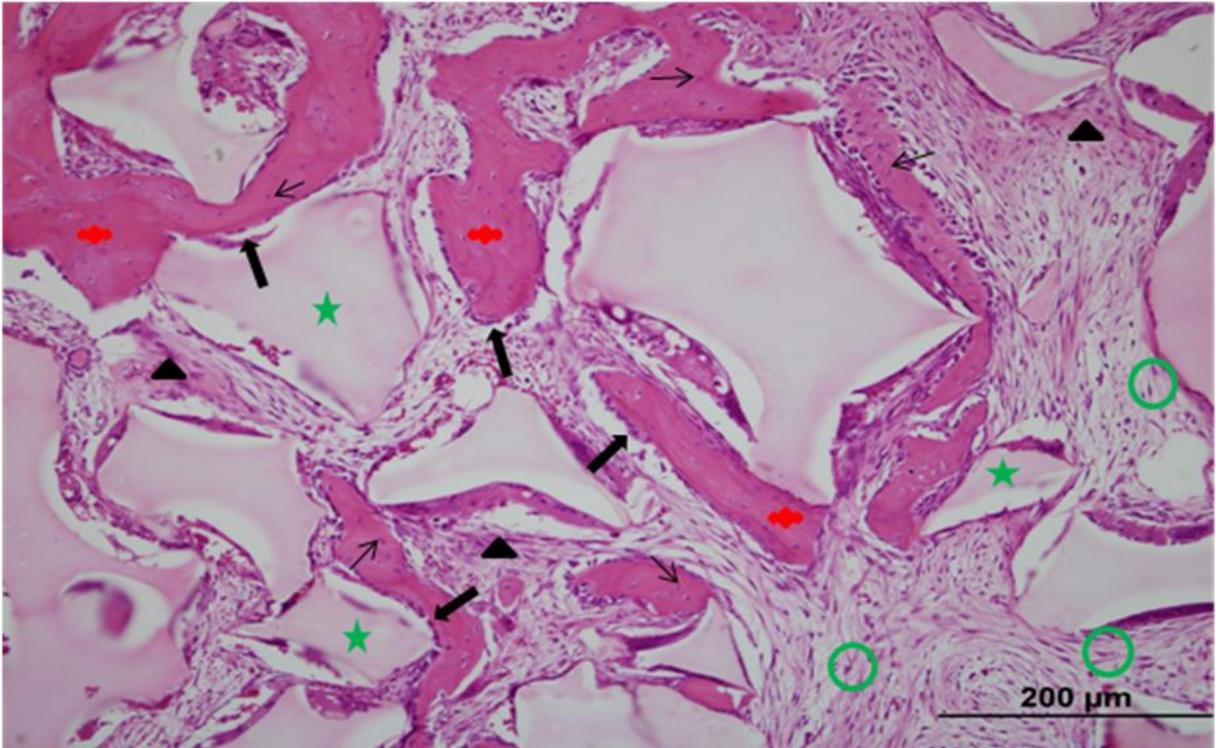


Figura 34. Grupo Experimental G4 – C.O.R. granulado (35 dias). Evidencia-se material (★) envolvido por tecido ósseo neoforado (◆) com grande quantidade de osteoblastos (↙), osteócitos (↘), fibras colágenas (▲) e fibroblastos (○). H.E.

#### 6.2.4.2 Hidroxiapatita (HAP-91)

Nesse período, as corticais ósseas do defeito ósseo encontram-se unidas por um tecido ósseo maduro; e há pouca permanência do material (Figura 35).

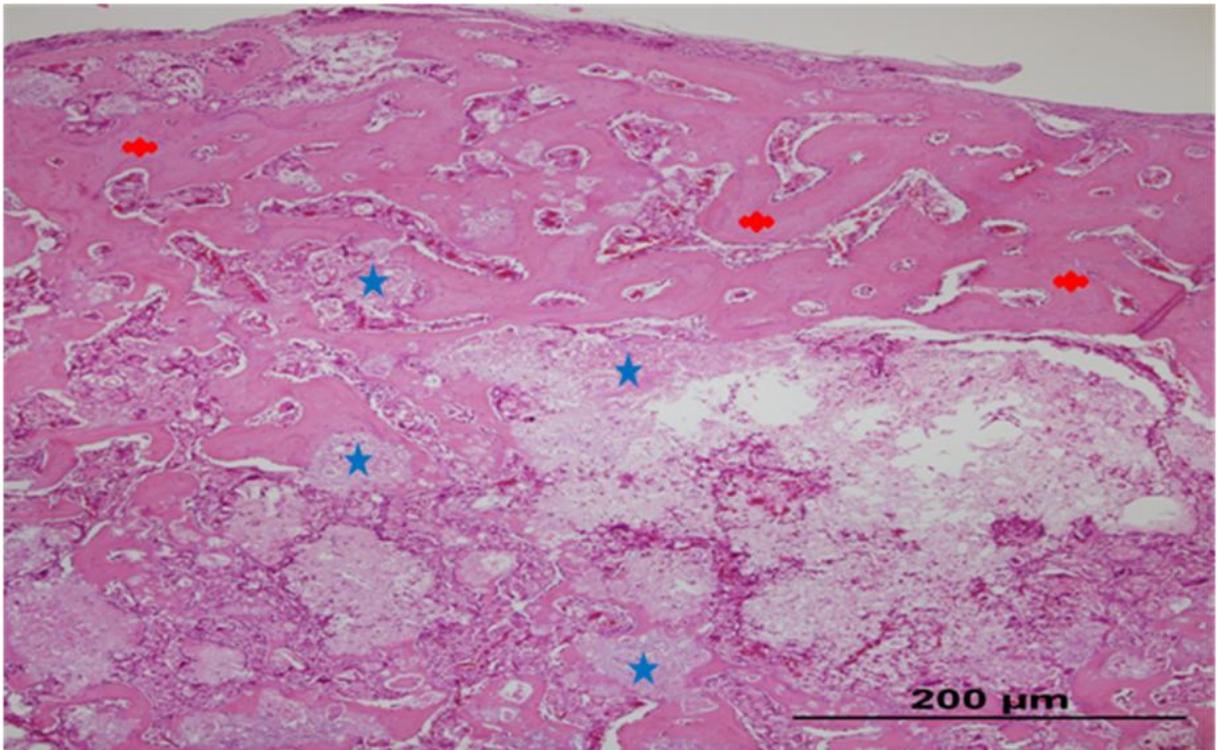


Figura 35. Grupo Experimental G4 – HAP-91 (35 dias). Loja cirúrgica mostrando pouca quantidade do material (★) envolto por um trabeculado ósseo mais organizado (♥). H.E.

Em maior aumento, encontram-se resíduos do material em meio ao tecido ósseo mais organizado e a presença de células osteoblásticas circundando as esparsas formações trabeculares (Figura 36).

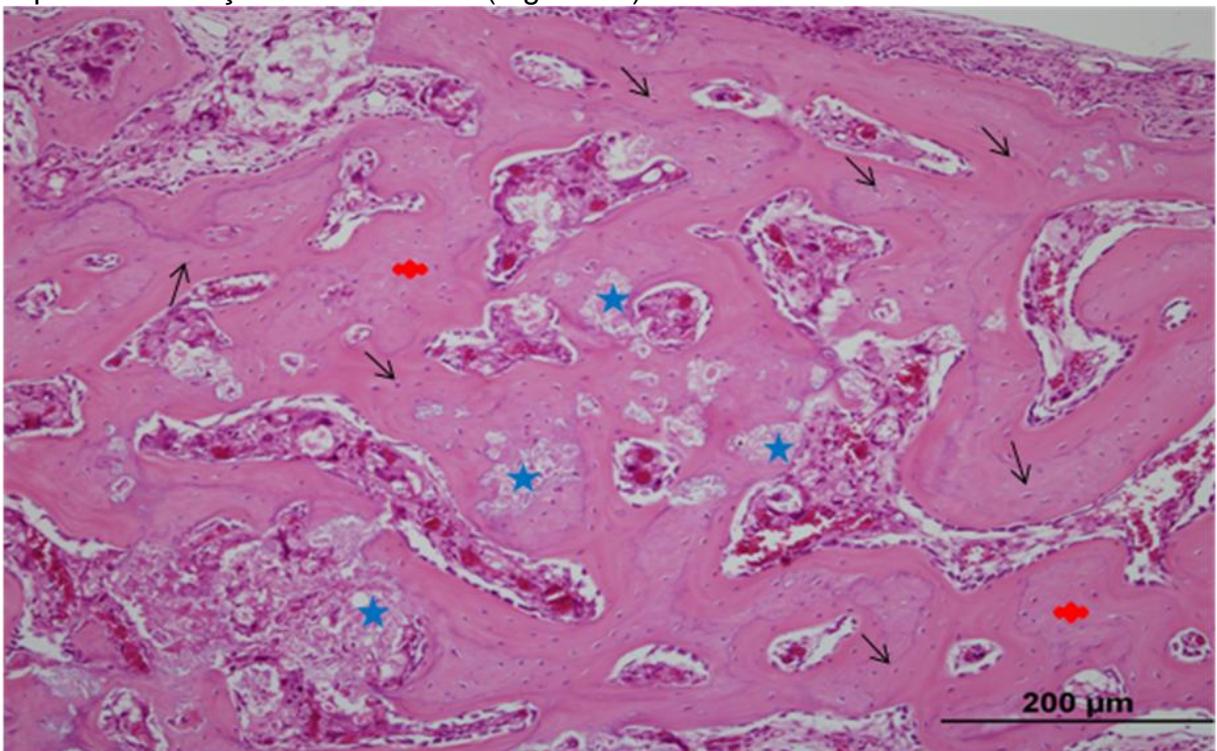


Figura 36. Grupo Experimental G4 – HAP-91 (35 dias). Evidencia-se em maior aumento, pouca quantidade do material (★), um grande aporte de células osteoblásticas (↘) em um tecido ósseo mais organizado (♥). H.E

### 6.2.4.3 Grupo Controle

Na loja cirúrgica ainda se observa resquícios de tecido medular (Figura 37).

Observa-se, nesse período, em maior aumento, o estreitamento do defeito ósseo preenchido por tecido medular em meio às corticais ósseas; ressalta-se, ainda, a presença de fibras colágenas e vasos sanguíneos, e um grande aporte de células osteoblásticas (Figura 38).

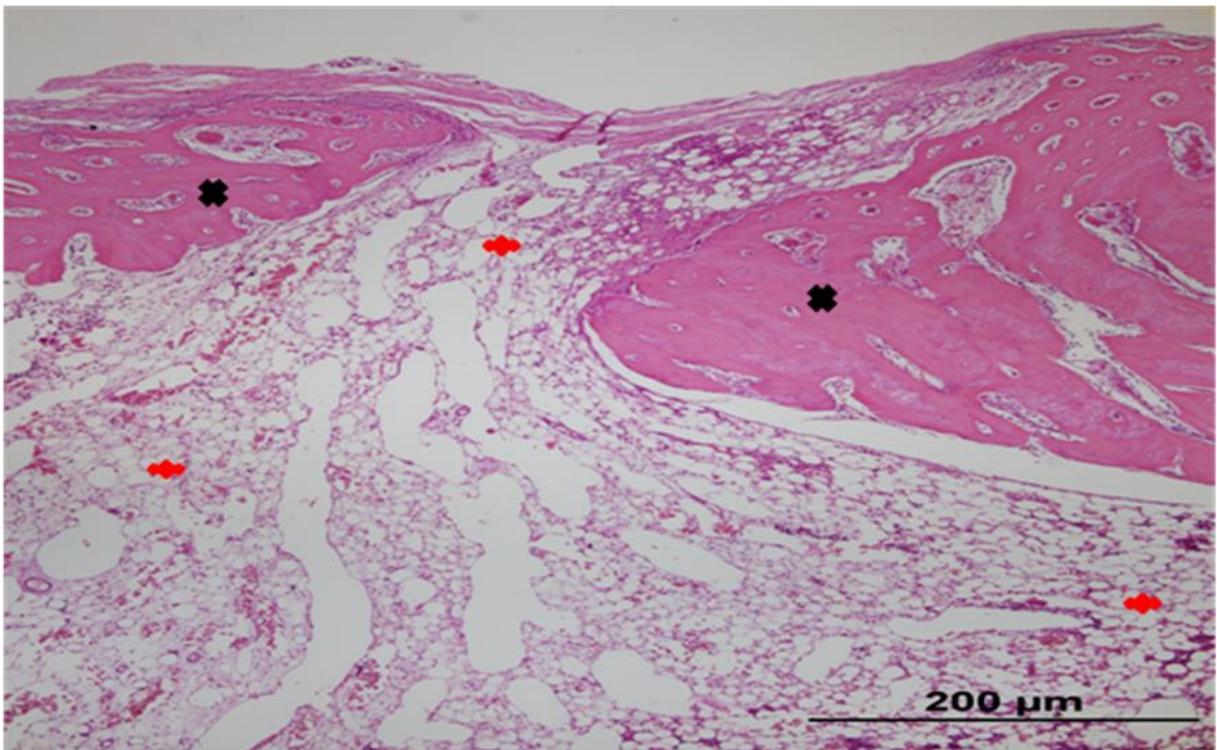


Figura 37. Grupo Experimental G4 – Grupo Controle (35 dias). Evidencia-se grande quantidade de tecido medular (✱) envolto pelas corticais ósseas (✱). H.E.

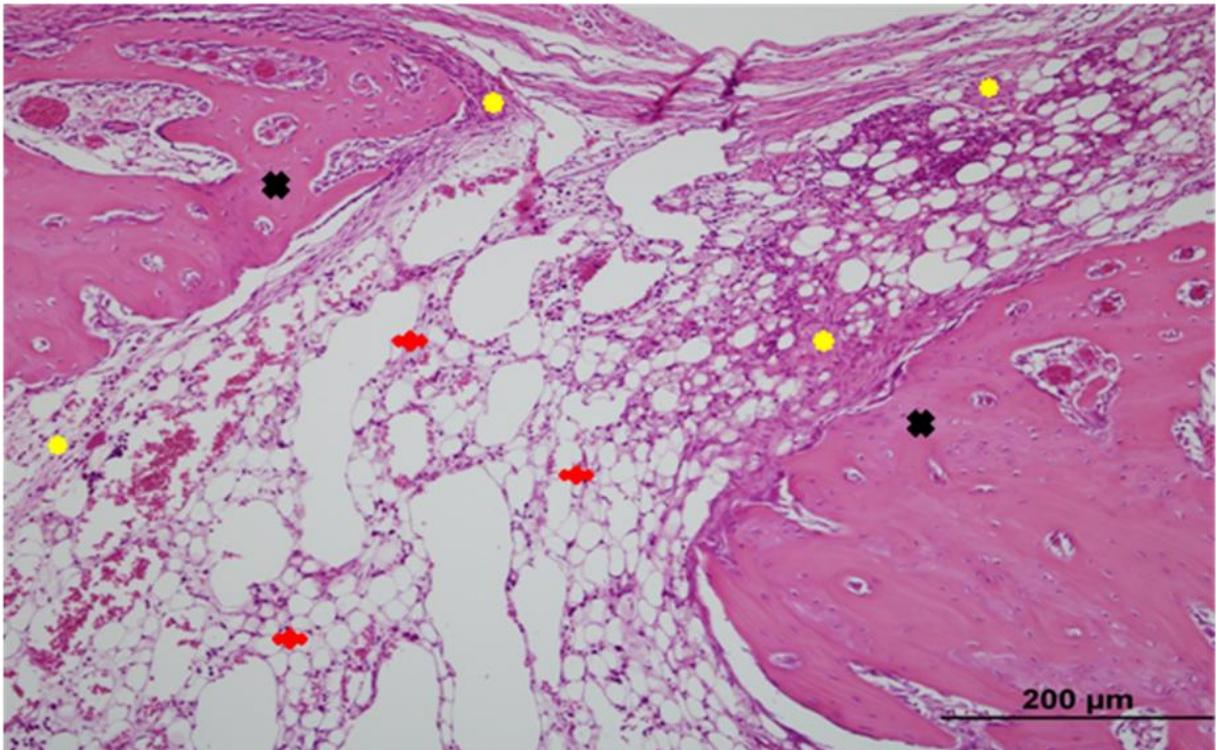


Figura 38. Grupo Experimental G4 – Grupo Controle (35 dias). Imagem da figura anterior em maior aumento evidenciando o estreitamento das corticais ósseas (\*) com a presença de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (●) e tecido medular (●). H.E.

### 6.3 Avaliação morfométrica

Aquisição das medidas de comprimento em ( $\mu\text{m}$ ) nos quatro períodos experimentais.

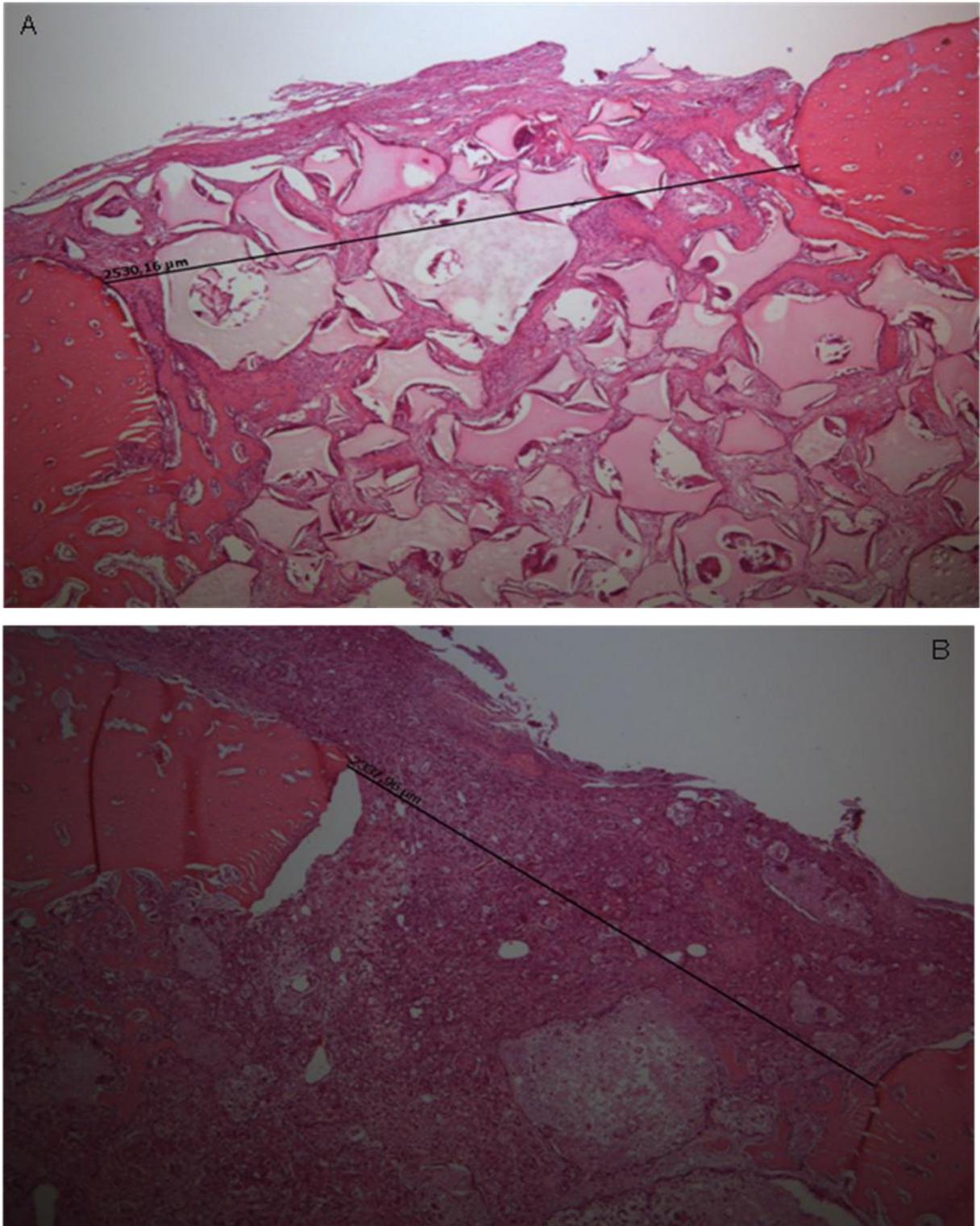


Figura 39. Biomaterial C.O.R. granulado (A) e HAP-91 (B) com suas unidades de comprimento ( $\mu\text{m}$ ) entre as corticais ósseas em G2.

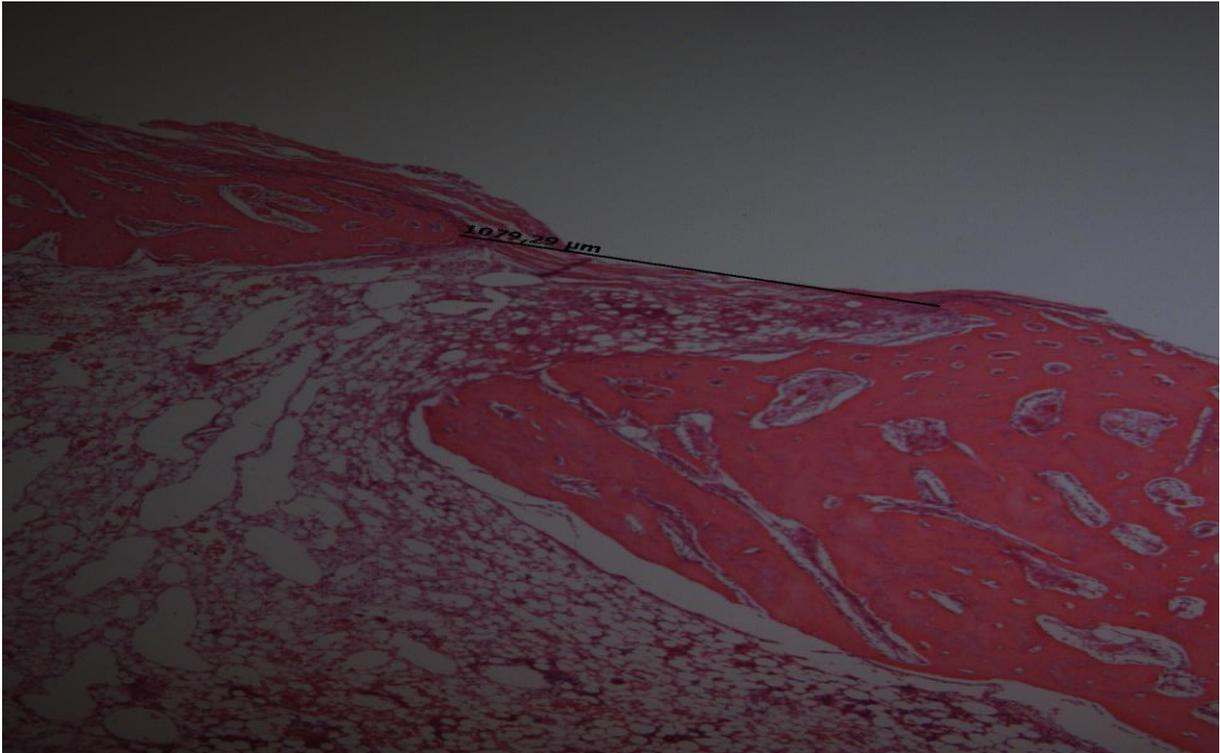


Figura 40. Aquisição da unidade de comprimento em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) entre as corticais ósseas do Grupo Controle (coágulo) em G4.

Os valores quantitativos das medidas de comprimento em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) das médias ( $\bar{x}$ ), os desvios-padrão (S) e as medianas (Md) entre as corticais ósseas dos defeitos ósseos com os materiais implantados e o Grupo Controle (coágulo), nos quatro períodos experimentais, descrevem o fator de osteointegração e estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Média ( $\bar{x}$ ), desvio-padrão (S) e mediana (Md) do comprimento ( $\mu\text{m}$ ) entre as corticais ósseas.

Grupo	Controle		Biomaterial C.O.R. granulado		Biomaterial HAP-91	
	$\bar{x} \pm S$	Md	$\bar{x} \pm S$	Md	$\bar{x} \pm S$	Md
G1	2636,00 $\pm$ 94,82	2664,56 b	3616,67 $\pm$ 50,50	3613,16 *a	2411,07 $\pm$ 92,48	2394,85 *a
G2	3166,90 $\pm$ 65,28	3164,74 a	2621,55 $\pm$ 20,83	2598,41 *b	2358,77 $\pm$ 70,07	2354,78 *a
G3	1669,39 $\pm$ 87,12	1652,84 c	2129,00 $\pm$ 37,45	2089,89 *c	2098,64 $\pm$ 61,85	2098,04 *b
G4	1103,30 $\pm$ 87,84	1097,22 d	1940,81 $\pm$ 47,64	1940,82 *c	-	-

\* diferença significativa em relação ao controle ( $P < 0,05$ ).

<sup>a</sup> medianas seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si ( $P < 0,05$ ).

#### 6.4 Avaliação densitométrica

As radiografias foram analisadas qualitativamente nos quatro grupos experimentais pelo *software* ODR; com isso, obtiveram-se as imagens das áreas de estudo por meio das imagens originais conforme mostrado no apêndice B.

Na figura 41 são mostradas as imagens digitalizadas das tíbias esquerda com o biomaterial HAP-91 e direita com o biomaterial C.O.R. granulado e Grupo Controle (coágulo), e a barra colorida como referencial a cunha de alumínio no grupo experimental G1.

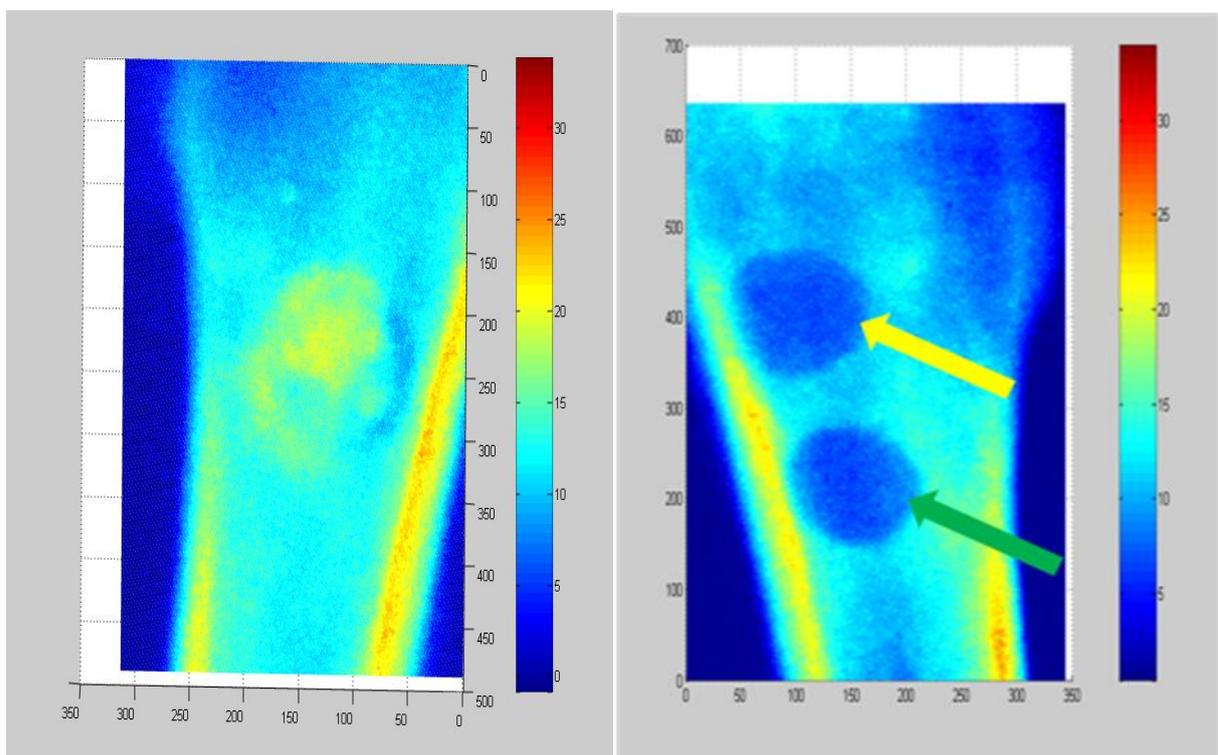


Figura 41. Obtenção das imagens tridimensionais e coloridas do grupo experimental G1 das tíbias esquerda com o biomaterial HAP-91 e direita com o biomaterial C.O.R. granulado (seta verde) e Grupo Controle (seta amarela).

## 7. Discussão

Busca-se, na escolha de um biomaterial, que este fundamente o seu uso na correção de defeitos ósseos, em que possa gerar e harmonizar um meio propício aos componentes celulares capazes de atuar na osteointegração. O presente estudo detalha essa interação por meio das avaliações histológica e morfométrica, e pelo acompanhamento das imagens tridimensionais e coloridas.

Uma das metas da área cirúrgica na implantação de um biomaterial e pré-requisito para o sucesso clínico de sua implantação, é que o mesmo provenha uma fixação estável e elimine os riscos de complicação, p. ex.: em uma cirurgia reconstrutiva.

Neste estudo, o uso dos dois biomateriais implantados alcançou o sucesso clínico pela demonstração dos resultados com as análises empregadas, obtendo uma resposta muito favorável em relação à osteointegração.

O estudo histológico validou sua aplicação ao ser utilizado na determinação qualitativa de um relativo número de tipos celulares e componentes da matriz extracelular ao redor dos biomateriais implantados. Essa validação mostra-se em concordância também com as definições de Ripamonti e Duneas (1996), quando definem que a capacidade de osteointegração não se limita às propriedades exclusivas da composição química dos biomateriais, mas depende também das características físicas, como tamanho, forma e quantidade de partículas, e presença e tamanho de poros.

Observou-se, por essas avaliações, que os dois biomateriais influenciaram positivamente a neoformação óssea dos defeitos criados experimentalmente.

O desempenho dos dois biomateriais foi marcado, desde o primeiro período experimental, pela angiogênese e pela formação de um tecido ósseo imaturo, os quais forneceram um substrato para o crescimento, a diferenciação e a deposição da matriz óssea extracelular pelas células osteoprogenitoras.

Pérez-Sánchez et al. (2010) definiram os três principais componentes de um projeto, na engenharia de tecidos: as células para a osteogênese; a matriz extracelular para a osteocondução, e um sistema de sinalização para a osteoindução, os quais podem ser usados individualmente ou em combinação.

Em todos os períodos experimentais avaliados, foi observado maior número de fibroblastos, osteoblastos e osteócitos, quando comparados ao grupo controle.

No primeiro período experimental, em G1, observaram-se, no Grupo Controle e nos biomateriais implantados, macrófagos e linfócitos como sendo células normais, fazendo referência a um processo inflamatório comum. Ramalho et al. (2004) referenciaram a presença de macrófagos e linfócitos como sendo úteis no processo de degradação do material implantado, liberando substâncias capazes de atrair as células mesenquimais ao local do defeito ósseo.

O C.O.R. granulado mostrou-se, neste estudo, um adequado biomaterial no preenchimento do defeito ósseo criado experimentalmente. A substituição dos seus grânulos por um novo tecido ósseo deu-se pelos mesmos estarem entremeados por componentes osteogênicos e pela contínua e gradativa neoformação óssea apresentada nos quatro grupos experimentais. Estes resultados confirmam os achados de Ramalho et al. (2004).

No primeiro grupo experimental, G1, período correspondente aos sete dias decorridos da implantação do material C.O.R. granulado, pôde-se observar que o material estava envolto por uma grande quantidade de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea e o mesmo ocorrera no grupo controle; esse tecido conjuntivo teve, como função principal, constituir uma estrutura de suporte para os vasos sanguíneos, desempenhando um importante papel na nutrição e na defesa das células em geral.

Nesse mesmo período experimental, os resultados são compartilhados com os achados de Calixto et al. (2001), em que se pôde observar o material granulado de polímero de mamona AUG-EX envolto por tecido de granulação e a presença de trabéculas ósseas imaturas nas extremidades de suas superfícies.

O mesmo ocorreu no segundo período experimental, aos 15 dias, quando se notou a presença de uma quantidade maior de tecido ósseo neoformado entre e ao redor dos granulados. Verificou-se, também, que o índice do reparo tecidual ósseo deu-se pela ativação dos osteoblastos, originando os fibroblastos na síntese da matriz óssea e formando um trabeculado ósseo imaturo (osteóide), que foi gradativamente mineralizado pela deposição de cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita. Com os resultados histológicos e morfométricos, Calixto et al. (2001) mostraram também que o material, na apresentação floculado, é biocompatível e com capacidade de certo grau de osteointegração.

No período experimental seguinte, aos 15 dias (G2), o biomaterial C.O.R. granulado estava munido de um grande aporte de células fibroblásticas, sendo estas as células mais abundantes nos tecidos conjuntivos. Essas células são também responsáveis pela manutenção da estrutura desse tecido, produzindo todos os tipos de fibras proteicas, glicoproteínas, que são componentes da matriz extracelular.

As células fibroblásticas, por contribuírem efetivamente para o processo de cicatrização tecidual óssea, fazem com que a lesão esteja envolta por uma rede de fibroblastos e por pequenos vasos sanguíneos.

Fazendo também parte do fundamento de células osteoprogenitoras desse tecido, no grupo experimental G2, o biomaterial C.O.R. granulado e o grupo controle achavam-se circunscritos por células osteoblásticas e inúmeros osteócitos, presentes em todas as fases do processo de osteointegração, sendo que essas células foram direcionadas para a formação de um novo tecido ósseo. Tais células, osteoprogenitoras, também ocorreram nos períodos experimentais aos 15 e 30 dias no estudo de Ramalho et al. (2004), em que o material polimérico, na apresentação de um bloco pré-polimerizado, estava envolto por fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos; os autores relataram que a osteointegração do material ocorreu pela deposição inicial de uma matriz osteoide não mineralizada para um tecido ósseo lamelar.

No grupo experimental G2, aos 15 dias de experimento, os resultados obtidos com o uso do C.O.R. granulado apontavam uma grande quantidade de osteócitos, além de sobressair uma intensa atividade fibroblástica, cuja função envolvia o papel de síntese das fibras colágenas na manutenção da estrutura do tecido conjuntivo. Esses dados divergem dos resultados obtidos por Nacer (2009), no uso de uma biomassa de poliuretana de mamona na forma de bloco pré-fabricado, em que se apresentava pequena atividade fibroblástica e a formação de uma matriz óssea imatura, em razão da ausência de osteócitos.

No grupo experimental G3, com o biomaterial C.O.R. granulado, houve a presença de tecido conjuntivo fibroso entremeando o implante, o mesmo achado por Nacer (2009) aos 15 dias de experimento, que relata ser esta uma característica natural dessa fase de regeneração. Essas características coincidem com os achados histológicos, nesse mesmo período de observação, no estudo de Ramalho et al. (2004). Eles puderam observar a presença desse tecido ao redor do implante de polímero de mamona, o qual promovia a continuidade de um tecido ósseo

neoformado, constituído de fibras colágenas, fibroblastos, capilares sanguíneos e alguns macrófagos, não os associando, contudo, com células inflamatórias.

No grupo experimental G4, o biomaterial C.O.R. granulado apresentava-se munido de células osteoprogenitoras, com intensa atividade fibroblástica e formação de um tecido ósseo mais organizado. Esses resultados vêm ao encontro dos achados de Nacer (2009) nesse mesmo período, em que se apresentava uma maior quantidade de aposição óssea nas margens e no interior do defeito, e a presença de osteócitos aprisionados na matriz óssea, indicando a maturação do tecido ósseo neoformado. O autor não observou atividade fibroblástica próxima à área do material implantado ou mesmo na região de aposição óssea.

A apresentação granulada do Composto Ósseo de Ricinus favoreceu a neoformação óssea, sendo os grânulos entremeados por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea e um grande aporte de fibras colágenas. Este relato vai ao encontro dos resultados obtidos nos estudos de Borges et al. (2007).

Aos 35 dias, no grupo experimental G4, a região com o biomaterial implantado C.O.R. granulado encontrava-se mais enriquecida de células osteoprogenitoras e fibras colágenas, além de intensas atividades fibroblásticas e osteoblásticas, inerentes à presença de um novo tecido ósseo.

Conjugar os resultados obtidos do estudo histológico com o procedimento morfométrico possibilitará elaborar parâmetros mensuráveis da interação de cada biomaterial implantado com o tecido ósseo, atribuindo esses valores ao fator de osteointegração. Albertin (2004) também definiu, pelos seus estudos, que os resultados morfométricos expressam a quantidade de tecido ósseo e as taxas de formação e reabsorção óssea. Marzouk et al. (2007) e Eski et al. (2007) relatam a importância desse tipo de análise quantitativa nos estudos que objetivam avaliar e subsidiar a efetividade de uma nova modalidade terapêutica, no acompanhamento da neoformação óssea.

Egan, Brennan e Pignolo (2012) constataram, ainda, em seus estudos, que as vantagens das análises morfométricas residem na possibilidade de estas serem feitas com o uso do *software* de reconhecimento de imagens assistidas e no desenvolvimento de uma abordagem mais acurada para se avaliar a microestrutura óssea.

O comportamento do biomaterial implantado C.O.R. granulado, na avaliação da osteointegração pelo estudo morfométrico, foi expresso pelas medidas de

comprimento em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) entre as extremidades corticais ósseas, representando valores em médias, desvios-padrão e medianas. Esses dados foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis, sendo o mesmo teste empregado no estudo de Nacer (2009), em que se quantificou a presença de neoformação óssea e de células osteoprogenitoras.

Com o objetivo de facilitar a compreensão dos resultados obtidos durante esta análise estatística, este estudo fez a comparação dos biomateriais com o Grupo Controle e comparou a progressão de cada biomaterial e do Grupo Controle com os seus respectivos períodos experimentais.

A partir dos resultados das medianas (Md) obtidos com o biomaterial C.O.R. granulado, nota-se que, entre os períodos experimentais G1 e G2, as Md diferem estatisticamente entre si, não sendo essa diferença significativa estatisticamente nos grupos G3 e G4. Nos quatro grupos experimentais estudados, os valores das Md, comprimentos em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), mostraram uma diminuição progressiva, denotando o índice de osteointegração pela aproximação das corticais ósseas. Os índices morfométricos comparativos entre o Grupo Controle e o biomaterial C.O.R. granulado diferiram significativamente.

A avaliação densitométrica qualitativa apresentada neste trabalho foi o recurso utilizado para que se pudesse ter uma informação visual de uma imagem tridimensional e colorida no referencial qualitativo dos níveis de densidade mineral óssea, e obter uma resposta detalhada da interação dos biomateriais implantados com o leito receptor. Rahal et al. (2002) relataram e constataram que o estudo densitométrico qualitativo fornecido por um sistema computadorizado daria uma maior precisão na leitura da densidade óptica das imagens radiográficas, analisando a cunha de alumínio automaticamente, linha por linha, e criando, dessa maneira, um banco de dados relativos à densidade óptica (níveis de cinza) *versus* espessura da cunha de alumínio.

As imagens provenientes desta avaliação aparecem em relevo, denotando a transformação dos valores em pixel para valores expressos em equivalentes de alumínio e em cores.

Com o recurso do *software* MATLAB<sup>®</sup>, as imagens podem ser vistas por vários ângulos. Nessas imagens tridimensionais e coloridas, são mostrados os eixos X e Y, que correspondem aos pontos das imagens originalmente digitalizadas, e os

eixos Z, que correspondem aos valores da densidade expressos em milímetros de alumínio.

Essas imagens tridimensionais e coloridas podem ser utilizadas para evidenciar e avaliar o processo de osteointegração. Essa definição vai ao encontro dos preceitos de Monti (2005) acerca das imagens radiográficas digitalizadas, as quais possibilitam, pela orientação espacial, a busca de uma nova imagem diagnóstica.

Na avaliação densitométrica qualitativa, a aplicação dessa técnica pôde demonstrar, no primeiro período experimental, aos sete dias, com o biomaterial implantado C.O.R. granulado e o Grupo Controle (coágulo), os defeitos ósseos pela tonalidade da cor azul, representados entre os números 5 e 10 da barra colorida usada como referencial reproduzido a partir da espessura da cunha de alumínio (Figura 9).

Ao monitorar o biomaterial C.O.R. granulado e o Grupo Controle (coágulo) no grupo experimental G3, aos 21 dias, notaram-se diferenças visuais de um preenchimento de coloração de um azul escuro para uma coloração esverdeada mais clara, apresentando variação entre 10 e 15 na barra colorida (Figura 10). A partir desses dados, é possível interpretar que houve um aumento do fator de osteointegração.

Leonel et al. (2004) acordam que os biomateriais, tanto a hidroxiapatita como certos polímeros, promovem a neoformação óssea através do processo de osteocondução, apresentando a capacidade de conduzir ou direcionar a neoformação óssea sobre e entre a estrutura do material implantado.

Os resultados obtidos por meio da avaliação histológica com o biomaterial HAP-91 no grupo experimental G1, aos sete dias, mostraram sua estrutura física envolta por uma grande quantidade de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea, estando entremeado por tecido ósseo neoformado e tecido medular. A angiogênese, conjuntamente com as células osteoprogenitoras, faziam-se presentes para a formação de um novo tecido ósseo mais organizado. Esses achados contradizem os resultados obtidos por Duarte et al. (2006), os quais relataram que o material hidroxiapatita inibe inicialmente a formação de uma matriz óssea, quando implantada em processo alveolar da mandíbula de cães.

O mesmo resultado não ocorreu no estudo de Borges et al. (2006) sobre a osteointegração da HAP-91+lipossoma do tipo DRV em defeito ósseo provocado no processo alveolar mandibular em cães, não havendo a formação de matriz óssea.

Em G2, o sentido da neoformação óssea nesse período era centrípeto, estando o biomaterial HAP-91 circundado por uma grande quantidade de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea, e mantendo-se essa estrutura para que os componentes celulares osteoprogenitores elaborassem um tecido ósseo mais organizado. Nesse período experimental, 15 dias, resíduos do biomaterial encontravam-se na presença de feixes de fibras colágenas e envoltos por uma rede de células fibroblásticas e osteoblásticas, e uma grande quantidade de osteócitos, células estas direcionadas para a formação de um tecido ósseo maduro. Nos períodos experimentais seguintes, aos 15 e 21 dias, Borges et al. (2006) observaram que as partículas de hidroxiapatita estavam rodeadas por um trabeculado ósseo neoformado e grande quantidade de osteoblastos, concluindo que o material revelara-se osteocondutor e biocompatível.

Aos 15 dias do período experimental no estudo de Duarte et al. (2006), o defeito ósseo com o material hidroxiapatita sintética, no início do experimento, aos oito dias, constituía-se de um material amorfo, acelular, passara então a ser rodeado por um tecido ósseo neoformado, permitindo o início da osteointegração. Foram encontradas em outras amostras do material implantado, nesse mesmo período experimental, partículas de hidroxiapatita rodeadas apenas por tecido fibrovascular, caracterizado como precursor da formação de um novo tecido ósseo. Ao comparar o grupo tratado com o Grupo Controle, Duarte et al. (2006) puderam perceber que, a partir do 15.º dia do período experimental, houve a formação de tecido ósseo imaturo com intensa atividade osteoblástica e angiogênese, com a presença do material hidroxiapatita.

No grupo experimental G3, foi observada a presença de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea no interior do material HAP-91 e um grande aporte de células osteoprogenitoras, denotando um tecido ósseo mais organizado.

No período experimental de 35 dias, grupo G4, as extremidades corticais ósseas se uniram pela continuidade de um tecido ósseo maduro e encontravam-se resíduos do biomaterial circundados por um trabeculado ósseo bem desenvolvido.

Na avaliação morfométrica com o biomaterial HAP-91, os resultados das medianas (Md) apresentados nos grupos experimentais G1 e G2 não se diferiram

estatisticamente entre si, havendo o início de uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais G2 e G3. No grupo G4, período experimental de 35 dias, não houve apresentação de resultados em virtude da união das corticais ósseas. Os índices morfométricos comparativos entre o Grupo Controle (coágulo) com o biomaterial HAP-91 nos quatro grupos experimentais estudados apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Estatisticamente, o Grupo Controle (coágulo) mostrou valores de medianas do comprimento em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) diferindo entre si nos quatro grupos experimentais estudados.

Na avaliação densitométrica qualitativa com o biomaterial HAP-91, a Figura 11 ilustra que, para o primeiro período experimental, aos sete dias, o biomaterial apresentou, no defeito ósseo, tonalidades de cores, mesclando do esverdeado ao amarelo, valores numéricos referenciados da barra colorida entre 15 e 22. Essa alternância de cores dá-se pela composição física do biomaterial à absorção da radiação.

A visualização, por outro ângulo, da imagem tridimensional e colorida no grupo experimental G3 com o biomaterial HAP-91 (Figura 12) mostra a alternância de cores entre o amarelo e o vermelho, situando os valores numéricos entre 15 e 32. Nota-se, em minúcia, no centro do defeito, a cor esverdeada, realçando a semelhança de tonalidade com a cortical óssea.

Este estudo mostrou que, para se avaliarem dois biomateriais com apresentações comerciais e propriedades químicas e físicas diferentes pela técnica densitométrica, se faz necessário um acervo imagiológico de cada biomaterial implantado. Com tal aparato, detalhar-se-ão as suas interações com o tecido biológico estudado no processo de osteointegração.

No entanto, o programa de Densidade Óptica Radiográfica (ODR) permitiu uma análise com maior alcance, na medida em que possibilitou realçar a apresentação dos valores qualitativos dos níveis de densidade mineral óssea em cores de cada biomaterial implantado e do Grupo Controle.

## **8. Conclusão**

Nesse experimento, os dois biomateriais implantados no tecido ósseo e monitorados pelos estudos histológico, morfométrico e densitométrico referenciaram-se como biologicamente ativos e biocompatíveis, mostrando ser efetivamente promissores como substitutos ósseos quando aplicados na área cirúrgica reconstrutiva.

## Referências

- ALBERTIN, L.M. Efeito do ultra-som sobre o reparo de falha óssea experimental; avaliação quantitativa e morfológica do parâmetro tempo de estimulação. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2004.
- ALVES, J. D. S.; STERMAN, F. A. Determinação da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio de cães da raça Rottweiler, por meio da densitometria óptica radiográfica. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n. 2, p. 229-237, 2010.
- AZEVEDO, E.C.; CLARO NETO, S.; CHIERICE, G.O.; LEPIENSKI, C.M. Aplicação de indentação instrumentada na caracterização mecânica de poliuretano derivada de óleo de mamona. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 4, p. 336-343, 2009.
- BASTOS MF et al. Trabecular bone area and bone healing in spontaneously hypertensive rats. A histometric study. **Brazilian Oral Research**, v.24, n. 2, p. 170-176, 2010.
- BICALHO, S.M.C.M.; BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.F. In: \_\_\_\_\_. **HAP-91<sup>®</sup> e COL.HAP-91<sup>®</sup>. Casuísticas e estudos científicos**. 3. ed. Sabará: Propartner Gráfica e Editora Ltda, 2008. p. 11.
- BORGES, A.P.B. et al. (2006). Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos histológicos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.849-853, 2006.
- BORGES, A.P.B. et al. (2007). Avaliação histológica do polímero derivado do óleo de mamona (*Ricinus communis*) aplicado na diáfise proximal da tíbia de cães. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 63-66, 2007.
- CALIXTO, R. F. E. et al. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. **Pesquisa Odontologia Brasileira**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 257-62, 2001.
- CAMPOS, L. E. C. **Análise físico-química e biológica de duas superfícies de implantes osteointegráveis e uso odontológico**. 2007. 138f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Veiga de Almeida, Rio de Janeiro, 2007.
- CAMPISTA, C. C. **Avaliação histométrica do reparo em defeitos de tamanho crítico criados em calvária de ratos, realizados com broca trefina ou instrumento piezoelétrico, preenchidos com osso bovino (Geistlich Bio-Oss<sup>®</sup>)**. 2012. 49 f. Dissertação (Mestrado). Unifeb – Centro universitário da fundação educacional de Barretos.
- CLARO NETO, S. **Caracterização físico-química de um poliuretano derivado de óleo de mamona utilizado para implantes ósseos**. 1997. 127 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

CARLO et al. Composite for the fabrication of resorbable implants for osteosynthesis: biocompatibility evaluation in rabbits. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, 2009.

CARVALHO, A. C. B. et al. Histomorfometria do tecido ósseo em ratas castradas tratadas com tibolona • **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 235-243, 2010.

DUARTE, T.S. et al. Osseointegration of synthetic hydroxyapatite in alveolar process of mandible in dogs: histological aspects. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n. 5, p. 849-853, 2006.

EGAN, K.P.; BRENNAN, T.A.; PIGNOLO, R. Bone histomorphometry using free and commonly available software. **Histopathology**, University of Pennsylvania, Philadelphia, v. 61, n. 6, p. 1168-1173, 2012.

ESKI, M. et al. Assessment of distraction regenerate using quantitative bone scintigraphy. *Ann Plast Surg*, Boston, v.58,n.3, p.328-34, Mar. 2007.

GASPERINI, F.M. **Avaliação da biocompatibilidade de nanohidroxiapatitas no reparo ósseo de tíbias de coelhos**. 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2010.

GRANDI, G. **Análise histomorfométrica comparativa entre o cimento de  $\alpha$ -TCP e os grânulos de  $\beta$ -TCP/HA no reparo ósseo de calotas cranianas de ratos**. 2007. 75f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GRASSI, S. **Influência de diferentes microestruturas de implantes osseointegráveis sobre o tecido ósseo peri-implantar. Avaliação histomorfométrica em humanos**. 2006. 58p. Dissertação (Mestrado)- Universidade de Guarulhos, Guarulhos, 2006.

GUIMARÃES, K. B. et al. Histomorphometric evaluation of calcium phosphate bone grafts on bone repair. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 4, p.447-454, 2011.

JIN LEE et al. Effect of Hydroxyapatite on Bone Integration in a Rabbit Tibial Defect Model. **Clinics in Orthopedic Surgery**, v. 2, n. 2, p. 90-97, 2010.

LAUREANO FILHO et al. Histological comparison of demineralized bone matrix and the Ricinus communis polymer on bone regeneration. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 2, 2007.

LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 395, p.81-98, 2002.

LEONEL, E.C.F. et al. Ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 4, p. 342-350, 2004.

LOPES, J. C., CANHÃO, H., FONSECA, J.E. Osteoblasts and bone formation. **Acta Reumatologia Portuguesa**, v.32, p. 103-110, 2007.

LOUZADA, M.J.Q. Otimização da técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas de peças ósseas. Estudo "in vitro". 1994. 191 f. Tese (Doutorado) – DEB/FEE, UNICAMP, Campinas, 1994.

LOUZADA, M.J.Q.; PELÁ, C.A.; BELANGERO, W.D.; SANTOS PINTO, R. Avaliações de densidade óssea em imagens radiográficas: estudo em peças ósseas de cães. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, Rio de Janeiro, v.14, n.1, p.47-64, 1998.

LOUZADA, M.J.Q.; NOGUEIRA, G.P.; GARCIA JÚNIOR, I.R.; CARVALHO, C.A.; DE PAULA, G.A. Densitometria óptica radiográfica em análise de densidade óssea de mandíbulas de coelhos castrados. *Revista da Faculdade de Odontologia de Lins – UNIMEP*, v.13, n.1, p. 33-38, 2001.

MAIORANA et al. Histomorphometric Evaluation of Anorganic Bovine Bone Coverage to Reduce Autogenous Grafts Resorption: Preliminary Results. **The Open Dentistry Journal**, v. 5, p. 71-78, 2011.

MARTINEZ, M.; PACHECO, A.; VARGAS, M. Evaluación histológica de biocompatibilidad y bioconducción del compuesto hidroxiapatita –lignina implantado en tibia de conejos. **Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Cordoba**, v. 14, n.1, p. 1624-1632, 2009.

MATEUS, C. P.; SANTOS, A. L.; SILVA, R. C.; CHIERICE, G. O. Análises termoanalíticas do composto ósseo de Ricinus granulado e hidroxiapatita sintética. In: ENCONTRO REGIONAL DOS USUÁRIOS DE TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS, 4, 2009, São Carlos. **Encontro...** São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, 2009.

MATEUS, C. P. **Avaliação do Composto de Ricinus Granulado e Hidroxiapatita Sintética na Osteointegração em Coelhos. Estudo Histológico**. 2010. 63f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

MATOS, A.; ARAÚJO, F.P.; PAIXÃO, F. B. Histomorphometric evaluation of bone healing in rabbit fibular osteotomy model without fixation. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 3, n.4, 2008.

MARAQUEZAN, M. et al. Is miniscrew primary stability influenced by bone density. **Brazilian Oral Research**, v.25, n. 5, p. 427-432, 2011.

MARZOUK, K.M. et al. Osteoconductive effects of vinyl styrene microbeads in rat calvarial defects. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 65, n. 8, p.1508-16, 2007.

MONTI, L.M. **Estudo radiográfico digital e densitométrico em mandíbulas de suínos, submetidas à osteotomia com brocas de alta e baixa rotação, com refrigeração líquida**. 2005. 63 f. Dissertação (Mestrado) – UNESP, Araçatuba, 2005.

MORAES, P.C. **Biocompatibilidade e comportamento do cimento de fosfato de cálcio, reforçado com diferentes tipos de fibras, implantado no rádio de coelhos**. 2002. 73f. (Mestrado)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

NACER, R. S. **Estudo do comportamento do polímero de mamona como material de substituição óssea em defeito diafisário no fêmur de ratos frente a alterações secundárias à associação com nanopartículas de sílica e zircônia**. 2009. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2009.

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

NOVAES JR., A.B.; SOUZA, S.L.S.; BARROS, R.R.M.; PEREIRA, K.K.Y.; IEZZI, G.; PIATTELLI, A. Influence of Implant Surfaces on Osseointegration. **Brazilian Dental Journal**, v. 21, n. 6, p. 471-481, 2010.

PELISSONI, L.G.R. et al. Influência do cetoprofeno na consolidação óssea de ulnas osteotomizadas de coelhos. Estudo qualitativo e quantitativo através de programas computacionais. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Araçatuba, v.18, n. 5, p. 452-457, 2003.

PÉREZ-SÁNCHEZ, M.J. et al Biomaterials for bone regeneration. **Journal of Biomaterials and Bioengineering in Dentistry**, v. 15, n. 3, p. 517-522, 2010.

RAHAL, S.C. et al. Densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 3, p. 421-425, 2002.

RAMALHO et al. A ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 4, 2004.

RAMALHO et al. Ricinus communis biocompatibility histological study in the nose of Cebus apella monkeys. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 75, n. 3, 2009.

RIBEIRO, C.A.M. **Estudo densitométrico em tíbias de ratas: avaliação da atividade física aeróbica e suplementação vitamínica na obtenção do pico de massa óssea**. 2004. 81 p. Dissertação (Mestrado). Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2004.

RIPAMONTI, U.; DUNEAS, N. Tissue engineering of bone by osteoinductive biomaterials. **Materials Research Society Bulletin.**, v.21, p. 36- 39, 1996.

ROKN et al. Bone Formation with Two Types of Grafting Materials: A Histologic and Histomorphometric Study. **The Open Dentistry Journal**, v. 5, p. 96-104, 2011.

SARAN, W.R. **Estudos de fenômenos de osteogênese em implantes de polímero vegetal**. 2011. 57 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

SAS Institute Inc. **The SAS System**, release 9.3. SAS Institute Inc., Cary:NC, 2013.

VASCONCELLOS, L. M. R. et al. Evaluation of bone ingrowth into porous titanium implant: histomorphometric analysis in rabbits. **Brazilian Oral Research**, v. 24, n. 4, p. 399-405, 2010.

VICENTINI, C. R. **Análise densitométrica, histomorfométrica e biomecânica em fêmures de ratos submetidos à ausência de carga e atividade física em esteira.** 2006. 82f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba e Curso de Medicina Veterinária, UNESP, Araçatuba, 2006.

VILELA, R. G. et al. Histomorphometric analysis of inflammatory response and necrosis in re-implanted central incisor of rats treated with low-level laser therapy. **Lasers in Medical Science**, v 27, n. 3, p. 551-557, 2012.

VITAL et al. Hidroxiapatita associada à lignina no preenchimento de falha óssea experimental na tíbia de coelhos. **Revista Ceres**, v. 55, n. 1, p. 09-14, 2008.

WAJNSZTEJN, H. **Minerais orgânicos na prevenção de hiperparatireoidismo nutricional secundário em eqüino.** 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.

## FONTES DE AQUISIÇÃO

- a. Natural Coelhos - Purina<sup>®</sup> - AGRO VEIGA - Araçatuba, SP.
- b. Sulfato de morfina<sup>1mg/ml</sup> - DOLO MOFF - Ativa Comercial Hospitalar Ltda. Ribeirão Preto, SP. Brasil.
- c. Cloridrato de tramadol<sup>50mg/ml</sup> - TEUTO - Ativa Comercial Hospitalar Ltda. Ribeirão Preto, SP.
- d. Baytril 5%<sup>®</sup> - BAYER do Brasil.
- e. Riohex 4% - Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda. São José do Rio Preto, SP.
- f. Cloridrato de xilazina - Virbaxyl – VIRBAC do Brasil.
- g. Zoletil 50<sup>®</sup> - VIRBAC do Brasil. São Paulo, Brasil.
- h. Solução isotônica Cloreto de sódio a 0,9% - Glicolabor Indústria Farmacêutica Ltda. Ribeirão Preto, SP.
- i. Catugut 3-0 - SHALON - Cremer S.A. São Paulo, Brasil.
- j. Nylon 3-0 - BRASUTURE - Cremer S.A. São Paulo, Brasil.
- k. Isoflurano - Isoforine<sup>100 ml</sup> - Cristália - Ativa Comércio Hospitalar Ltda. Ribeirão Preto, SP.
- l. Tiopental sódico – Thiopentax<sup>0,5 g</sup> - Ativa Comércio Hospitalar Ltda. Ribeirão Preto, SP.

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 173/2010, sobre o projeto intitulado “*Avaliação do composto ósseo de Ricinus granulado (C.O.R.) e hidroxiapatita sintética na osteointegração em coelhos. Estudo histológico, histomorfométrico e densitométrico*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Gilberto Orivaldo Chierice** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 20 de dezembro de 2010.

(We certify that the protocol nº 173/2010, about “*The Evaluation of the compound of granulated Ricinus (C.O.R.) and synthetic hydroxyapatite on the osseointegration in rabbits. Histological, histomorphometric and densitometric studies*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 12/20/2010.

Ribeirão Preto, 20 de dezembro de 2010.

*Márcio Dantas*

**Prof. Dr. Márcio Dantas**  
Presidente da Comissão de Ética em  
Experimentação Animal

## APÊNDICE A – Protocolo Histológico

As peças cirúrgicas foram descalcificadas em solução Anna Morse, sendo trocada a cada 48 horas, durante 30 dias.

Após o período de descalcificação, as peças ósseas foram lavadas em água corrente por 24 h e depois imersas em uma solução de sulfato de sódio a 5% por 48 h, para se neutralizar o excesso de ácido.

Decorrido esse período, as peças ósseas foram imersas nas seguintes soluções: álcool 70% por 12 h; álcool 90% por 1 h; álcool absoluto por 24 h (realizando-se trocas a cada 8 h), lavagem rápida com álcool-xilol (1:1), seguida de imersão em xilol por 3 h (realizando-se troca a cada 1 h), para a retirada de todo o álcool, possibilitando o preenchimento das lacunas desidratadas com a inclusão da parafina.

As peças foram seccionadas em cortes seriados de 6 µm de espessura, no sentido transversal em micrótomo rotativo, e montadas em lâminas de vidro e coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H.E.).

## APÊNDICE B – Metodologia densitométrica

Nas radiografias, foi incluída uma cunha de alumínio (liga 6063, ABNT), utilizada como referencial densitométrico pelo programa computacional ODR<sup>2</sup> (Densidade Óptica Radiográfica), para se determinar a densidade óssea radiográfica qualitativa em milímetros de alumínio (mmAl) das peças cirúrgicas. O programa computacional qualitativo “ODR” está inscrito no programa de análises numéricas MATLAB<sup>®</sup> (Figura 5).

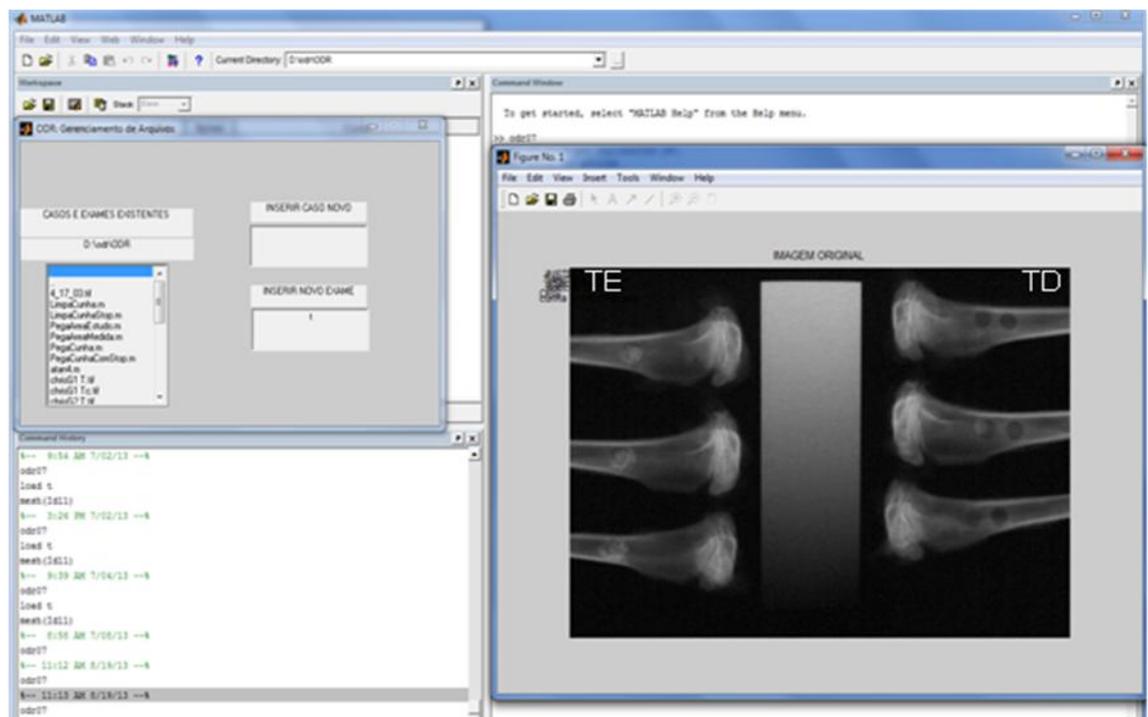


Figura 5. Programa Matlab<sup>®</sup> e a sua ferramenta Gerenciador de arquivo para a obtenção da imagem original com as tíbias esquerdas (TE) e direitas (TD) do Grupo experimental G1 com a cunha de alumínio.

Esse programa processou as imagens digitalizadas das radiografias e, com o uso de suas ferramentas, forneceu novas imagens tridimensionais e coloridas. .

A metodologia utilizada para a aquisição das imagens tridimensionais e coloridas foi a seguinte:

- Contorno da cunha de alumínio em 5 pontos (Figura 6); e

<sup>2</sup> Programa desenvolvido pelo Laboratório de Biofísica da FOA – UNESP.

- Contorno em cinco pontos nas tíbias esquerda e direita, com as áreas a serem avaliadas (Figuras 7); e
- Após a seleção dos pontos das áreas das imagens originais a serem avaliadas, obtêm-se as imagens das áreas de estudo referentes às tíbias esquerda e direita (Figura 8); e
- Com as áreas de estudo a serem avaliadas, é utilizado no programa MATLAB® o recurso *Load (t)*; e
- Após a utilização desse recurso, a ferramenta *mesh (Id11)* ilustra a imagem tridimensional e colorida (Figura 9); e
- Com o recurso desse programa, as imagens tridimensionais e coloridas podem ser visualizadas em vários ângulos (Figura 10).

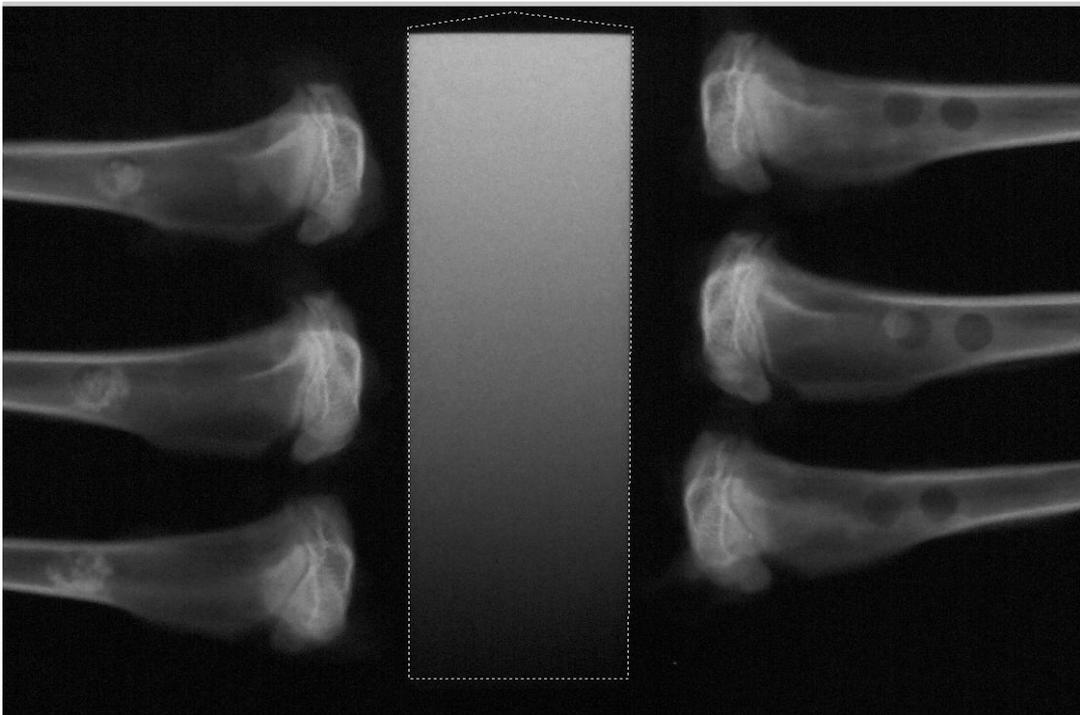


Figura 6. Contorno da cunha de alumínio em 5 pontos

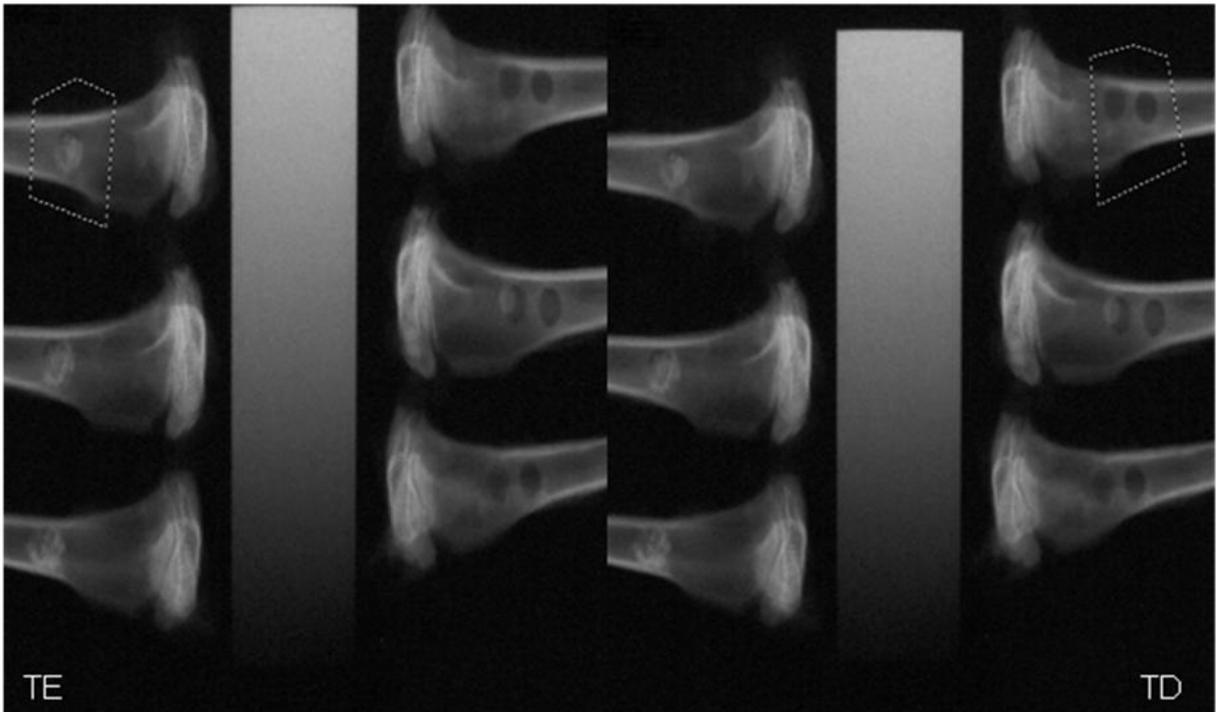


Figura 7. Contornos em 5 pontos das tíbias esquerda (TE) e direita (TD) para a avaliação das áreas das imagens originais com os biomateriais implantados e grupo controle

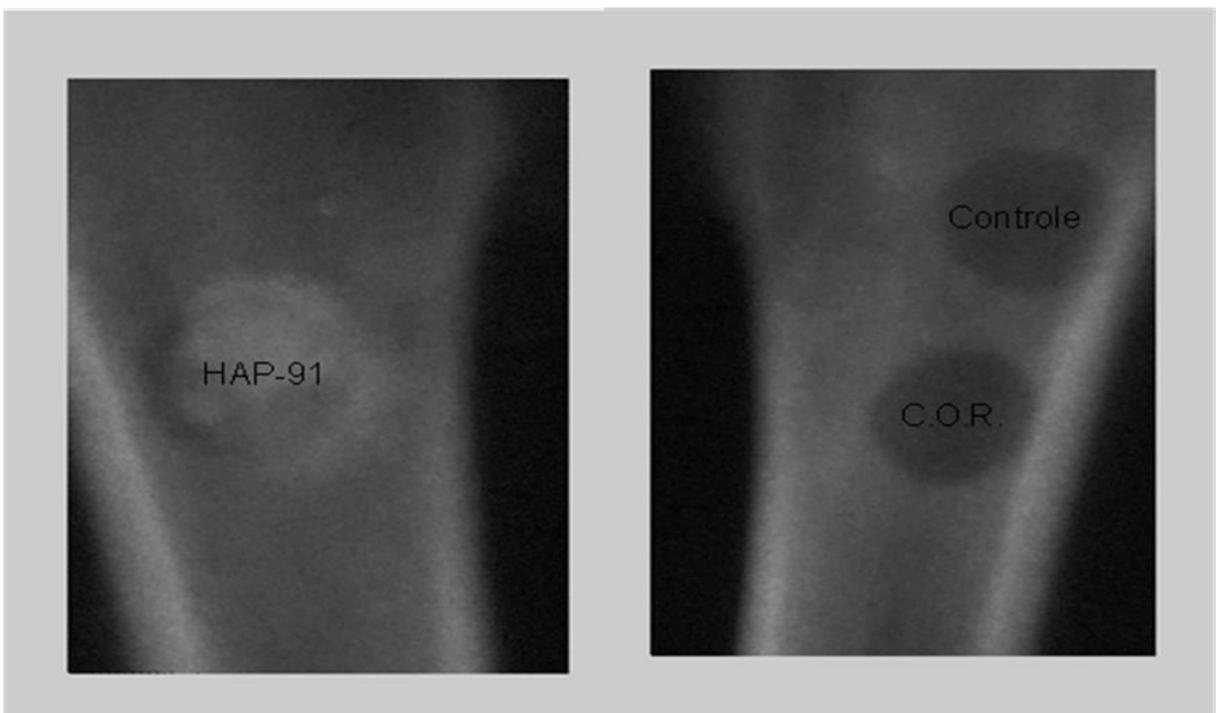


Figura 8. Imagens das áreas de estudo das tíbias esquerda e direita com seus respectivos biomateriais implantados e o grupo controle

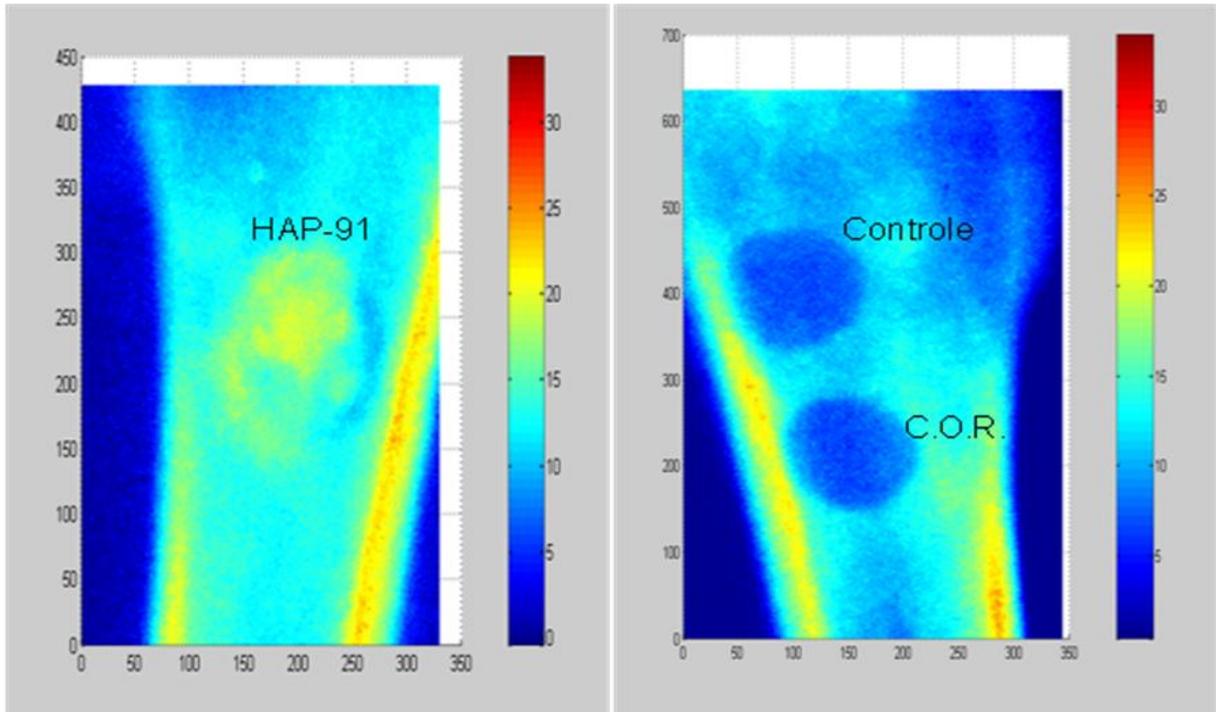


Figura 9. Obtenção das imagens tridimensionais e coloridas das tíbias esquerda e direita com seus respectivos biomateriais implantados e o grupo controle

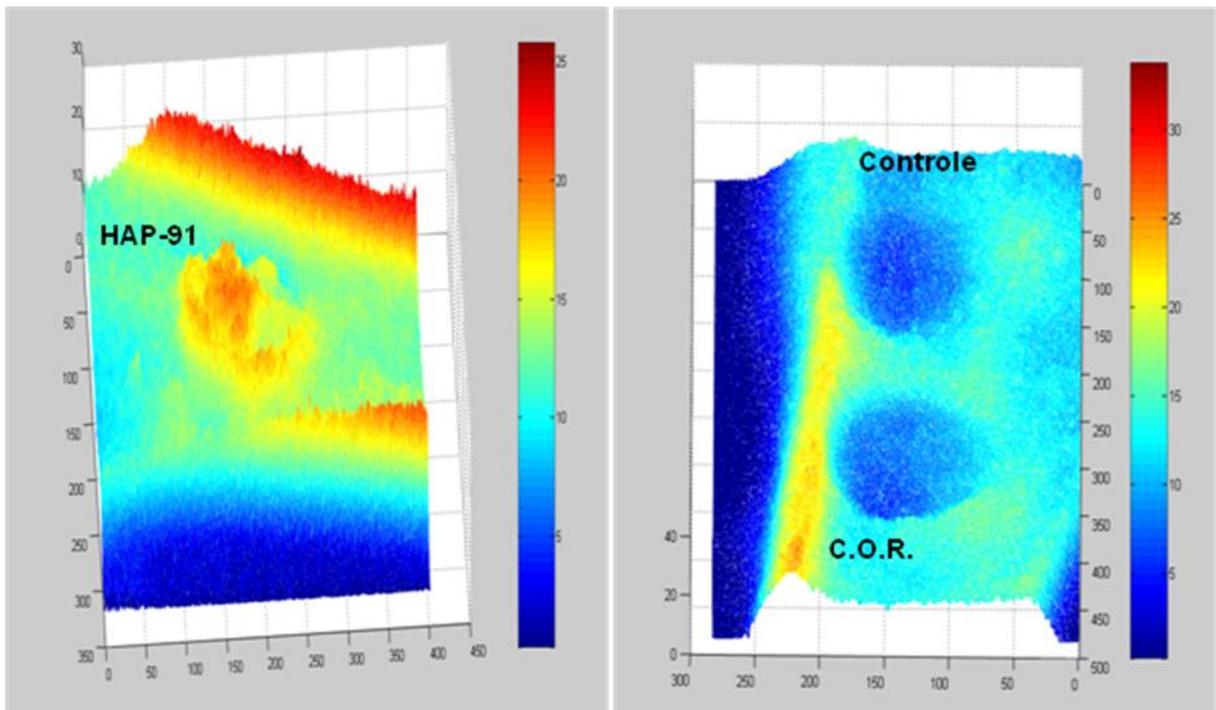


Figura 10. Visualização em outro ângulo das imagens tridimensionais e coloridas das tíbias esquerda e direita pelo recurso do software ODR