

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

WELLINGTON HENRIQUE BESSI

Análise das interfaces entre compósitos constituídos de matrizes ósseas mineralizadas heterólogas trabeculares canina (MOMHTc) e de bovina (MOMHTb) associadas à quitosana e as falhas ósseas de tíbias de coelhos

Pirassununga

2022

WELLINGTON HENRIQUE BESSI

Análise das interfaces entre compósitos constituídos de matrizes ósseas mineralizadas heterólogas trabeculares canina (MOMHTc) e de bovina (MOMHTb) associadas à quitosana e as falhas ósseas de tíbias de coelhos

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Área de Concentração: Prevenção, Diagnóstico e Terapias Inovadoras.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Henrique de Freitas

Pirassununga

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B559a Bessi, Wellington Henrique
Análise das interfaces entre compósitos
constituídos de matrizes ósseas mineralizadas
heterólogas trabeculares caninas (MOMHTc) e de
bovina (MOMHTb) / Wellington Henrique Bessi ;
orientador Silvio Henrique Freitas. --
Pirassununga, 2022.

91 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Falha óssea. 2. Substituto ósseo. 3.
Biomateriais. 4. Osseointegração. I. Freitas, Silvio
Henrique, orient. II. Título.

Cuiabá, 10 de julho de 2018



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado " ANÁLISE DAS INTERFACES ENTRE COMPÓSITOS CONSTITUÍDOS DE MATRIZES ÓSSEAS MINERALIZADAS HETERÓLOGAS TRABECULARES CANINA (Momhtc) E DE BOVINA (Momhtb) ASSOCIADAS AO POLIMETILMETACRILATO (Pmma) E/OU QUITOSANA E AS FALHAS ÓSSEAS DE TÍBIAS DE COELHO", registrado com o protocolo nº 028/2018, sob a responsabilidade do Pesquisador Silvio Henrique de Freitas - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto n 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE DE CUIABÁ (CEUA/UNIC), em reunião de 26/06/2018.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2018 a 31/07/2020
Espécie/linhagem/raça	Coelhos (Ordem Lagomorpha, gênero Oryctolagus, espécie Oryctolagus cuniculus, raça Nova Zelândia, variedade branco)
Nº de animais	24
Peso/idade	3 a 4Kg / 4 meses
Sexo	12 fêmeas e 12 machos
Origem	Criadores que produzem animais para experimentação


Profa. Ma. Juliana Normando Pinheiro
Presidente Comitê de Ética de Uso de Animais
Universidade de Cuiabá - UNIC

WELLINGTON HENRIQUE BESSI

Análise das interfaces entre compósitos constituídos de matrizes ósseas mineralizadas heterólogas trabeculares canina (MOMHTc) e de bovina (MOMHTb) associadas à quitosana e as falhas ósseas de tíbias de coelhos

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Data da aprovação ___/___/_____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Silvio Henrique de Freitas

Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo

Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares, pelo incentivo, dedicação e torcida em minha jornada.

Agradeço aos meus amigos, que se tornaram fundamentais na construção sólida de uma rede de ajuda para que os dias fossem melhores.

Agradeço a todos que caminharam comigo e a todos que se fizeram presente.

Agradeço ainda a oportunidade de conseguir alcançar os objetivos que tracei, e que independente das adversidades consegui realizar.

Agradeço a todos os laboratórios parceiros que fizeram parte ou auxiliaram de alguma forma no projeto de pesquisa.

Agradeço ao meu Orientador pela dedicação, esforço e compreensão ao longo de todo o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo investimento junto ao projeto.

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação à minha alma gêmea, minha maior saudade e minha inspiração diária. Sempre fomos sobreviventes, e hoje, mais do que nunca sobrevivo, com um coração partido e uma dor infinita.

Dentre tantos desafios que a vida me impôs, te perder foi o mais inesperado, revoltante e triste. Tenho sido muito forte Nênes, mais do que eu imaginei que conseguiria um dia; forjei escudos, fiz brigas internas constantes, e aprendi amar e me entender como jamais imaginei.

Após a revolta, consegui ser grato ao universo por compartilhar uma vida com você, mesmo que muito breve na minha concepção. Sou grato ao nosso tempo, as nossas conversas intermináveis sobre a faculdade, família, amigos e sobre tudo que poderíamos conversar.

O sofrimento com os anos, eu disse anos... Meu Deus, está amenizando, estamos conseguindo conviver com sua ausência, tenho receio da Mãe não estar bem, pois não tenho conseguido interagir com isso, você sabe que sempre fomos reservados, mas ela é uma mulher forte e batalhadora, cuida dela.

Às vezes me vejo perdido em meus ciclos, me perguntando quem me ajudará a trilhar o melhor caminho. Nênes, devo fazer doutorado? Quem fará o papel racional na minha vida! Você além de ser brilhante, determinado, era invencível e venceu, fez história. Sou muito privilegiado por ter ganhado um irmão e poder viver com alguém tão especial.

Por fim, não fazemos mais amigo secreto no final do ano pois entendemos que devemos presentear quem amamos sem data específica. Nossa família continua muito unida e com um amor que transborda.

Todos nós sentimos muito a sua falta, olha por nós, logo estaremos juntos novamente.

Te amamos Brendon (Nênes, Tato, Be), para todo o sempre.

EPÍGRAFE

“Que o amor prevaleça a qualquer custo”.

(Autor desconhecido).

RESUMO

BESSI, W. H. **Análise das interfaces entre compósitos constituídos de matrizes ósseas mineralizadas heterólogas trabeculares canina (MOMHTc) e de bovina (MOMHTb) associadas à quitosana e as falhas ósseas de tíbias de coelhos.** 2022, 91p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Na medicina veterinária e humana são frequentes afecções ortopédicas que necessitam de intervenção cirúrgica a fim de repor tecido ósseo, seja através de enxerto ósseo, implante natural e/ou sintético. Como método associativo entre os materiais pré-existentes, objetivou-se analisar as interfaces entre os compósitos de MOMHTc e MOMHTb associados à quitosana utilizando-se 12 coelhos adultos da raça Nova Zelândia, que foram submetidos a falhas ósseas tibiais. Os resultados revelaram que os compósitos apresentaram potencial citotóxico. Nas avaliações radiográficas digitais (projeção médio-lateral) todos os compósitos implantados encontravam-se acomodados em seus leitos receptores e com gradativa mudança de densidade em suas interfaces pelo período observado. Macroscopicamente, os compósitos constituídos de MOMHTc/b e quitosana permaneceram em seus leitos receptores, com exceção a um compósito constituído de MOMHTc e quitosana. Análises por meio da MEV/EDS demonstraram que dos 24 compósitos constituídos de MOMHT(c/b) e quitosana implantados nas tíbias de coelhos, 23 foram incorporados em seus respectivos leitos receptores e apenas oito foram osseointegrados, sendo cinco de origem bovina e três de canina. Dos compósitos implantados e analisados, os constituídos de MOMHTb associados a quitosana apresentaram melhor performance, sendo esse biomaterial o mais recomendado como substituto para preencher e reparar falhas ósseas não críticas.

Palavras chave: Falha óssea. Substituto ósseo. Biomateriais. Osseointegração.

ABSTRACT

BESSI, W. H. Analysis of the interfaces between composites constituted of mineralized heterologous canine trabecular bone (MOMHTc) and bovine (MOMHTb) matrices associated with chitosan and as bone defects of rabbit tibiae. 2022, 91p. M. Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

In veterinary and human medicine, orthopedic disorders that require surgical intervention are common in order to replace bone tissue, either through bone graft, natural and/or synthetic implants. As an associative method between pre-existing materials, the objective was to analyze the interfaces between the composites of MOMHTc and MOMHTb associated with chitosan using 12 adult New Zealand rabbits, which were submitted to tibial bone defects. The results revealed that the composites showed cytotoxic potential. In the digital radiographic evaluations (mediolateral projection) all implanted composites were accommodated in their receiving beds and with a gradual change in density at their interfaces for the observed period. Macroscopically, the composites consisting of MOMHTc/b and chitosan remained in their receptor beds, with the exception of a composite consisting of MOMHTc and chitosan. Analysis through SEM/EDS showed that of the 24 composites made up of MOMHT(c/b) and chitosan implanted in the tibiae of rabbits, 23 were incorporated into their respective receptor beds and only eight were osseointegrated, five of bovine origin and three of canine. Of the composites implanted and analyzed, those made of MOMHTb associated with chitosan showed the best performance, and this biomaterial is the most recommended as a substitute for filling and repairing non-critical bone defects.

Keywords: Bone failure. Bone substitute. Biomaterials. Osseointegration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. MOMHT (c/b) acondicionadas em frascos plásticos contendo glicerina (glicerol) a 98% (A e B).....	30
Figura 2. Processamento das MOMHT (c/b). Cabine de segurança biológica contendo materiais utilizados no preparo das MOMHT (c/b) (A), MOMHT (c/b) em frascos plásticos contendo glicerina a 98% (B), hidratação/lavagem das MOMHT (c/b) em solução salina a 0,9% para lavagem das MOMHT (c/b) (F).....	31
Figura 3. Mensuração dos compósitos de MOMHT (c/b) associados à quitosana.	32
Figura 4. Avaliação da superfície dos compósitos de MOMHT (c/b) associada à quitosana. Observe que as trabéculas ósseas apresentam superfícies revestidas com uma camada clara e brilhante (setas vermelhas) após tratamento com a solução de quitosana (Estereomicroscopio Ez4 – Leica) 20X.	32
Figura 5. Compósitos constituídos de MOMHT (c/b) e quitosana processados e colocados em embalagem para posterior esterilização (A). Autoclave demonstrando processo de esterilização dos compósitos para posterior ensaio de citotoxicidade (B).	33
Figura 6. Meio de cultivo celular DEMEM F12 (A). Filtração do meio de cultivo (B). Adição de 10% de soro fetal bovino e 1 % de antibiótico (C).....	34
Figura 7. Aplicação de azul trypan em câmara de Neubauer para contagem celular (A). Câmara de Neubauer ao microscópio para contagem celular (B).....	34
Figura 8. Meio de cultivo celular em banho maria para posterior processamento.	35
Figura 9. Transferência do cultivo celular para as placas de cultura com fundo chato de 96 poços (A e B).....	35
Figura 10. Materiais utilizados para o preparo do extrato.	36
Figura 11. Transferência do meio para o tubo (A), extrato pronto para ser incubado em estufa (B).....	36
Figura 12. Processo de diluição dos extratos (A), seguido de transferência para a placa (B).	37
Figura 13. Diluições dos compósitos de MOMHTb associados a quitosana: B1 -100%; B2- 50%; B3- 25% B4- 12,5% (A). Diluições dos compósitos de MOMHTc associados a quitosana: C1 -100%; C2-50%; C3- 25% C4- 12,5% (B).	38
Figura 14. Análise da viabilidade celular ao microscópio.	39
Figura 15. Leitura das placas em espectrofotômetro FLUOstar OPTIMA.	39

Figura 16. Procedimento cirúrgico realizados nos animais experimentais - realização da incisão cutânea e exposição da cortical óssea seguida de realização da falha óssea com broca trefina (A e B), falha óssea na tíbia (C), implantação do compósito constituído de MOHT (c/b) na falha óssea e aposição correta do biomaterial no leito receptor (D e E) e aposição dos tecidos moles, podendo ser observadas áreas operatórias com panos cirúrgicos e de contato (Tegaderm) (F).	41
Figura 17. Grupo experimental alocado em célula de Rack ventilada no biotério da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) (A), rack ventilada contemplando 6 células (B), animais com alimentação e água ad libitum (C). 43	
Figura 18. Procedimento de avaliação e coleta de material - Coelho posicionado em calha para avaliação e coleta de material (A), avaliação macroscópica da região proximal da tíbia que foi implantada (B), osteotomia do segmento ósseo da tíbia com serra óssea oscilatória (C) e remoção de tecidos moles do tecido ósseo coletado (D).	44
Figura 19. Amostra de tíbia de coelho implantada com compósito a base de MOMHT (c/b) e quitosana fixada em formal a 3,7% (A). Obtenção (clivagem) da metáfise proximal implantada (linhas pontilhadas brancas e seta amarela) da tíbia fixada com uso de disco diamantada dupla face (seta branca) conectado em micro-retífica (B). Vista intramedular (endosteal) do leito receptor e compósito após osteotomia longitudinal – asterisco amarelo (C) e vista medial (periosteal) do leito receptor e compósito – círculo preto pontilhado e asterisco vermelho (D).	45
Figura 20. Amostras em processo de desidratação acomodadas sobre agitador linear (LGI-SK-L330, Laborglas, São Paulo).	46
Figura 21. Resina acrílica (LR White Hard Grade, London, UK) e benzoyl peroxide London Resin Company Ltd) (A) e homogeneizada da solução à base de resina acrílica e peróxido de benzoila em agitador magnético (Modelo: SL-92, Marca: Solab).	47
Figura 22. Infiltração das amostras com resina acrílica LR. Amostras acondicionadas em tubos contendo resina acrílica sobre agitador linear (A) e mantidas em refrigeração (B).	47
Figura 23. Amostras submetidas à pressão negativa de -500 mmHg em estufa a vácuo (Modelo: SL 1004/30, SOLAB, Piracicaba).	48
Figura 24. Estufa a vácuo (Modelo: SL 1004/30, SOLAB, Piracicaba, SP) com temperatura de 60 C° (A), amostras acomodadas em recipientes cilíndricos de polipropileno (formas) contendo resina acrílica LR pura (virgem) em bandeja de aço inoxidável (B) e amostra emblocada em resina acrílica LR após termopolimerização (C).	48

Figura 25. Politriz metalográfica (Modelo: PLR – II, São Paulo) utilizada para lixar e polir amostras emblocadas em resina acrílica (A) e superfície de análise da amostra polida (corte sagital) (B).....	49
Figura 26. Checagem da superfície da amostra emblocada com resina acrílica (corte sagital) com uso do sistema de captura de imagem (câmera para microscópio USB de autofoco de 8mp Mod. NO294) acoplado ao estereomicroscópio (Ez4 – Leica) (A).....	49
Figura 27. Superfície de mostra polida de leito receptor de tíbia de coelho (asteriscos preto e brancos) e compósito constituído de MOMHT(c/b) corada com Alizarina red (corte sagital).	50
Figura 28. Amostra emblocada em resina acrílica acomodada na superfície de desbaste da base padronizadora – seta amarela (A) e base padronizadora posicionada no suporte de aço inoxidável fixado sobre uma politriz metalográfica, em contato com prato contendo lixa d’água (B).....	50
Figura 29. Amostra contendo leito receptor de tíbia de coelho e compósito constituído de MOMHT(c/b) emblocada em resina acrílica preparada para análise em MEV/EDS.....	51
Figura 30. Microscópio eletrônico de varredura (MEV) utilizado para análise das amostras. (Modelo TM3000, HITACHI – Japão).....	51
Figura 33. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias direitas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTc e quitosana, áreas circulares radiolucidas, no pós-operatório imediato (setas brancas) e aos 30 dias (setas amarelas).....	55
Figura 34. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias direitas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTc e quitosana no pós-operatório imediato (setas brancas) e aos 60 dias (setas amarelas).	56
Figura 35. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias direitas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTc e quitosana no pós-operatório imediato (setas brancas) e aos 90 dias (setas amarelas).	57
Figura 36. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias direitas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTc e quitosana no pós-operatório imediato (setas brancas) e aos 120 dias (setas amarelas).	58
Figura 37. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias esquerdas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTb e quitosana no pós-operatório imediato (setas amarelas) e aos 30 dias (setas brancas).	59

Figura 38. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias esquerdas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTb e quitosana no pós-operatório imediato (setas amarelas) e aos 60 dias (setas brancas).	60
Figura 39. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias esquerdas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTb e quitosana no pós-operatório	61
Figura 40. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias esquerdas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTb e quitosana no pós-operatório imediato (setas amarelas) e aos 120 dias (setas brancas).	62
Figura 41. Imagem macroscópica medial do terço proximal de tíbias direitas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTc e quitosana aos 30, 60, 90 e 120 dias (círculos amarelos), após remoção cutânea. Notar aumento de volume sobre o leito receptor do coelho (E1n3).	63
Figura 42. Imagem macroscópica medial do terço proximal de tíbias esquerdas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTb e quitosana aos 30, 60, 90 e 120 dias (círculos brancos), após remoção cutânea.	64
Figura 43. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTc e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E1 (30 dias) obtidas de corte sagital (n1-ABC e n2-ABC) e corte transversal ((n3-ABCD).....	66
Figura 44. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTc e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E2 (60 dias) obtidas de corte transversal (n1-ABC) e sagitais (n2-ABC e n3-ABC). ...	67
Figura 45. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTc e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E3 (90 dias) obtidas de cortes sagitais (n1-ABC e n2-ABC) e transversal (n3-ABC). .	68
Figura 46. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTc e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E4 (120 dias) obtidas de cortes sagitais (n1-ABC e n2-ABC) e transversal (n3-ABC).	69
Figura 47. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTb e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E1 (30 dias) obtidas de corte sagitais (n1-ABC e n2-ABC) e transversal (n3-ABC). ...	72

Figura 48. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTb e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E2 (60 dias) obtidas de cortes sagitais (n1-ABC e n2-ABC) e transversal (n3-ABC). .73

Figura 49. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTb e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E3 (90 dias) obtidas de cortes sagitais (n1-ABC e n3-ABC) e transversal (n2-ABC). .74

Figura 50. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTb e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E4 (120 dias) obtidas de cortes sagitais (n2-ABC e n3-ABC) e transversal (n1-ABC).76

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão (dp) obtidos a partir dos testes de citotoxicidade de extratos de amostras dos compósitos constituídos de MOMHT(c/b) associadas à quitosana em diferentes diluições.	52
Tabela 2. Comportamento dos compósitos constituídos de MOMHTc e quitosana em leitões receptores de tíbias direitas de coelhos por meio da MEV.....	65
Tabela 3. Comportamento dos compósitos constituídos de MOMHTb e quitosana em leitões receptores de tíbias esquerdas de coelhos por meio da MEV.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMSO	Dimetilsulfóxido
EDS	Espectroscopia por energia dispersiva
GH	Hormônio do crescimento
LR	White Hard Grade
MEV	Microscopia eletrônica por varredura
MOMHT ^b	Matrizes ósseas mineralizadas heterólogas trabeculares bovina
MOMHT ^c	Matrizes ósseas mineralizadas heterólogas trabeculares canina
PMMA	Polimetilmetacrilato
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
VEGEF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 GERAL.....	20
2.2 ESPECÍFICOS.....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 BIOLOGIA E REPARO ÓSSEO TECIDUAL	21
3.2 ENXERTOS E BIOMATERIAIS	24
3.3 QUITOSANA.....	25
3.4 REPARO ÓSSEO EM COELHOS.....	26
3.5 ANÁLISE PRÉ E PÓS IMPLANTAÇÃO	27
4. METODOLOGIA.....	30
4.1 PREPARO DOS COMPÓSITOS CONSTITUÍDOS DE MOMHT (c/b)	30
4.2 INCORPORAÇÃO DA QUITOSANA AOS COMPÓSITOS CONSTITUÍDOS DE MOMHT(c/b)	31
4.2 ENSAIO DE BIOCOMPATIBILIDADE.....	33
4.3 INTERVENÇÃO CIRÚRGICA	40
4.4 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS EM BIOTÉRIO	42
4.5 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E COLETA DAS AMOSTRAS DE TÍBIAS IMPLANTADAS	43
4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE TÍBIAS IMPLANTADAS COM MOMHT (c/b) E QUITOSANA.....	44
5. RESULTADOS	52
5.1 CITOTOXICIDADE DOS COMPÓSITOS	52
5.2 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS	54
6. DISCUSSÃO	78
7. CONCLUSÃO.....	83
8. REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO

As fraturas traumáticas decorrentes de acidentes automobilístico, as neoplasias ósseas ou não-uniões ósseas, têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. Por isso, estudos envolvendo diferentes tipos de tratamentos cirúrgicos ortopédicos reparadores que estimulem e acelerem a regeneração óssea, vêm sendo amplamente pesquisados. Uma das principais opções para o tratamento dessas afecções é a substituição de um segmento ou o preenchimento de falha óssea com o uso de enxerto ósseo ou implante natural e/ou sintético (ALIEVI et al., 2007; BURGER et al., 2013; FREITAS et al., 2013a).

A melhor opção de enxerto no tratamento de falhas ósseas, é o enxerto ósseo autólogo, já que este acelera a reparação. No entanto, nesse procedimento, há o inconveniente de aumentar a morbidade, a dor, os tempos cirúrgico e anestésico e de lesar estruturas normais, além de não fornecer volume suficiente para reparar grandes falhas ósseas (MELO et al., 1998; STEVENSON, 1998; ALIEVI et al., 2007).

Atualmente, substitutos ósseos naturais têm sido alvo de pesquisas para contribuir nas reparações das afecções ósseas. Eles podem ser obtidos a partir de animais da mesma espécie, ou seja, os aloimplantes, ou de espécie diferente, isto é, os heteroimplantes. Apesar dos implantes serem biologicamente inferiores aos auto-enxertos, eles têm sido bastante utilizados na ortopedia reparadora, com resultados satisfatórios (RANZANI, 1996; DASSO et al., 1998; MELO et al.; 1998; MORAES et al., 2004; ALIEVI et al., 2007; MILORI et al., 2013).

As vantagens dessa alternativa são a constituição de banco de ossos apropriado para o fornecimento de implantes, suporte para formação de novo osso (osteogênese), sustentação mecânica, além de um único doador fornecer quantidade significativa de tecido ósseo (MELO et al., 1998; ALIEVI et al., 2007, FREITAS et al., 2013b). As falhas ósseas também podem ser preenchidas na sua totalidade por implantes sintéticos, como cimento de fosfato de cálcio, hidroxiapatita sintética, polimetilmetacrilato (PMMA), biovidros entre outros (BRAZ et al., 2003; FERNANDES et al., 2004; MORAES et al., 2004; MOREIRA et al., 2014; CATELLO et al., 2017).

A quitosana é um biomaterial natural biocompatível e biodegradável constituído de polissacarídeo que tem origem a partir da reação de desacetilação parcial da quitina, por tratamento alcalino, podendo também ocorrer naturalmente em alguns fungos. Ela pode ser apresentada na forma de gel, pasta, membranas e em pó, com diferentes granulações

(GERENTES, 2002; CHEN et al., 2005; SPIN-NETO et al., 2008; KUHL et al., 2017).

Os implantes, tanto naturais quanto sintéticos, de uma forma geral, devem possuir características peculiares básicas como promover a osteoindução, que se dá pela formação de osso a partir de células osteoprogenitoras, oriundas das células mesenquimatosas primitivas sob a influência de um ou mais fatores indutores presentes na matriz óssea (ALEXANDER, 1987), já a osteocondução promove o crescimento ósseo por meio de aposição de tecido ósseo subjacente na presença de osso ou células mesenquimatosas indiferenciadas, além de serem biocompatíveis, não carcinogênicos, atóxicos, não antigênicos, com mínimo, e induzir pouca reação inflamatória local (AKAMOTO, 2002; COSTA et al., 2015).

O método de diagnóstico por imagem, por meio de avaliação radiológica, permite avaliar com precisão o comportamento do implante, ou seja, substituto ósseo, em procedimentos ortopédicos reconstrutivos. Com ele, é possível localizar com precisão a posição exata de um substituto ósseo em falha óssea, a remodelação óssea e, também, quantificar reações locais. Por isso, nos procedimentos cirúrgicos ortopédicos de rotina e experimentais, que necessitam de acompanhamento, o seu uso torna-se imprescindível, não só na medicina humana, como também na medicina veterinária (FREITAS et al., 2013a; MOREIRA et al., 2014).

O método de microanálise por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) está bem definido e é bastante utilizado para avaliar a superfície de um espécime sólido e, também, na obtenção de imagem tridimensional (SABOIA et al., 2000; GARTNER, 1999; TIMM, 2005). Dessa forma, a investigação sobre o comportamento biológico local do implante, permite estabelecer a distinção entre o contato físico e a adesão química entre o biomaterial e o leito receptor (SABOIA et al., 2000; SERHAN et al., 2004; FAEDA et al., 2009; MAYER et al., 2013; COSTA et al., 2015).

Uma opção para a reparação das falhas ósseas seria o uso de biomateriais naturais e sintéticos que apresentassem propriedades osteogênicas, osteoindutora e osteocondutora, que proporcionassem sustentação mecânica, de fácil aquisição, baixo custo, que não necessitassem de material especializado para preservação, e que preenchessem completamente a falha óssea, eliminando problemas inerentes ao enxerto ósseo autógeno (FRIEDLAENDER, 1982; SINIBALDI, 1989; MELO et al., 1998; STEVENSON, 1998; ALIEVI et al., 2007; FREITAS et al., 2012; BURGER et al., 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar as interfaces entre compósitos constituídos de MOMHTc e/ou MOMHTb associadas à quitosana e as falhas ósseas de tíbias de coelhos.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito citotóxico de compósitos constituídos de MOMHTc e/ou MOMHTb associadas à quitosana;

Analisar por meio de técnica radiológica digital o comportamento de compósitos constituídos de MOMHTc e/ou MOMHTb associadas à quitosana em falhas ósseas de tíbias de coelhos, em diferentes tempos;

Analisar por meio de técnica MEV as superfícies externas (periósteo) e interna (endósteo) e as interfaces de compósitos constituídos de MOMHTc e/ou MOMHTb associada a quitosana em falhas ósseas de tíbias de coelhos;

Analisar por meio de técnica EDS pontos de integração das interfaces dos compósitos constituídos de MOMHTc e/ou MOMHTb associada à quitosana em falhas ósseas de tíbias de coelhos;

Comparar os resultados obtidos através das técnicas radiológicas, de MEV e de EDS de compósitos constituídos de MOMHTc e/ou MOMHTb associadas à quitosana em falhas ósseas de tíbias de coelhos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOLOGIA E REPARO ÓSSEO TECIDUAL

O tecido ósseo, principal constituinte do esqueleto responsável pela proteção e suporte de órgãos, além de diversas outras funções especializadas, trata-se de um tecido conjuntivo formado por matriz óssea extracelular e células. A matriz orgânica apresenta fibras colágenas, proteoglicanos e glicoproteínas e a parte inorgânica da matriz óssea é representada principalmente pelos íons cálcio e fosfato formando os cristais de hidroxiapatita, essa associação das fibras de colágeno e cristais confere a característica singular de dureza do tecido ósseo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos são as células que compõe o tecido ósseo e apresentam funções específicas: os osteoblastos, denominadas de células mesenquimais, possuem intensa capacidade secretora de matriz orgânica, estão localizados na periferia entre o osso cortical e o periósteo, e produzem fatores de crescimento sob influência do hormônio do crescimento (GH) nos focos de remodelagem; após a síntese de matriz, o osteoblasto permanece aprisionado pela matriz recém sintetizada passando a denominar-se osteócito. Tais osteócitos são células em repouso, instaladas nas criptas ósseas a fim de manter a integridade do tecido, capazes de sintetizar pequena quantidade de matriz e se diferenciarem em osteoblastos e osteoclastos quando estimulados; ao contrário dos osteoblastos, os osteoclastos são células gigantes e multinucleadas responsáveis pela lise e reabsorção do tecido ósseo, participando ativamente do processo de reparo tecidual (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; MOTTA, 2009).

Visando o reparo ósseo tecidual, o processo de reparo no tratamento de fraturas é essencial e tem como objetivo recuperar a mecânica do tecido ósseo além de sua geometria, para reestabelecimento da sua função (KOLAR et al., 2010), trata-se de um processo multifatorial e de extrema complexidade que engloba uma série de fatores celulares, hormonais e moleculares e, em condições fisiológicas, tem duração de quatro a seis semanas. Didaticamente podemos dividi-lo em fases inflamatória, formação do tecido de granulação, formação do calo ósseo e remodelamento ósseo, embora haja sobreposição entre os acontecimentos (ROZEN et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008).

Fase inflamatória

Imediatamente após o trauma ocorre a destruição de matriz, com consequente morte celular e lesão de vasos sanguíneos, dando origem a um hematoma local. Como resposta imunológica, as células inflamatórias, como linfócitos, macrófagos, monócitos e polimorfonucleares, são recrutadas a fim de remover os restos celulares, e essas por sua vez, produzem citocinas que caracterizam o processo inflamatório (KALFAS, 2001; PHILLIPS, 2005; KOLAR et al., 2010).

A contribuição do hematoma é indispensável para que se inicie uma cascata de eventos, uma vez que representa um reservatório de fatores de crescimento no processo de diferenciação celular e angiogênese. O hematoma permite o aumento da permeabilidade local e a difusão de proteínas do plasma bem como fibrina dos capilares recém-formados (GIANNOUDIS, 2007; SCHINDELER et al., 2008). A fase inflamatória tem seu início no momento do trauma e se estende em torno de três dias, dando início a formação do tecido de granulação (ROZEN et al., 2007).

Fase de tecido de granulação

Marcada por intensa angiogênese e recrutamento das células mesenquimais progenitoras, forma-se um tecido altamente vascularizado e rico em células indiferenciadas, denominado tecido de granulação. Tais células progenitoras provem do periósteo, tecido muscular, osso cortical e medula óssea adjacentes a lesão, conferindo-lhes papel importante no processo de nutrição e reparo (ROZEN et al., 2007; TSIRIDIS, 2007; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

A formação deste tecido é dependente da ação quimiotática e mitogênica do fator de crescimento (TGF- β) fator de crescimento transformador beta produzido pelas plaquetas e macrófagos presentes no hematoma formado, capaz de direcionar e estimular células mesenquimais, osteoprogenitoras, condroblastos e osteoblastos. Não o bastante, o TGF- β inibe enzimas proteolíticas que poderiam destruir o tecido neoformado e regula a produção de matriz celular orgânica (KALFAS, 2001; ROZEN et al., 2007).

Esta fase, caracterizada por intensa diferenciação e proliferação de células osteogênicas mediadas pelo TGF- β , sobrepõe a fase inflamatória no terceiro dia do processo e encerra-se aproximadamente no sexto dia do reparo tecidual, tendo uma duração em torno de quatro dias (PHILLIPS, 2005; ROZEN et al., 2007).

Fase de calo ósseo

Desde o quarto até o décimo quarto dia após o trauma tecidual, o tecido de granulação dá origem aos tecidos cartilagosos e ósseos pela combinação dos processos de ossificação intramembranosa e endocondral. A formação intramembranosa de tecido ósseo é independente de cartilagem, já a endocondral depende de células progenitoras para formação de cartilagem e mineralização do calo subsequente. No tratamento da maioria das fraturas a ossificação endocondral é predominante devido ao grau de instabilidade presente no gap da fratura (ROZEN et al., 2007; TSIRIDIS, 2007; SCHINDELER et al., 2008).

Nesta fase, ocorre a formação de um infiltrado rico em fibroblastos adjacente ao perióstio e as células mesenquimais, já recrutadas, se diferenciam em condroblastos capazes de sintetizar matriz cartilaginosa (colágeno tipo II e proteoglicanos), caracterizando o calo mole. Os condroblastos se diferenciam em condrócitos maduros e o tecido cartilaginoso hipertrofia conferindo certa estabilidade mecânica até que o calo cartilaginoso seja gradativamente mineralizado (ROZEN et al., 2007; TSIRIDIS, 2007).

A vascularização se estabelece no foco do calo cartilaginoso e acredita-se que, após promoverem mineralização intersticial, os condrócitos maduros sofram apoptose e o tecido cartilaginoso é gradativamente removido pelos osteoclastos provenientes do aporte vascular e substituído por matriz óssea neoformada pelos osteoblastos, responsáveis por sintetizarem uma proteína cujo nome é dado de osteocalcina, não colágena que incorpora à matriz óssea, contribuindo para o processo de mineralização óssea (KALFAS, 2001; SCHINDELER et al., 2008; SARAIVA, 2002).

A diferenciação de células tronco em células osteoprogenitoras é regulada por complexas interações e sinalizações celulares autócrinas e parácrinas, e por estímulos mecânicos externos. Hormônios sistêmicos, como o paratormônio, vitamina D, hormônio tireoideano, hormônio do crescimento, esteroides sexuais e fator de crescimento endotelial vascular (VEGEF), podem influenciar diretamente na diferenciação de osteoblastos e na mineralização tecidual com conseqüente aumento da produção de cartilagem, reabsorção e formação de tecido ósseo (GIANNOUDIS, 2007; KERAMARIS et al., 2008).

Fase de remodelação

O tecido ósseo recém formado é trabecular e requer substituição por um tecido mais resistente, a fim de recuperar a integridade mecânica, anatômica e funcional do osso (ROZEN et al., 2007). O processo de remodelação do osso trabecular em osso lamelar inicia logo após a formação do calo duro, em torno de duas semanas e perdura por meses, com resistência óssea

obtida a partir de três a seis semanas (KALFAS, 2001; ROZEN et al., 2007)

A remodelação inicia-se na borda periosteal do calo duro e ao longo do tempo evolui para a região endosteal reestabelecendo o canal medular. Os osteoclastos são os protagonistas do processo de remodelação por promoverem reabsorção do calo ósseo mineralizado abundante e, em perfeita interação com os osteoblastos, reestruturam o tecido ósseo (KALFAS, 2001; HADJIDAKIS, 2006).

Dentre os fatores locais, destacam-se citocinas, prostaglandinas, e os fatores de crescimento. Os fatores de crescimento são polipeptídios produzidos pelas próprias células ósseas ou por tecido extra ósseo que modulam o crescimento, diferenciação e proliferação celular com funções particulares e específicas (MONTECINOS, 2009; TAKAYANAGI, 2005).

O mecanismo de interação entre osteoblastos e osteoclastos é determinado sistema RANKL–RANK-OPG. Osteoblastos e células em repouso sintetizam um peptídeo denominado RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear-kappa b) que une-se ao seu receptor RANK (receptor ativador do fator nuclear-kappa b) presente na superfície das células precursoras de osteoclastos, favorecendo sua diferenciação e reabsorção óssea. Como resposta antagonista e na tentativa de impedir reabsorção exacerbada, os osteoblastos sintetizam uma proteína denominada OPG (osteoprotegerina) que bloqueia a ligação RANKL - RANK, induzindo a apoptose de osteoclastos (TAKAYANAGI, 2005; MONTECINOS, 2009).

3. 2 ENXERTOS E BIOMATERIAIS

O uso de biomateriais para substituir a perda óssea é prática comum há décadas, tendo em vista que é um material projetado para assumir uma forma que pode direcionar, mediante interações com sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico (DAVID,2018; CHOW, 2009). No início, para restituir perdas ósseas utilizava-se autoenxertos, considerados ideais por representarem material do próprio indivíduo. No entanto, esse procedimento apresenta desvantagens, como maior incidência de enfermidades no sítio doador e quantidade limitada do material passível de doação (OLIVEIRA et al., 2009).

Diante dessas limitações, os aloenxertos (compostos de materiais de outro indivíduo da mesma espécie) e os xenoenxertos (materiais obtidos de outra espécie) surgiram como possíveis substitutos. Porém, eles também apresentam limitações, como risco de transmissão de doenças ou ainda, de rejeição (PRECHEUR, 2007).

O enxerto ósseo autógeno apresenta as atividades de osteogênese, osteoindução, osteocondução e osteopromoção. A osteoindução é a formação de tecido ósseo a partir da

diferenciação dos fibroblastos provenientes do tecido conjuntivo e osteoblastos. O processo de osteoindução é o processo pelo qual a osteogênese é induzida e envolve a formação de novo osso a partir do recrutamento de células imaturas e sua diferenciação em células osteoprogenitoras. A desvantagem, porém, é que esta técnica pode estar associada à morbidade, dor e perda de função temporária, uma vez que fica limitada à quantidade de material doador disponível, além da criação de uma área cirúrgica adicional (PESSOA et al., 2015; PEREIRA et al., 2012)

Na osteocondução há formação óssea por meio de um processo de crescimento de capilares e células ósseas progenitoras, seja dentro, em volta ou através do enxerto ósseo ou arcabouço previamente instalado, servindo como um elo para a formação de um novo osso. Esse processo refere-se à capacidade do biomaterial em conduzir o desenvolvimento de novo tecido ósseo através de sua matriz de suporte (arcabouço). Assim, os materiais osteocondutores são biocompatíveis e formam um arcabouço para deposição e proliferação celular com atividade osteoblástica (SOUZA, 2010).

Enxertos homólogos (aloenxertos) tem como característica a longo prazo resultados semelhantes ao enxerto autógeno, apesar de que a enxertia com osso homólogo tenha índice de reabsorção maior (DELL VALLE, 2006).

Enxertos heterólogos ou também denominados de xenoenxertos, são compostos inorgânicos provindos de ossos de animais (GARG, 1999), e pode ser considerado um bom material por ser completamente desprovido da fase proteica e por sua matriz óssea não ser modificada em seu formato original além de ser reabsorvível, denso ou poroso, cristalino ou amorfo.

Apesar da semelhança com algumas hidroxiapatitas, sua composição à base de apatita predominantemente composta por carbonatos e grupos hidroxílicos reduzidos o torna um material especificamente distinto, apresentando propriedades osteoindutivas, servindo como arcabouço para a neoformação óssea (SOUZA, 2010).

3.3 QUITOSANA

A quitosana é um biopolímero hidrofílico, constituída por unidades Nacetil-D-glicosamina e D-glicosamina. É considerada um polissacarídeo abundante da natureza tendo como principal fonte natural a quitina oriunda de carapaça de crustáceos, podendo ainda ser encontrada em insetos, moluscos e parede celular de fungos (ANDRADE et al., 2003; RINAUDO, 2006). As principais vantagens da quitosana é com relação a sua versatilidade de

preparação, podendo ser transformada em diversas formas, como flocos, microesferas, membranas, nanopartículas e fibras, já que pode ser modificada fisicamente (SANTOS, 2004; LARANJEIRA, 2009).

Outra característica importante deste biopolímero é sua alta hidrofiliabilidade, onde sua cadeia polimérica é composta por um grande número de grupos hidroxila e amino, permitindo sua utilização como biomaterial na forma de micropartículas, gel e membrana em diversas aplicações, como veículo de liberação de fármacos, bandagens, géis injetáveis, entre outras aplicações (KUMAR, 2000).

A quitosana consiste em um biomaterial natural, atóxico, produzido por fontes naturais renováveis, cujas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas há vários anos, é um dos biomateriais com maior potencial de utilização na medicina regenerativa, desde fios de suturas, a biomateriais de aplicação na pele, osso e cartilagem, possuindo diversas possibilidades de utilização neste campo (KUMAR, 2000; POLO-CORRALES et al., 2014).

Apresenta propriedades estimulantes do sistema imune, as quais são manifestadas na aceleração de cicatrização. Outras propriedades que estão presentes na quitosana incluem entre outras as suas características físico-químicas como biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade (DAMIAN, 2005; MENDES, 2011; CHEN et al., 2013).

Atualmente esse biomaterial tem sido altamente empregado na substituição do tecido ósseo, Fakhry et al., 2004, constataram que a quitosana apresentou maior fixação e disseminação das células nos osteoblastos em relação aos fibroblastos. Mesmo com os bons resultados obtidos no emprego deste material, ainda existe uma necessidade de melhorar a sua afinidade pelo tecido ósseo e o desempenho das propriedades mecânicas.

3. 4 REPARO ÓSSEO EM COELHOS

O processo de reparo em coelhos, semelhante ao observado nos humanos, é composto por três estágios (MATOS, 2008). Inicialmente, nota-se a presença de um infiltrado celular devido a multiplicação promovida pelas citocinas inflamatórias e infiltração de fibroblastos, associado a presença de tecido ósseo jovem e com discreto tecido lamelar. Posteriormente, a celularidade se mantém, até que a quantidade de tecido ósseo lamelar aumenta progressivamente e extrapola a quantidade de osso neoformado, alcançando a fase de reparo. Em seu estágio final, a fibrose medular formada é intensa e a celularidade reduz e o processo de reparo se conclui (MATOS, 2008; ALJUMAILY, 2010). Tendo em vista que o tecido ósseo

nesta espécie também é composto por sistema harvesiano, que se assemelha ao de cães, caprinos e humanos, as pesquisas realizadas nesses indivíduos facilitam a extrapolação dos resultados.

Azevedo et al., 2013, comparando o uso de hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea no reparo do tecido ósseo em coelhos conclui que os tratamentos empregados mostraram-se biocompatíveis. A quitosana isoladamente e em associação com medula óssea estimulou maior deposição de tecido, bem como estimularam reações celulares mais evidentes em coelhos.

3. 5 ANÁLISE PRÉ E PÓS IMPLANTAÇÃO

Teste de citotoxicidade

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. Após comprovada a sua não toxicidade, o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se assim os ensaios necessários em animais de laboratório. Em relação a aplicação clínica, há um controle cada vez mais rigoroso ao uso de animais de laboratório, tendo a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade desses dispositivos, com o objetivo de evitar reações adversas e lesar o organismo do paciente.

Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (ROGERO et al., 2003).

O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais. Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como a limitação de variáveis experimentais, obtenção de dados significativos, além do período de teste ser mais curto. O problema da extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para a aplicação clínica dos biomateriais pode ser superado pelo uso de materiais de referência apropriados, atualmente em uso em clínicas (CRUZ et al., 1987).

Estudos com estes métodos demonstraram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro*.

Exame radiográfico

Em 1910, a radiografia assumiu um importante papel técnico e científico, e passou a ser efetuada por técnicos especializados e com regras de seguranças obrigatórias (VALE, 2009), tornando-se o método de imagem mais usado na prática clínica (MONTADON, 2007).

A radiografia simples é o exame de imagem inicial para a avaliação das fraturas de um modo geral e encontra-se amplamente distribuído na rotina de pequenos animais, pois é um método rápido, económico e simples, capaz de fornecer inúmeras informações (REZENDE et al., 1998; KEALY et al., 2011).

O método de diagnóstico por imagem, através de avaliação radiológica, permite avaliar com precisão o comportamento de implante, ou seja, substituo ósseo, em procedimentos ortopédicos reconstrutivos, sendo um exame de fácil realização e não invasivo ao paciente (MOREIRA et al., 2014).

Com ele, é possível localizar com precisão a posição exata de substituto ósseo em falha óssea, a remodelação óssea e, também, quantificar reações locais. Por isso, nos procedimentos cirúrgicos ortopédicos de rotina e experimentais, que necessitam de acompanhamento, o seu uso torna-se imprescindível, não só na medicina humana, como também na medicina veterinária (FREITAS et al., 2013^a).

Microscopia eletrônica por varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é um instrumento muito versátil e usado rotineiramente para a análise microestrutural de materiais sólidos. Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem se tornou um instrumento imprescindível nas mais diversas áreas: eletrônica, geologia, ciência, engenharia dos materiais, entre outros. Em particular, o desenvolvimento de novos materiais têm exigido um número de informações bastante detalhado das características microestruturais só possível de ser observado no MEV (FAEDA et al., 2009).

A MEV tem seu potencial ainda mais desenvolvido com a adaptação na câmara da amostra de detectores pela espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS) que permite a realização de análise química na amostra em observação. Através da captação pelos detectores e da análise pela EDS é possível obter informações qualitativas e quantitativas da composição da amostra na região submicrométrica de incidência do feixe de elétrons (DEDAVUD, 2007).

Entretanto, não são apenas estas características que fazem do MEV uma ferramenta tão importante e tão usada na análise dos materiais. A elevada profundidade de foco (imagem com

aparência tridimensional) e a possibilidade de combinar a análise microestrutural com a microanálise química são fatores que em muito contribuem para o amplo uso desta técnica. A observação e análise de fratura teve um grande avanço com o uso do microscópio eletrônico de varredura (SABOIA et al., 2000; SERHAN et al., 2004).

Dessa forma, a investigação sobre o comportamento biológico local do implante, permite estabelecer a distinção entre o contato físico e a adesão química entre o biomaterial e o leito receptor. Com isso, a análise física de um implante através de MEV e a análise química através de EDS, são de grande relevância para a verificação micromorfológicas que envolvem significativamente na osteointegração e estabilidade primária do implante com o leito receptor (MAYER et al., 2013; COSTA et al., 2015).

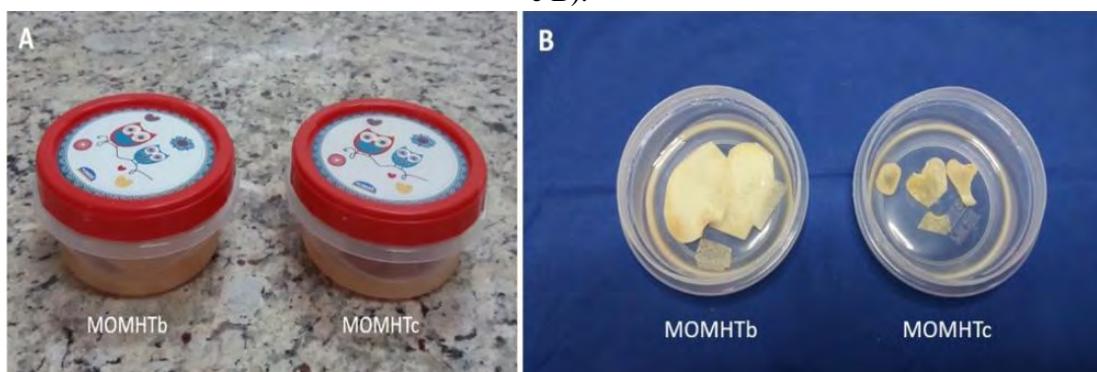
4. METODOLOGIA

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Cuiabá (CEUA/UNIC), em reunião de 26/06/2018 (protocolo nº 028/2018) e, com consentimento da CEUA/FZEA, foi realizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), Campus Fernando Costa, Pirassununga/SP.

4.1 PREPARO DOS COMPÓSITOS CONSTITUÍDOS DE MOMHT (c/b)

A MOMHTc foi coletada assepticamente da metáfise distal de fêmur de caninos adultos saudáveis, que vieram a óbitos por traumas, sem sinal/sintomas de afecções infecto-contagiosas. Já a MOMHTb foi coletada assepticamente de metáfise distal de fêmur de bovinos adultos abatidos no frigorífico da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP). Após remoção dos tecidos moles adjacentes à metáfise (canino e bovino), com o uso de uma serra manual, segmentos transversais de 5mm de comprimento da metáfise proximal foram coletados, e o tecido medular mole removido com água corrente em alta pressão, com o uso de uma lavadora de alta pressão (Intech Machine Acqua 1300Lbs 1350W). Em seguida, as MOMHT (c/b) foram lavadas com solução salina a 0,9% e acondicionadas separadamente em recipientes plásticos estéreis contendo glicerina a 98% (Figura 1), por um período mínimo de 30 dias, em temperatura ambiente, até o momento do uso.

Figura 1. MOMHT (c/b) acondicionadas em frascos plásticos contendo glicerina (glicerol) a 98% (A e B).



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

A confecção dos compósitos foi realizada em cabine de segurança biológica classe 2 A1 (Modelo: SBIIA1-1266/4, Filterflux). As MOMHT (c/b) preservadas em glicerina a 98% foram

hidratadas/lavadas com solução salina a 0,9% por 10 minutos (três vezes). Ato contínuo, as MOMHT (c/b) tiveram suas superfícies lixadas (desgastadas) com uso de politriz (lixadeira) metalográfica (PL02E/300), sob irrigação até atingir espessura aproximada de 4mm e submersas em solução salina a 0,9% em cuba ultrassônica (10 minutos) para remoção de microfragmentos gerados na ocasião do lixamento (Figura 2).

Figura 2. Processamento das MOMHT (c/b). Cabine de segurança biológica contendo materiais utilizados no preparo das MOMHT (c/b) (A), MOMHT (c/b) em frascos plásticos contendo glicerina a 98% (B), hidratação/lavagem das MOMHT (c/b) em solução salina a 0,9% para lavagem das MOMHT (c/b) (F).



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

4.2 INCORPORAÇÃO DA QUITOSANA AOS COMPÓSITOS CONSTITUÍDOS DE MOMHT(c/b)

Para produção dos compósitos, as MOMHT (c/b) foram desgastadas com o uso de lixa d'água (nº400) acoplada em politriz/lixadeira metalográfica, sob irrigação, até atingir espessura de 2,0mm (Figura 3). Utilizando a mesma metodologia empregada anteriormente, com uso de broca trefina com diâmetro interno de 6mm acoplado à caneta de baixa rotação foram obtidos discos de 6mm de diâmetro, que foram submersos em solução salina a 0,9% em cuba ultrassônica (10 minutos) para remoção de microfragmentos presente na ocasião do processamento.

Figura 3. Mensuração dos compósitos de MOMHT (c/b) associados à quitosana.



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

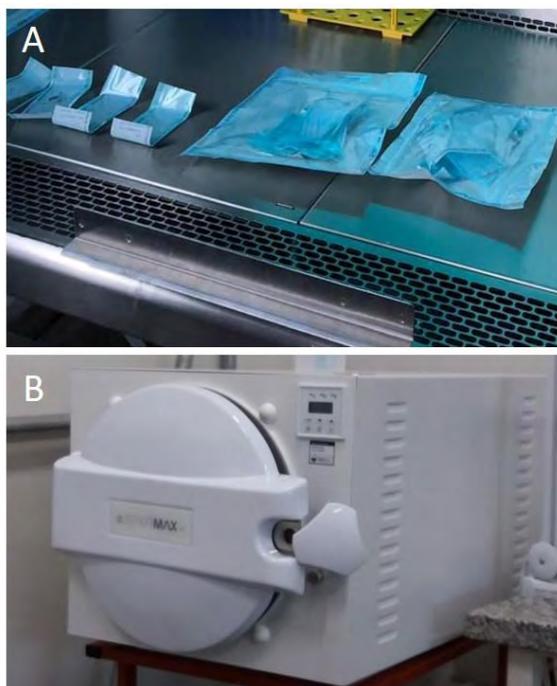
Posteriormente os discos das as MOMHT (c/b) foram acondicionados sobre gazes estéreis e imersos em solução de quitosana à 1%, sendo a diluição de 1 grama de quitosana em 100 ml de solução e ácido acético a 1% (Figura 4), os discos foram acondicionadas em estufa em temperatura de 32° graus e repetido a imersão a cada 24 horas, durante três días. Ato contínuo, foi realizado a neutralização em pH 7 em solução de hidróxido de sódio (NaOH). Os discos de MOMHT (c/b) foram acondicionados em grau cirúrgico e esterilizados em autoclave seguindo o protocolo já utilizado, para posterior ensaio de citotoxicidade e uso nas tíbias (Figura 5).

Figura 4. Avaliação da superfície dos compósitos de MOMHT (c/b) associada à quitosana. Observe que as trabéculas ósseas apresentam superfícies revestidas com uma camada clara e brilhante (setas vermelhas) após tratamento com a solução de quitosana (Estereomicroscópio Ez4 – Leica) 20X.



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV); Laboratório de Biomateriais e Biossensores (BIOLAB/ZAB) – FZEA/USP.

Figura 5. Compósitos constituídos de MOMHT (c/b) e quitosana processados e colocados em embalagem para posterior esterilização (A). Autoclave demonstrando processo de esterilização dos compósitos para posterior ensaio de citotoxicidade (B).



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

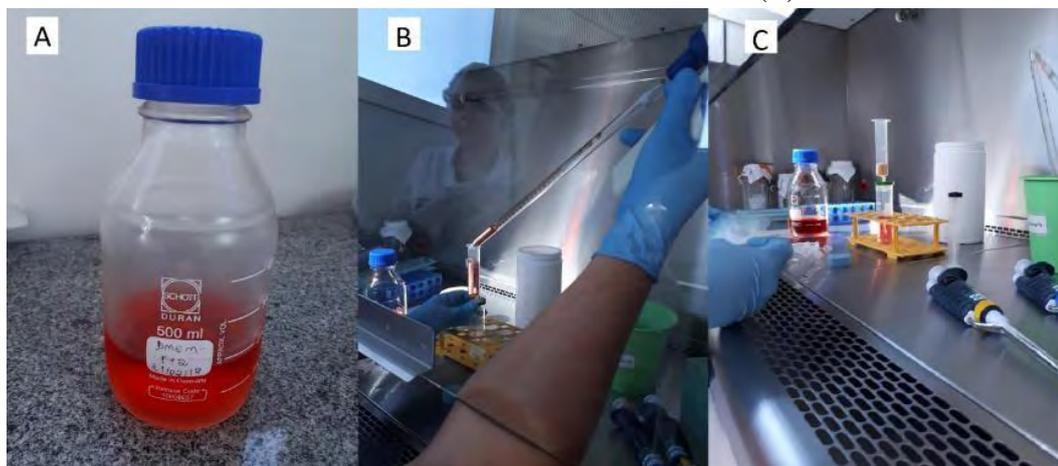
4.2 ENSAIO DE BIOCOMPATIBILIDADE

Cultura de células

Foi utilizada a linhagem celular L929, fibroblastos de camundongo, do Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional da USP (LOCT). O meio junto a seus complementos, sendo esses 10% soro fetal bovino, 2% glutamax e 1% antibiótico, associando-se estreptomicina e penicilina. Em seguida a solução foi filtrada. As células foram descongeladas e centrifugadas a 2000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi homogeneizado e ressuspensionado em 10 mL de meio completo. A garrafa foi incubada e mantida por 24 horas a 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ (Figura 6).

Para a manutenção da cultura celular, o meio foi retirado da garrafa por inversão e em seguida adicionou-se 3mL de solução tampão salina (PBS, a pH 7,4) para retirar o soro residual, homogeneizou e descartou o líquido, repetindo esse procedimento 3 vezes. As células foram dispersas utilizando-se 0.05% tripsina em PBS e mantidas em estufa 37°C por 5 minutos até se soltarem da garrafa. Após esse processo, foi adicionado meio completo para inativar a tripsina, homogeneizou e com a pipeta transferiu tudo para um tubo Falcon estéril.

Figura 6. Meio de cultivo celular DEMEM F12 (A). Filtração do meio de cultivo (B). Adição de 10% de soro fetal bovino e 1 % de antibiótico (C).

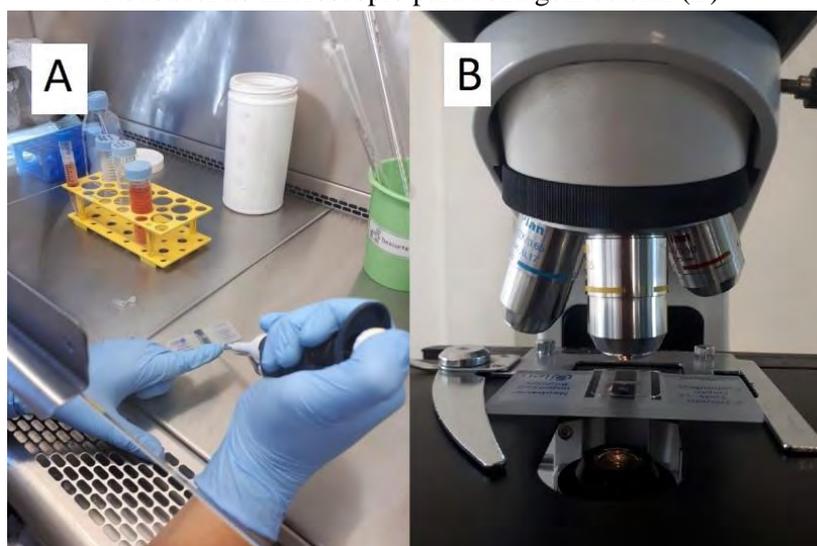


Fonte: Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional da USP (LOCT) – FZEA/USP.

Contagem de células em Câmara de Neubauer

Após realizar o processo descrito anterior, a solução foi homogeneizada e coletou-se 10 μ l em microtubo. Acrescentou-se 10 μ l de azul trypan, homogeneizou novamente e colocou na câmara de Neubauer (Figura 7). Os 4 quadrantes foram contados e a concentração de células foi encontrada a partir de determinada fórmula estabelecida.

Figura 7. Aplicação de azul trypan em câmara de Neubauer para contagem celular (A). Câmara de Neubauer ao microscópio para contagem celular (B).



Fonte: Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional da USP (LOCT) – FZEA/USP.

Ensaio de citotoxicidade

O meio de cultura foi descongelado em banho maria (Figura 8) e as garrafas do cultivo celular foram retiradas da estufa, analisando-se a viabilidade celular ao microscópio.

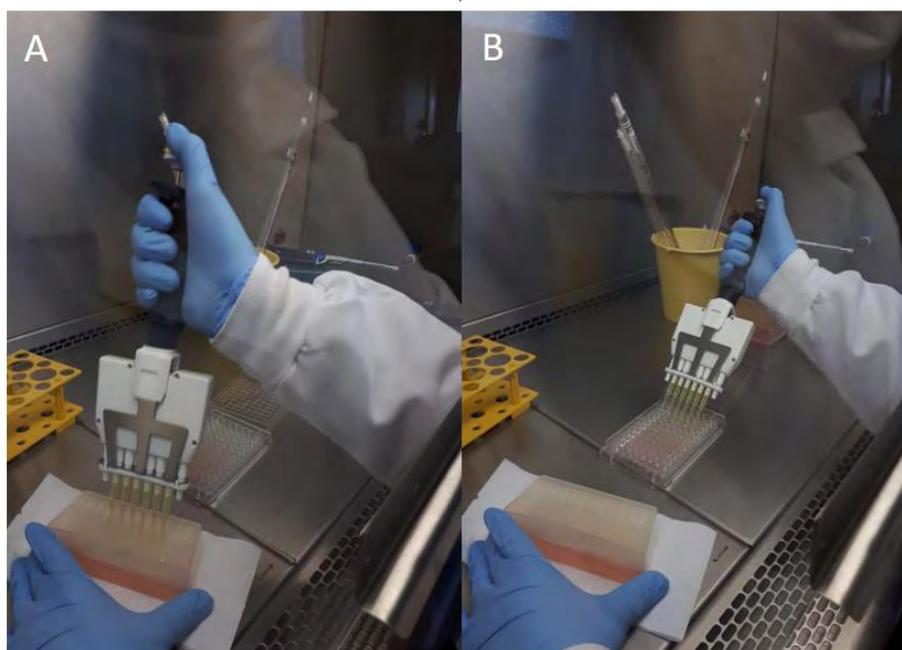
Figura 8. Meio de cultivo celular em banho maria para posterior processamento.



Fonte: Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional da USP (LOCT) – FZEA/USP.

Após a contagem celular e a realização do preparo da solução contendo a concentração exata de células para cada poço da placa (6×10^3 células/ $100 \mu\text{L}$), a solução foi transferida para a placa de cultura com fundo chato de 96 poços utilizando-se uma pipeta multicanal, totalizando $100 \mu\text{L}$ em cada poço (Figura 9 e 10).

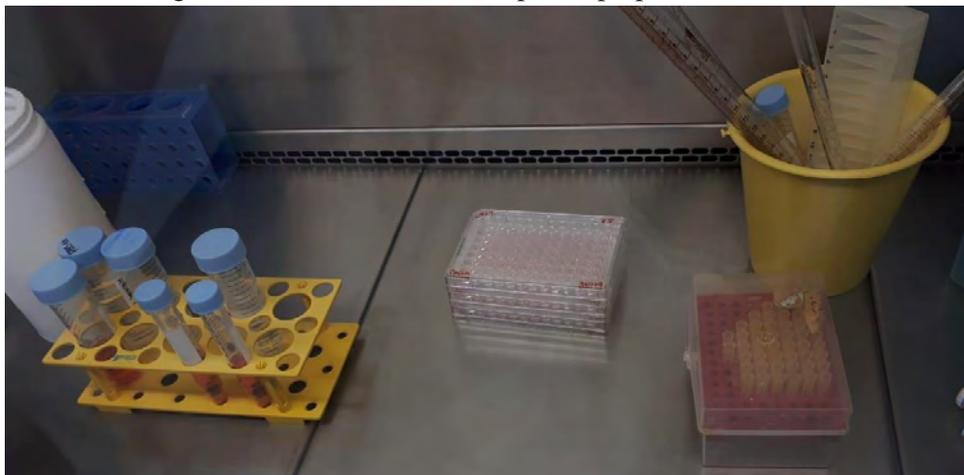
Figura 9. Transferência do cultivo celular para as placas de cultura com fundo chato de 96 poços (A e B).



Fonte: Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional da USP (LOCT) – FZEA/USP.

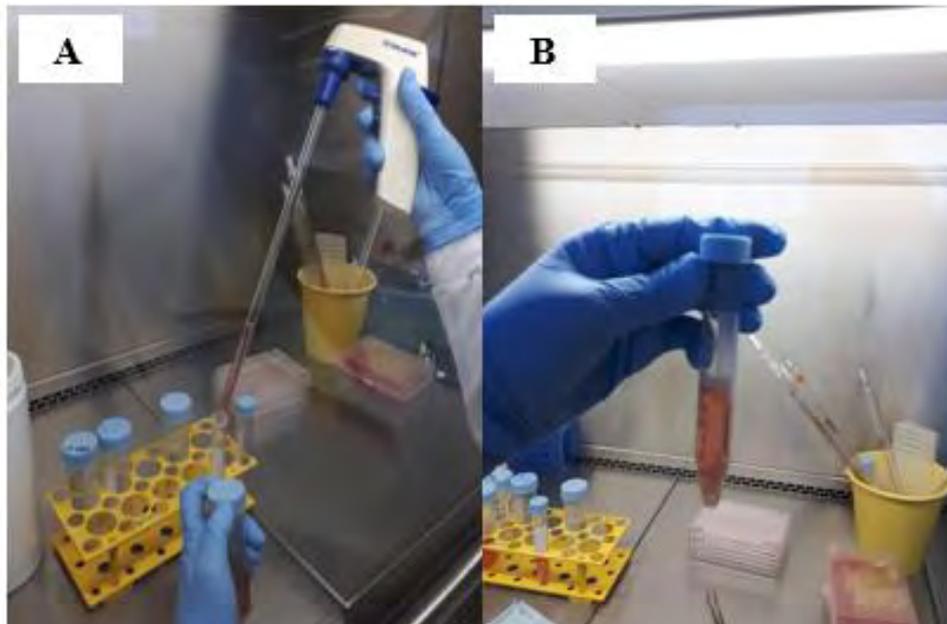
As placas foram mantidas por 24 horas a 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO₂. Separadamente, realizou-se o preparo do extrato: adicionando-se 0,5g de MOMHT (c/b) associados a quitosana em 10 mL de meio ausente de células (Figura 11). Em continuidade, o extrato foi mantido em estufa durante o período de 24h.

Figura 10. Materiais utilizados para o preparo do extrato.



Fonte: Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional da USP (LOCT) – FZEA/USP.

Figura 11. Transferência do meio para o tubo (A), extrato pronto para ser incubado em estufa (B).

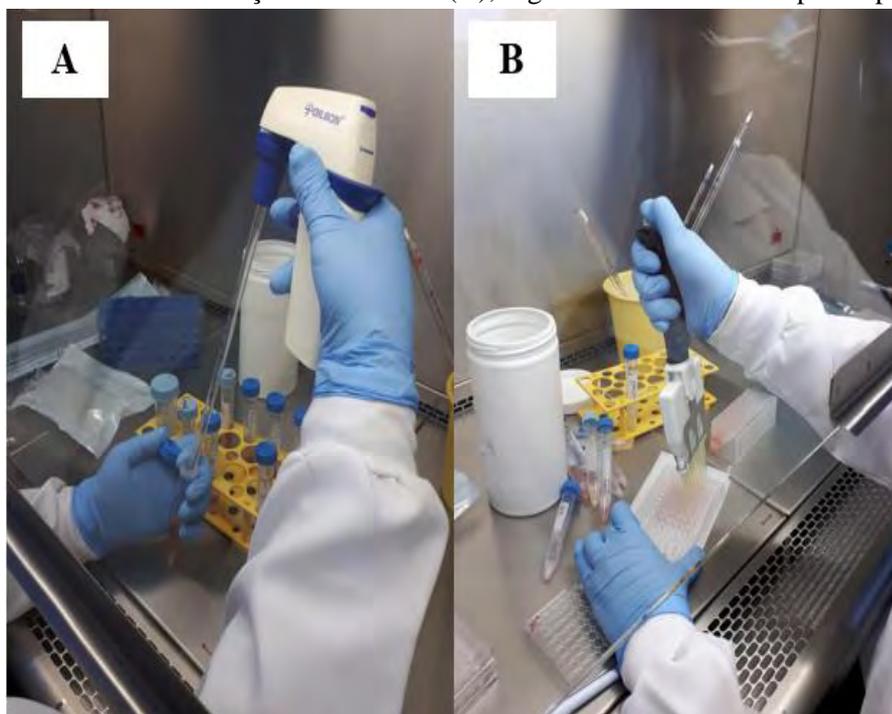


Fonte: Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional da USP (LOCT) – FZEA/USP.

Após o intervalo de tempo desejado, realizou-se a diluição do extrato totalizando 10 mL de solução, sendo 5 mL de meio sem a presença de células e 5 mL do extrato preparado no dia anterior. Com esse procedimento, preparou-se a diluição em 100%, ou seja, a amostra mais concentrada. A partir dessa porção, retirou-se 5 mL da concentração e acrescentou mais 5 mL de meio, determinando a diluição em 50%. Posteriormente, recolheu-se 3 mL dessa mesma solução e adicionou mais 5 mL de meio, formando a diluição de 25%. O procedimento foi repetido mais uma vez para a formação da diluição de 12,5 % (Figura 11 e 13).

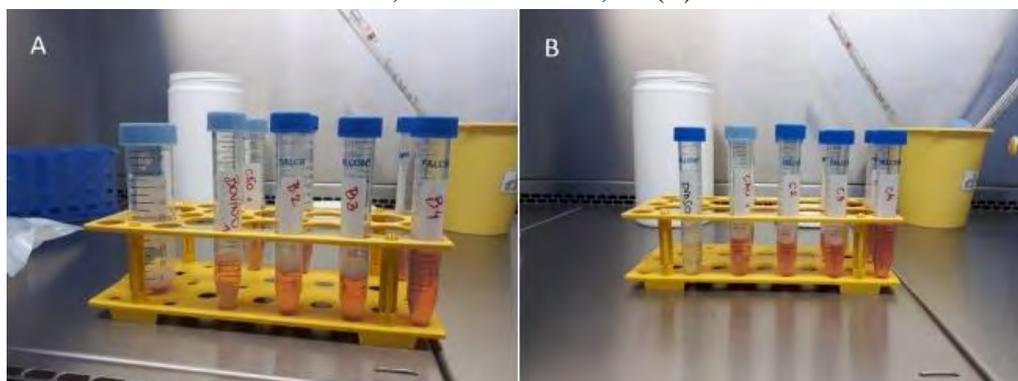
Assim, preparou-se amostras 100%, 50%, 25% e 12,5%, respectivamente. Em seguida, as diluições foram transferidas para as fileiras desejadas com o uso de uma pipeta multicanal, como descritas abaixo e identificadas na placa de 96 poços.

Figura 12. Processo de diluição dos extratos (A), seguido de transferencia para a placa (B).



Fonte: Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional da USP (LOCT) – FZEA/USP.

Figura 13. Diluições dos compósitos de MOMHTb associados a quitosana: B1 -100%; B2-50%; B3-25% B4- 12,5% (A). Diluições dos compósitos de MOMHTc associados a quitosana: C1 -100%; C2-50%; C3- 25% C4- 12,5% (B).



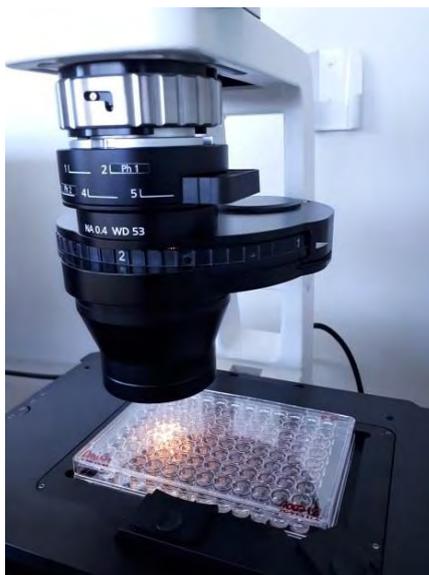
Fonte: Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional da USP (LOCT) – FZEA/USP.

Preparo da placa de 96 poços com fundo chato

Foram preparadas 3 placas de 96 poços com fundo chato no total. A disposição dos componentes nos poços foi a seguinte: na primeira fileira foi utilizado apenas o meio de cultivo ausente de células, para que no processo de análise de dados, fosse descontado os valores discrepantes a fim de haver alteração dos demais resultados, com posterior meio contendo célula (segunda fileira). O controle negativo, conforme a ordem, na terceira fileira, foi utilizado polietileno. Da 4ª a 7ª fileira, foram incorporados os extratos relacionados aos compósitos de MOMHTc associados a quitosana sendo respectivamente, 12,5% (B4); 25% (B3); 50% (B2) e 100% (B1). Nas demais fileiras da placa (8ª até a 11ª) foram adicionados os extratos referentes aos compósitos de MOMHTb associados a quitosana, sendo respectivamente: 12,5% (C4); 25% (C3); 50% (C2) e 100% (C1). O controle positivo para o teste foi estabelecido com a utilização de DMSO na proporção de 2:1 (DMSO: meio junto ao cultivo celular), que foi transferido para a 12ª fileira da placa.

A placa foi mantida novamente em estufa por 24 horas a 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO₂. Após esse período em estufa umidificada, foi avaliada a viabilidade celular em microscópio (Figura 14).

Figura 14. Análise da viabilidade celular ao microscópio.

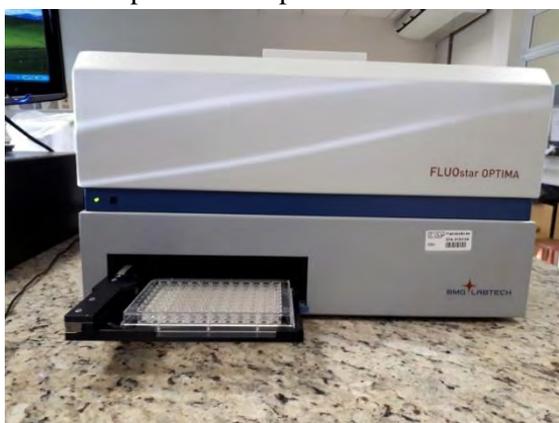


Fonte: Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional da USP (LOCT) – FZEA/USP.

Ato contínuo, realizou-se a pesagem do MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-tetrazólio, diluindo-se na concentração de 5mg/mL. O meio foi retirado da placa e em seguida a solução de MTT foi adicionada em todos os poços, mantendo a placa por 2 horas em estufa.

Após o período, o meio foi retirado das placas. Ao final do teste, foi acrescentado 100 μ L de álcool isopropílico (0,4 M HCl), homogeneizando o conteúdo. A leitura do teste foi feita em um leitor de microplacas multimodo (**FLUOstar OPTIMA**), utilizando-se a absorbância como método de eleição (Figura 15).

Figura 15. Leitura das placas em espectrofotômetro FLUOstar OPTIMA.



Fonte: Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD/ZMV) – FZEA/USP.

4.3 INTERVENÇÃO CIRÚRGICA

Foram utilizados doze coelhos, da ordem *Lagomorpha*, gênero *Oryctolagus*, espécie *Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia, variedade branco, machos ou fêmeas, quatro meses de idade, pesando entre 3 e 4 kg, divididos em quatro Grupos Experimentais: E1 (30 dias, n=3), E2 (60 dias, n=3), E3 (90 dias, n=3) e E4 (120 dias, n=3), que tiveram as falhas ósseas de tibiais direitas e esquerdas preenchidas com compósitos e avaliadas no pós-operatório imediato e aos 30, 60, 90 e 120 dias.

Todos os coelhos receberam como medicação pré-anestésica 50 µg/kg de dexmedetomidina¹, por via intramuscular. Decorridos 15 minutos, foram realizadas tricotomias da orelha para cateterização da veia auricular e das metáfises mediais das tíbias direitas e esquerdas.

A indução anestésica foi realizada com 2 mg/kg de propofol² via intravenosa e, após isso, os animais foram posicionados em decúbito esternal com os membros pélvicos retrofletidos para a realização de punção do espaço epidural lombossacro (L6/L7-S1) com o uso de cateter 24G e posteriormente administração de 0,25 mL/kg de lidocaína³ 2%. Decorridos cinco minutos da realização do bloqueio locorreional, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma calha cirúrgica de inox. Todos os pacientes receberam fluxo constante de 200 mL/kg/minuto de oxigênio 100% via sistema avalvular e máscara facial durante todo o procedimento anestésico.

Os animais foram monitorados a cada cinco minutos até o fim do procedimento cirúrgico (Life Window light LW8, – Digicare, Rio de Janeiro). A frequência e ritmo cardíaco foram avaliados por meio da interpretação da derivação 2 (D2) do eletrocardiograma. A saturação periférica de oxihemoglobina (SpO₂) foi mensurada por um sensor posicionado no coxim palmar do animal. A pressão arterial (PA) foi mensurada de forma não invasiva, por meio da colocação de manguitos oclusivos sob a artéria braquial. A frequência respiratória (f_R) foi determinada por meio da visualização do gradil costal do animal e a temperatura foi monitorada de forma contínua, por meio do posicionamento de um termômetro no orifício anal.

Após serem posicionados em decúbito dorsal em calha cirúrgica, realizada antisepsia com iodo-álcool-iodo, as áreas cirúrgicas foram protegidas com panos de campos esterilizados descartáveis e de contato (Tegaderm). Com uso de lâmina de bisturi n°23, criou-se incisão

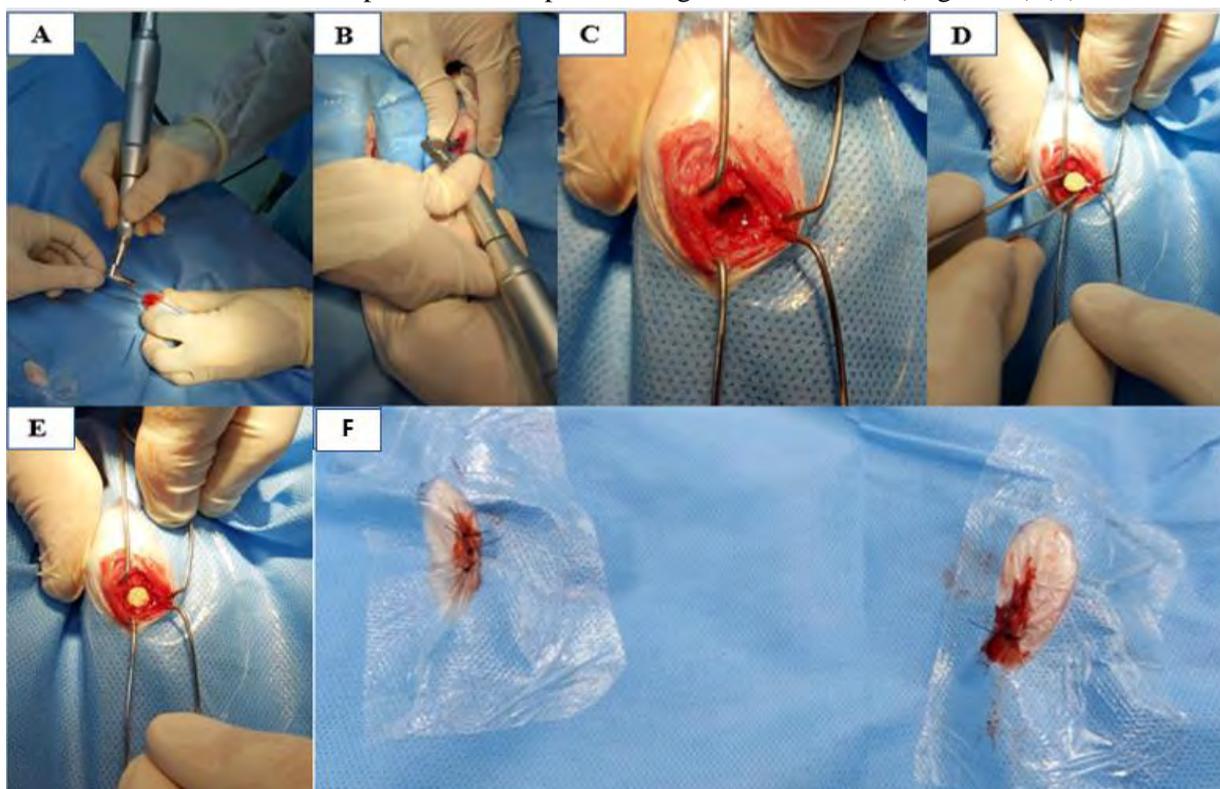
¹ Dexdomitor®, Zoetis, São Paulo, São Paulo, Brasil.

² Propovan®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil.

³ Xylestesin®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil.

cutânea (aproximadamente 3,0 cm), dissecação do tecido subcutâneo, incisão sobre o periósteo e exposição do córtex da metáfise medial proximal de tibia. Com uso de broca trefina de 6mm de diâmetro acoplada ao motor elétrico odontológico de baixa rotação (Omega III), criaram-se falhas ósseas nas tíbias com aproximadamente 5mm de distancia da articulação fêmuro tíbio patelar. Ato contínuo, os defeitos ósseos de tíbias direitas e esquerdas dos animais dos Grupos E1, E2, E3 e E4 foram, respectivamente, preenchidas com compósitos constituídos de MOMHTc e MOMHTb, o periósteo e o tecido subcutâneo aproximados com poliglactina 9104(4-0) e a pele aposicionada com poliamida (4-0) (Figura 16).

Figura 16. Procedimento cirúrgico realizados nos animais experimentais - realização da incisão cutânea e exposição da cortical óssea seguida de realização da falha óssea com broca trefina (A e B), falha óssea na tíbia (C), implantação do compósito constituído de MOHT (c/b) na falha óssea e aposição correta do biomaterial no leito receptor (D e E) e aposição dos tecidos moles, podendo ser observadas áreas operatórias com panos cirúrgicos e de contato (Tegaderm) (F).



Fonte: Unidade Didático Clínico Hospitalar – UDCH e Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

⁴ Vicryl®, Johnson & Johnson, Vila olímpia, São Paulo.

No pós-operatório cada animal recebeu cinco aplicações, com intervalo de 24h, de enrofloxacin⁵ (10mg/kg), via subcutânea; três aplicações, com intervalo de 24h, de meloxicam⁶ (0,2mg/kg), via subcutânea; seis aplicações, com intervalo 12h, de cloridrato de tramadol⁷ (4mg/kg), via subcutânea, e bandagem com intervalo de 24h, com rifamicina, por dez dias consecutivos.

Imediatamente após a intervenção cirúrgica e implantação dos compósitos, o grupo experimental foi submetido ao estudo radiográfico da região proximal de tibia esquerda, constituída de MOMHTb e direita constituída de MOMHTc, para valiação do posicionamento correto do implante e posterior acompanhamento.

Os estudos radiográficos aconteceram na unidade didático clínico hospitalar – UDCH no setor de diagnóstico por imagem. As regiões implantadas das tíbias dos coelhos, com uso de equipamento digital, foram radiografadas (1,25 mA, 0,04s e 46 kV), os animais foram posicionados em decúbito lateral e as radiografias foram feitas em posição mediolateral com estresse, ou seja, flexão do tarso para melhor angulação e visibilização do implante. Os exames foram repetidos em um intervalo de 30 dias E1, n-3, 60 dias E2, n-3, 90 dias E3, n-3 e 120 dias E4, n-3.

4.4 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS EM BIOTÉRIO

Os animais foram alojados em células individuais de Racks Ventiladas para coelhos (Rabbitat, Alesko, Monte Mor, SP) (Figura 17), alimentados com ração comercial para coelho e água *ad libitum*, e avaliados diariamente em relação ao apoio dos membros e aumento de volume da região cirúrgica.

⁵ Chemitril®, Chemitec, Ipiranga, São Paulo, Brasil.

⁶ Maxican®, Ourofino, Cravinhos, São Paulo, Brasil.

⁷ Tramal®, Pfizer, Itapevi, São Paulo, Brasil.

Figura 17. Grupo experimental alocado em célula de Rack ventilada no biotério da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) (A), rack ventilada contemplando 6 células (B), animais com alimentação e água ad libitum (C).



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) e Biotério do Departamento de Ciências Básicas (ZAB) – FZEA/USP.

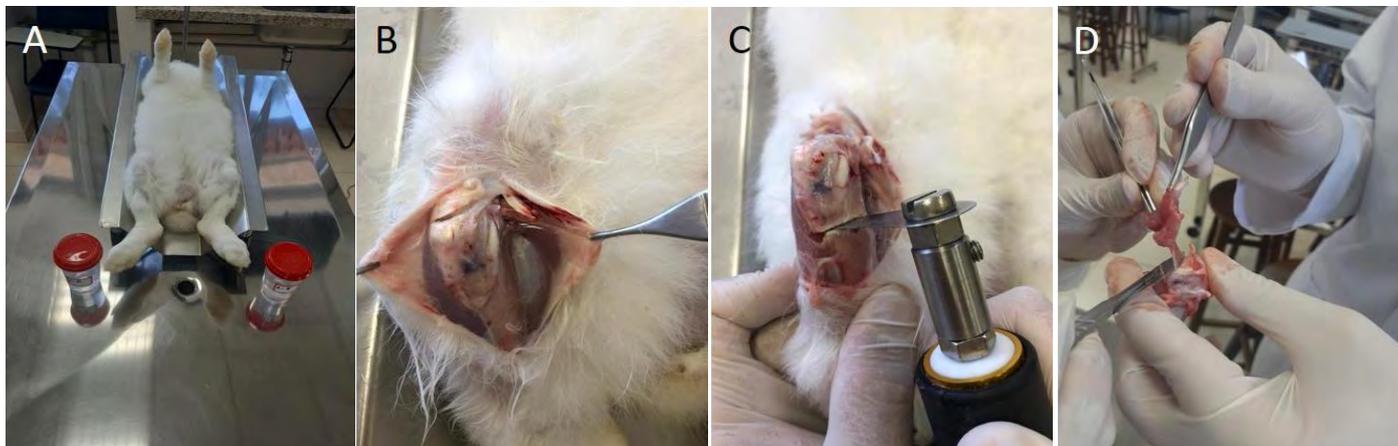
4.5 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E COLETA DAS AMOSTRAS DE TÍBIAS IMPLANTADAS

Ao final de cada período de avaliação, todos os animais foram submetidos à eutanásia ativa, com uso do protocolo anestésico ora descrito, seguido de parada cárdio-respiratória com o uso de propofol e cloreto de potássio a 10%, por via intravenosa (veia auricular).

As regiões implantadas das tíbias direita e esquerda, foram macroscopicamente avaliadas e, após remoção dos tecidos moles adjacentes, coletadas e fixadas em formol tamponado a 10%, por 48h e em álcool 70%.

De cada tíbia operada coletada, foi removido um segmento ósseo de aproximadamente (10mm de comprimento por 10mm de largura) envolvendo o leito receptor e o compósito, com o uso de um disco diamantado dupla-face em cortadora de precisão, sob irrigação (Figura 18).

Figura 18. Procedimento de avaliação e coleta de material - Coelho posicionado em calha para avaliação e coleta de material (A), avaliação macroscópica da região proximal da tíbia que foi implantada (B), osteotomia do segmento ósseo da tíbia com serra óssea oscilatória (C) e remoção de tecidos moles do tecido ósseo coletado (D).

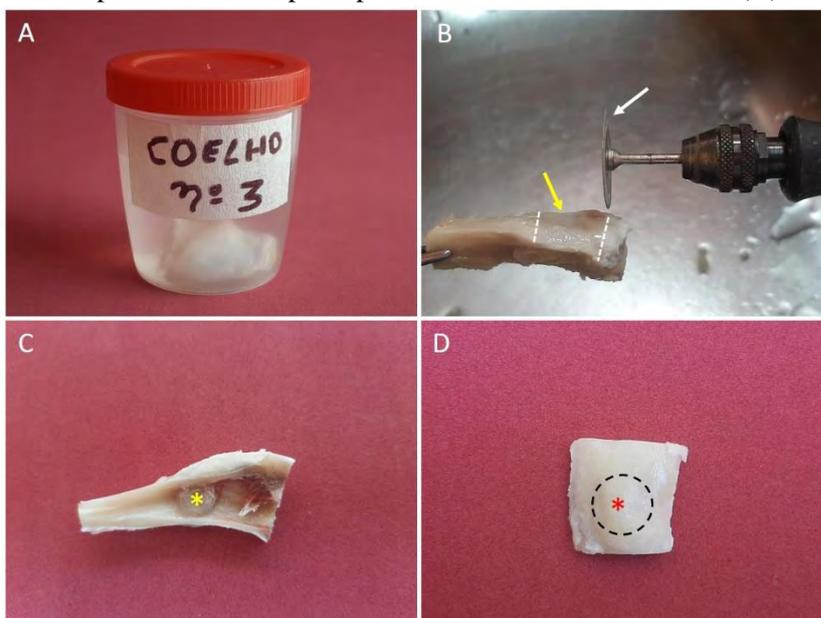


Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE TÍBIAS IMPLANTADAS COM MOMHT (c/b) E QUITOSANA

Após período de fixação, de cada tíbia coletada, foi removido um segmento ósseo de aproximadamente (10mm de comprimento por 10mm de largura) envolvendo o leito receptor e o compósito, com o uso de um disco diamantado dupla-face conectado em uma micro-retífica (Dremel 400), sob irrigação (Figura 19).

Figura 19. Amostra de tíbia de coelho implantada com compósito a base de MOMHT (c/b) e quitosana fixada em formal a 3,7% (A). Obtenção (clivagem) da metáfise proximal implantada (linhas pontilhadas brancas e seta amarela) da tíbia fixada com uso de disco diamantada dupla face (seta branca) conectado em micro-retífica (B). Vista intramedular (endosteal) do leito receptor e compósito após osteotomia longitudinal – asterisco amarelo (C) e vista medial (periosteal) do leito receptor e compósito – círculo preto pontilhado e asterisco vermelho (D).



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

As amostras clivadas foram desidratadas em solução crescente de álcoois: 24 horas em álcool 70% e uma hora em agitador linear (LGI-SK-L330, Laborglas, São Paulo) (Figura 20); 24 horas em álcool 80% e uma hora em agitador linear; 24 horas em álcool 99,5% e uma hora em agitador linear e, para concluir o processo de desidratação, a última etapa do processo foi repetida mais uma vez.

Figura 20. Amostras em processo de desidratação acomodadas sobre agitador linear (LGI-SK-L330, Laborglas, São Paulo).



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

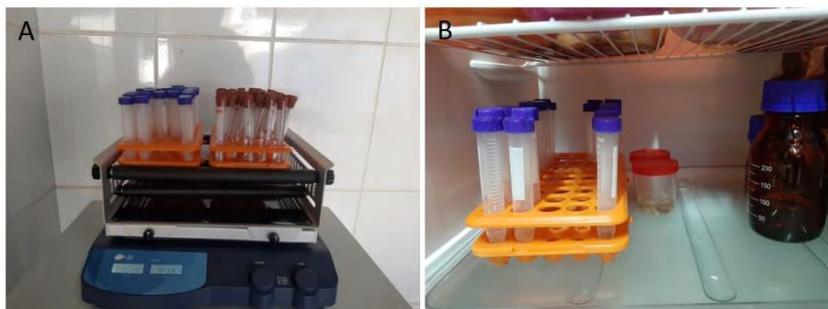
Após acomodadas em tubos Falcon (15 mL) identificados contendo solução de resina acrílica (500 ml) (LR White Hard Grade, London, UK) e peróxido de benzoíla (9,9 g) (London Resin Company Ltd, London, UK), previamente homogênea em agitador magnético (Modelo: SL-92, Marca: Solab, Piracicaba) por 3 horas (Figura 21), as amostras foram submetidas a agitação linear por uma hora e acondicionadas em refrigerador a 4°C por 24 horas (Figura 22).

Figura 21. Resina acrílica (LR White Hard Grade, London, UK) e benzoyl peroxide London Resin Company Ltd) (A) e homogeneizada da solução à base de resina acrílica e peróxido de benzoila em agitador magnético (Modelo: SL-92, Marca: Solab).



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

Figura 22. Infiltração das amostras com resina acrílica LR. Amostras acondicionadas em tubos contendo resina acrílica sobre agitador linear (A) e mantidas em refrigeração (B).



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

Os tubos Falcon contendo as amostras e resina acrílica foram submetidas à pressão de -500 mmHg com uso de estufa a vácuo (Modelo: SL 1004/30, SOLAB, Piracicaba, SP), por uma hora (Figura 23), mantidas pelo mesmo período em agitador linear e acondicionadas em refrigerador a 4°C por 24 horas. Esse processo de infiltração das amostras com resina acrílica foi repetido por 14 dias consecutivos, trocando a resina a cada 24 horas.

Figura 23. Amostras submetidas à pressão negativa de -500 mmHg em estufa a vácuo (Modelo: SL 1004/30, SOLAB, Piracicaba).



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

No décimo quinto dia de infiltração em resina acrílica, as amostras foram removidas dos tubos Falcon e acomodadas em recipientes cilíndricos de polipropileno (formas) contendo resina acrílica LR pura (virgem) em bandeja de aço inoxidável e levadas à estufa a vácuo à 60°C por 4 a 8 horas, até completa termopolimerização (Figura 24).

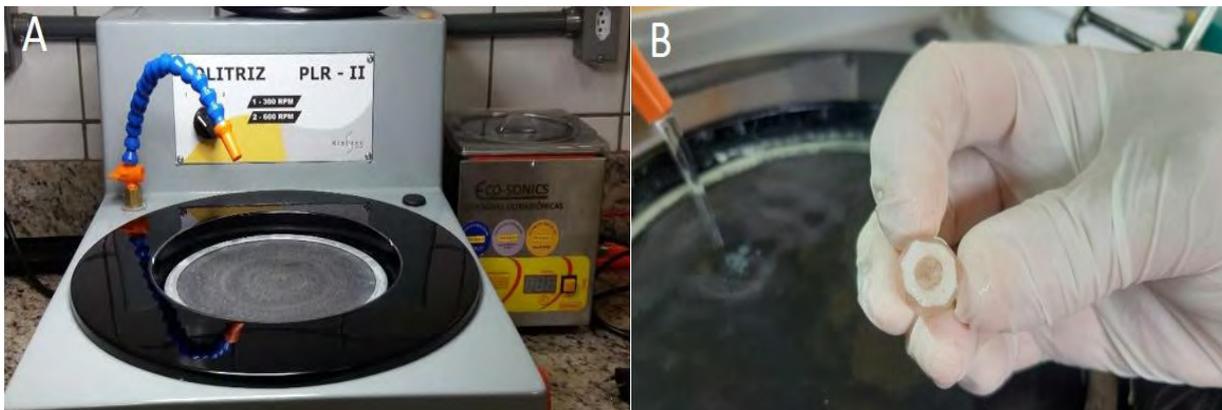
Figura 24. Estufa a vácuo (Modelo: SL 1004/30, SOLAB, Piracicaba, SP) com temperatura de 60°C (A), amostras acomodadas em recipientes cilíndricos de polipropileno (formas) contendo resina acrílica LR pura (virgem) em bandeja de aço inoxidável (B) e amostra emblocada em resina acrílica LR após termopolimerização (C).



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

Duas mostras emblocadas em resina acrílica de cada grupo experimental (E1, E2, E3 e E4) tiveram as irregularidades de suas faces externas (corte sagital), região periosteal, que compreendem o leito receptor e o compósito, aplainadas/lixadas, com o uso de lixas d'água (nº 400 a 4000) acopladas à politriz/lixadeira metalográfica (Modelo: PLR – II, São Paulo), sob irrigação, até atingir uma superfície plana e polida (Figura 25).

Figura 25. Politriz metalográfica (Modelo: PLR – II, São Paulo) utilizada para lixar e polir amostras emblocadas em resina acrílica (A) e superfície de análise da amostra polida (corte sagital) (B).

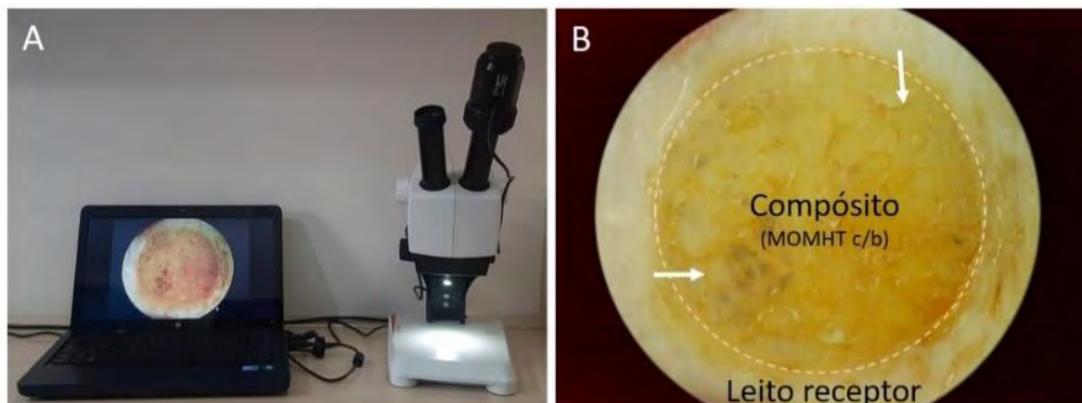


Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

Uma amostra emblocada de cada grupo experimental (E1, E2, E3 e E4) foi transversalmente seccionada sobre o ponto médio do compósito, com o uso de um disco diamantado dupla-face conectado em uma micro-retífica. Para remover as irregularidades dos segmentos previamente seccionados (corte transversal), as suas superfícies, leito receptor-compósito-leito receptor, foram utilizados os mesmos procedimentos acima citado.

Para certificar se o lixamento e o polimento da superfície de análise da amostra emblocada em resina acrílica ocorreu no local exato, foi utilizado o estereomicroscópio (Ez4 – Leica) (Figura 26).

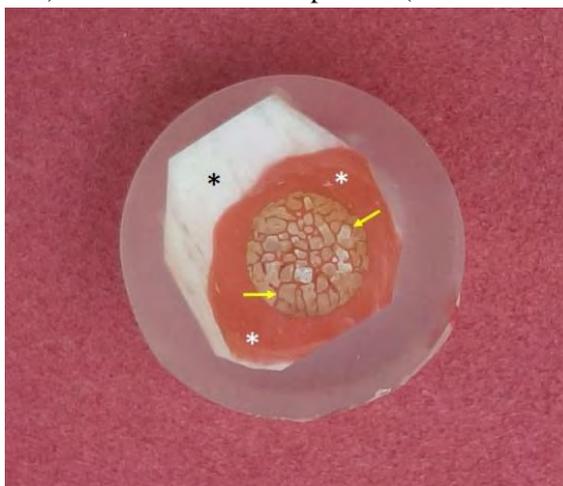
Figura 26. Checagem da superfície da amostra emblocada com resina acrílica (corte sagital) com uso do sistema de captura de imagem (câmera para microscópio USB de autofoco de 8mp Mod. NO294) acoplado ao estereomicroscópio (Ez4 – Leica) (A). Observar compósito a base de MOMHT(c/b) e quitosana em leito receptor de tibia de coelho. Observar trabéculas ósseas - setas brancas (B). (Aumento de 20X).



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

As estruturas ósseas presentes na superfície de análise da amostra emblocada com resina acrílica, após aplicação de técnica de coloração específica com uso de alizarina red (coloração vermelha), foram macroscopicamente avaliadas (Figura 27).

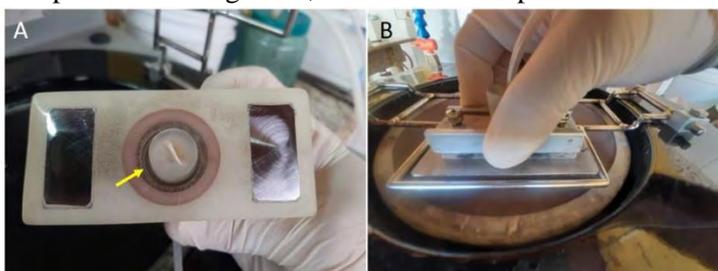
Figura 27. Superfície de mostra polida de leito receptor de tíbia de coelho (asteriscos preto e brancos) e compósito constituído de MOMHT(c/b) corada com Alizarina red (corte sagital). Observar leito receptor (asteriscos brancos) e trabéculas dos compósitos (setas amarelas) coradas em vermelho.



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

Após concluído o polimento, as amostras emblocadas em resina acrílica foram acomodadas e mantidas na superfície de desbaste de uma base padronizadora com auxílio de sistema de vácuo. Em continuidade a base foi posicionada em um suporte próprio de aço inoxidável fixado sobre uma politriz metalográfica. Após ser acionada (300 RPM) e com uso de lixa d'água 400 sob irrigação com água, não só as alturas das amostras foram padronizadas, mas também as superfícies se mantiveram paralelas (Figura 28).

Figura 28. Amostra emblocada em resina acrílica acomodada na superfície de desbaste da base padronizadora – seta amarela (A) e base padronizadora posicionada no suporte de aço inoxidável fixado sobre uma politriz metalográfica, em contato com prato contendo lixa d'água (B).



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

Após concluir o polimento da superfície de análise, padronizar altura e manter as superfícies paralelas, as amostras foram analisadas em MEV/EDS (Figura 29).

Figura 29. Amostra contendo leito receptor de tíbia de coelho e compósito constituído de MOMHT(c/b) emblocada em resina acrílica preparada para análise em MEV/EDS.



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

As amostras processadas foram analisadas no laboratório (Plano de Gestão de Uso, Microscopia eletrônica de varredura-MEV, equipamento multiusuário (EMU), Departamento de Zootecnia (ZAB), da FZEA da USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga/SP), para análise pela MEV e EDS.

As amostras de cada grupo experimental foram fixadas em porta amostra “stub” com fita adesiva condutora de carbono e analisadas pela MEV, sob tensão de aceleração de 15Kv, baixo vácuo (modelo TM3000, HITACHI, Japão), modo composicional. Para o mapeamento dos elementos químicos por EDS das amostras, as imagens foram capturadas pelo software anexado ao microscópio, no formato TIF para Windows (Figura 30).

Figura 30. Microscópio eletrônico de varredura (MEV) utilizado para análise das amostras. (Modelo TM3000, HITACHI – Japão).



Fonte: Plano de gestão de uso, Microscopia eletrônica de varredura-MEV, equipamento multiusuário (EMU), ZAZ – FZEA/USP.

5. RESULTADOS

5.1 CITOTOXICIDADE DOS COMPÓSITOS

A análise de viabilidade celular de diferentes concentrações de extratos obtidas dos compósitos à base de MOMHT(c/b) e quitosana, demonstrou que quanto maior for a diluição, menor será o efeito citotóxico do biomaterial. Extratos de MOMHTc e quitosana a 12,5 e 100% apresentaram viabilidades celulares de 48 e 38%, respectivamente. Já os extratos de MOMHTb e quitosana a 12,5 e 100%, as viabilidades celulares foram de 60 e 51%, respectivamente (Tabela 1 e Figuras 31 e 32).

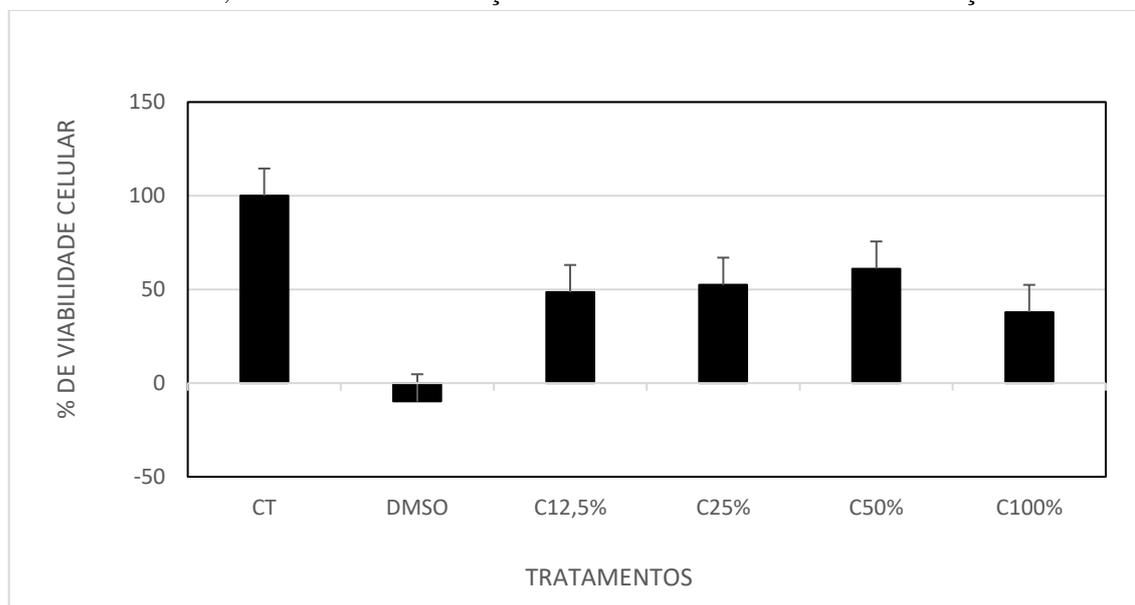
Confrontando a viabilidade celular do grupo controle positivo (DMSO) com a do grupo controle negativo (CT), notou-se diferença expressiva ($p < 0,05$). Comparando o grupo DMSO com extratos de compósitos a base de MOMHTb e quitosana em diferentes concentrações (C4: 12,5%, C3: 25%, C2: 50% e C1: 100%), observou-se que, mesmo não ocorrendo de forma linear, a maior diferença ocorreu entre o grupo DMSO e o grupo C4 ($p < 0,05$). Esse comportamento, de forma mais intensa, foi observado com as diferentes concentrações obtidas de extratos de compósitos constituídos de MOMHTc e quitosana (B4: 12,5%, B3: 25%, B2: 75% e B1: 100%), quando comparando com os extratos obtidos da MOMHTb e quitosana (Tabela 1 e Figuras 31 e 32).

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão (dp) obtidos a partir dos testes de citotoxicidade de extratos de amostras dos compósitos constituídos de MOMHT(c/b) associadas à quitosana em diferentes diluições.

Concentração Extrato	Percentagem de Viabilidade Celular \pm dp			
	Controle (CT)	Controle Positivo (DMSO)	MOMHTc quitosana	MOMHTb quitosana
12.5	-	-	48 \pm 21	60 \pm 10
25	-	-	52 \pm 25	64 \pm 4.1
50	-	-	61 \pm 11	62 \pm 13
100	100 \pm 22	-35 \pm 13	38 \pm 2.7	51 \pm 6.0

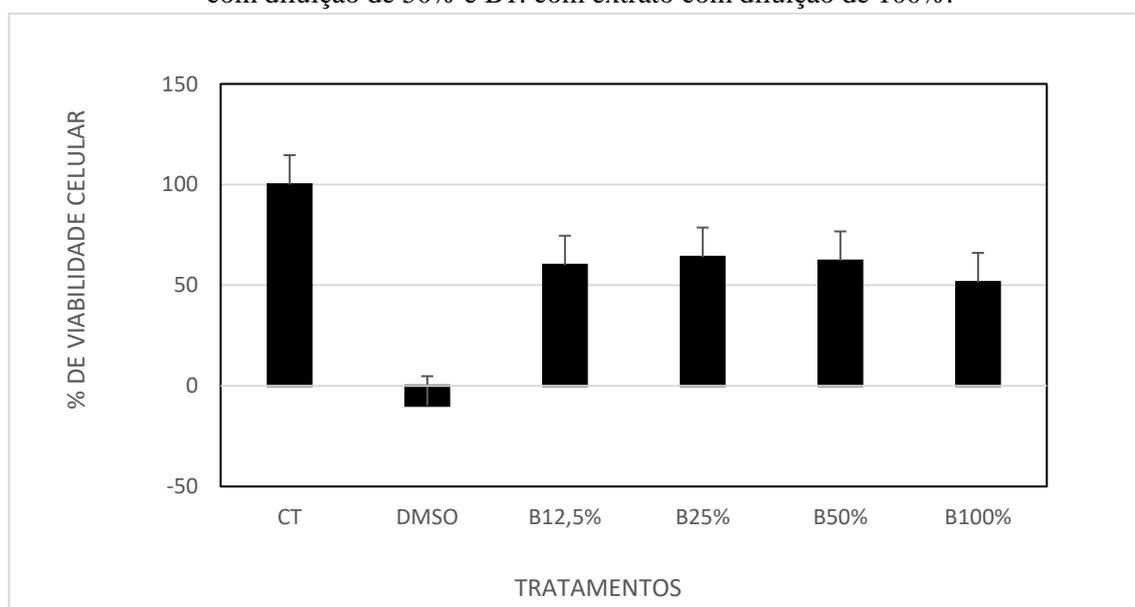
Fonte: Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT): ZMV/FZEA/USP.

Figura 31. Viabilidade celular (Média \pm Desvio Padrão) das diferentes diluições dos extratos obtidos dos compósitos constituídos de MOMHTc associados a quitosana. CT: controle negativo, DMSO: controle positivo, C4: extrato com diluição de 12,5%, C3: extrato com diluição de 25%, C2: extrato com diluição de 50% e C1: com extrato com diluição de 100%.



Fonte: Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT): ZMV/FZEA/USP.

Figura 32. Viabilidade celular (Média \pm Desvio Padrão) das diferentes diluições dos extratos obtidos dos compósitos constituídos de MOMHTb associados a quitosana. CT: controle negativo, DMSO: controle positivo, B4: extrato com diluição de 12,5%, B3: extrato com diluição de 25%, B2: extrato com diluição de 50% e B1: com extrato com diluição de 100%.



Fonte: Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT): ZMV/FZEA/USP.

5.2 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os coelhos, no pós-operatório, mantiveram os membros operados apoiados sobre as bandejas das Racks ventiladas.

As feridas cirúrgicas no décimo segundo dia apresentavam-se com as bordas aposicionadas e celadas, sem sinais de reações que sugerissem infecção.

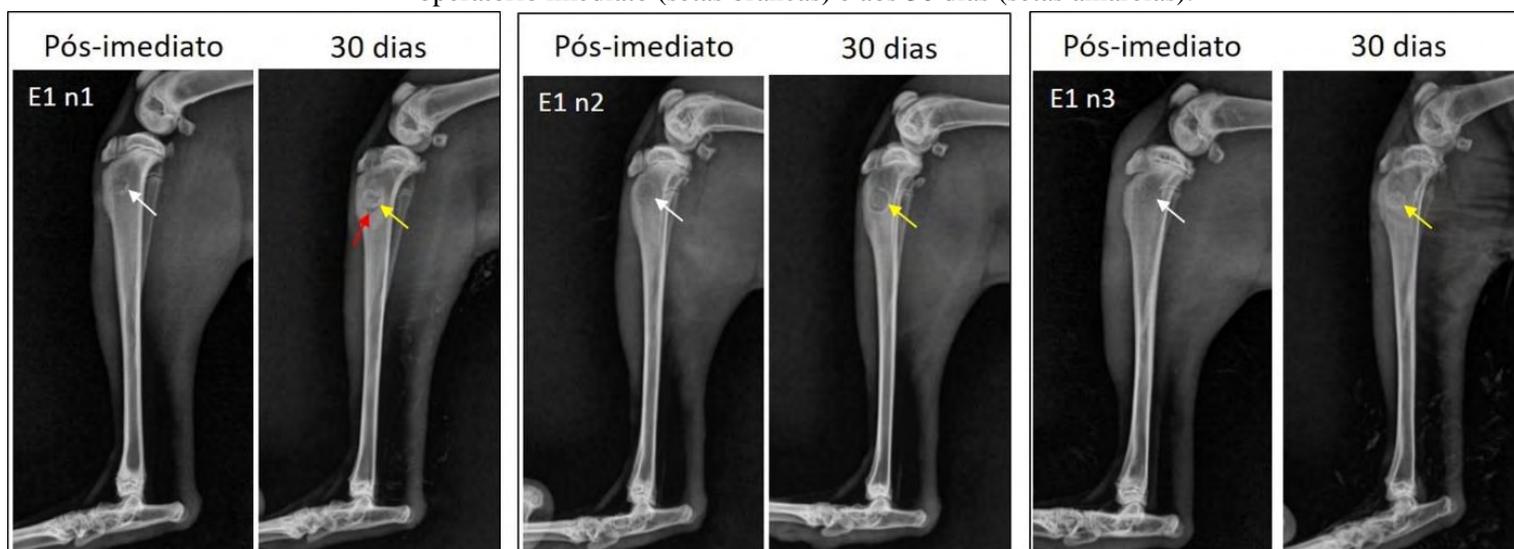
AVALIAÇÕES RADIOGRÁFICAS DIGITAIS DE TÍBIAS DOS COELHOS IMPLANTADAS COM COMPÓSITOS CONSTITUÍDOS DE MOMHT(C/B) E QUITOSANA

Através das radiográficas digitais médio-laterais realizadas nas tíbias dos coelhos no pós-operatório imediato foi demonstrado que todos os compósitos constituídos de MOMHT(c/b) e quitosana implantados encontravam-se acomodados em seus leitos receptores (Figuras 33- 40).

Avaliações radiográficas digitais de tíbias dos coelhos implantadas com compósitos constituídos de MOMHTc e quitosana

Aos 30 dias de pós-operatório os compósitos constituídos de MOMHTc e quitosana já apresentavam variações de densidades nas interfaces com os leitos receptores quando comparados aos dos pós-operatório imediato, demonstrando, com isso, proliferações ósseas detectáveis nas avaliações radiográficas das tíbias implantados dos coelhos (E1, n: 1, 2 e 3). A região circular do leito receptor da tíbia implantada do coelho (E1 n1) apresentou aumento de radiopacidade e com área radiolúcida na região ventral da interface (Figura 33).

Figura 31. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias direitas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTc e quitosana, áreas circulares radiolucentes, no pós-operatório imediato (setas brancas) e aos 30 dias (setas amarelas).

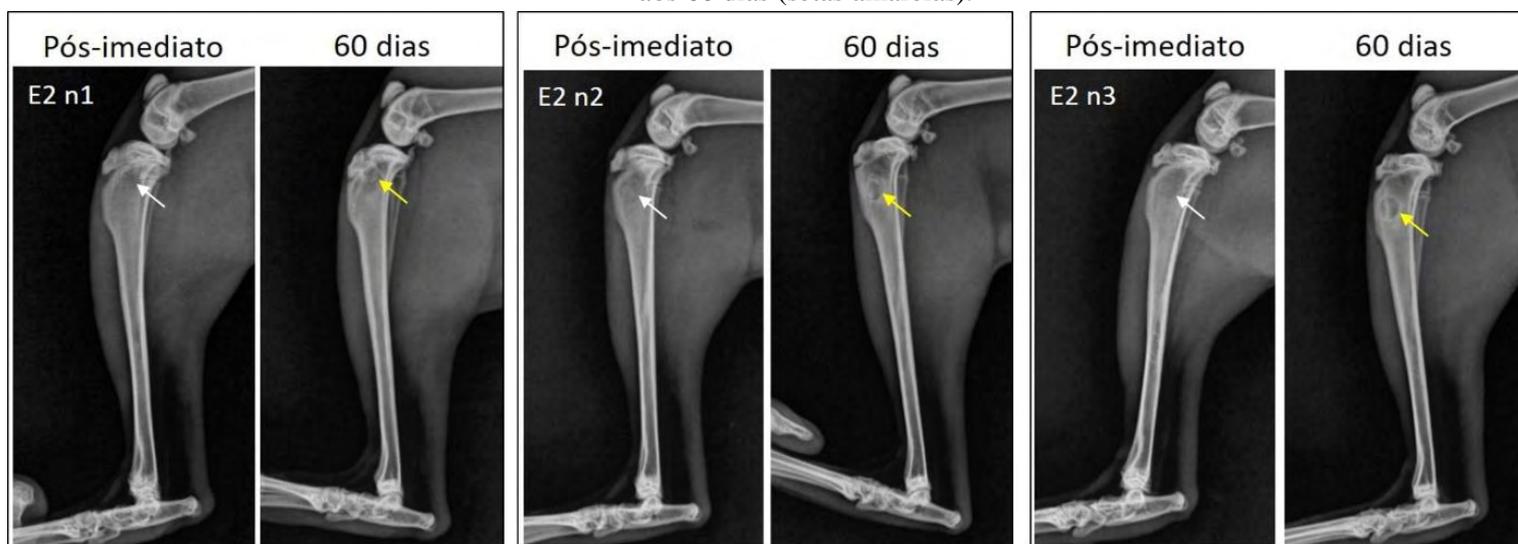


Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP e Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa (CAEP/VCI) – FMVZ/USP.

Observe: áreas radiopacas da MOMHTc e circulares bem definidas envolvendo os compósitos implantados nas tíbias dos coelhos (E1, n: 1, 2 e 3) e área circular radiopaca do leito receptor do animal do coelho (E1n1) e região e região radioluscente ventral à interface (seta vermelha).

Já aos 60 dias, observou-se aumento da radiopacidade nas bordas dos compósitos de MOMHTc e quitosana nas tíbias dos coelhos (E2, n: 1, 2 e 3), provavelmente devido a osse condução e osteogênese nessas regiões, sendo este evento observado com maior intensidade na tíbia do coelho (E2n3) (Figura 34).

Figura 32. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias direitas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTc e quitosana no pós-operatório imediato (setas brancas) e aos 60 dias (setas amarelas).

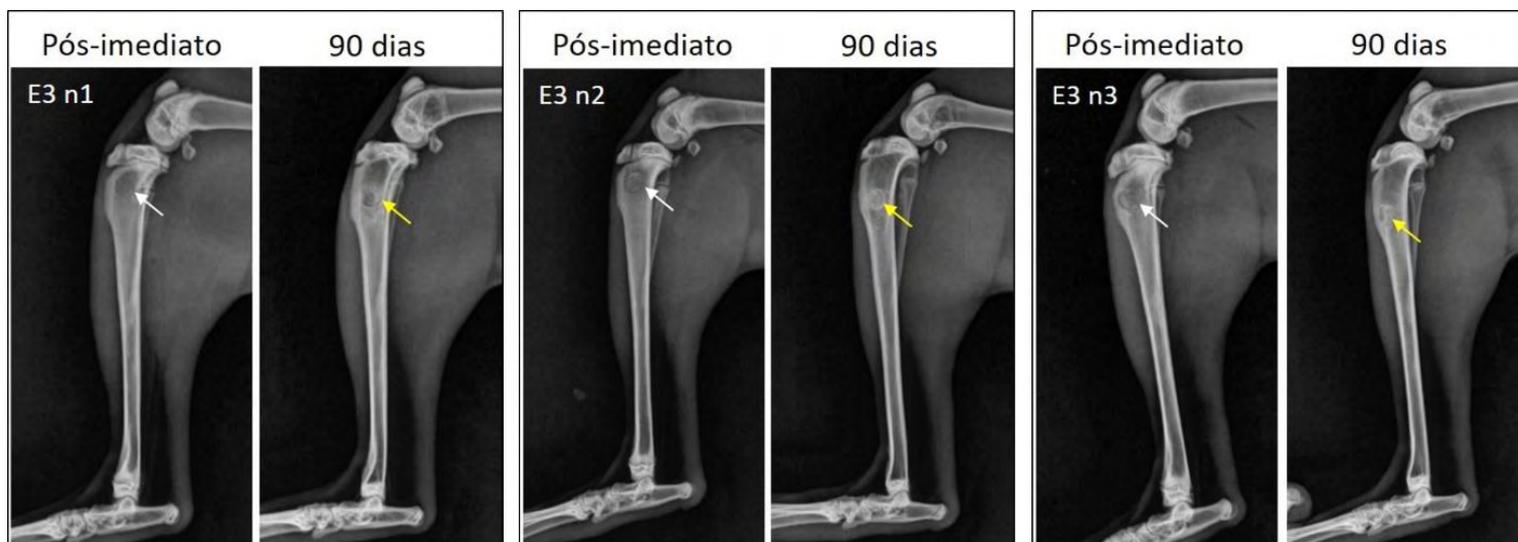


Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP e Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa (CAEP/VCI) – FMVZ/USP.

Observe: áreas radiopacas da MOMHTc e circulares envolvendo os compósitos implantados nas tíbias dos coelhos (E2, n:1, 2 e 3). Observar diferença de densidade entre os compósitos aos 60 dias e tecidos ósseos adjacentes.

Aos 90 dias, observou-se aumento da radiopacidade nas bordas circulares dos compósitos de MOMHTc e quitosana implantados nas tíbias dos coelhos (E3, n: 1, 2 e 3), sendo este evento observado com maior intensidade na interface do leito receptor da tíbia do coelho (E3n1) (Figura 35).

Figura 33. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias direitas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTc e quitosana no pós-operatório imediato (setas brancas) e aos 90 dias (setas amarelas).



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP e Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa (CAEP/VCI) – FMVZ/USP.

Observe: áreas radiopacas da MOMHTc e circulares dos compósitos implantados nas tíbias dos coelhos (E3, n:1, 2 e 3). Observar área circular radiopaca mais intensa envolvendo o compósito implantado na tíbia do coelho (E3n1).

Aos 120 dias de pós-operatório, notou-se que os compósitos constituídos de MOMHTc e quitosana, quando comparados aos 30, 60 e 90 dias, apresentavam-se não só a interface entre o compósito e a tíbia do coelho (E4n1), mas também as superfícies dos compósitos implantados nas tíbias dos coelhos (E4 n2 e 3), bem mais radiopacas que os tecidos ósseos adjacentes (Figura 36).

Figura 34. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias direitas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTc e quitosana no pós-operatório imediato (setas brancas) e aos 120 dias (setas amarelas).



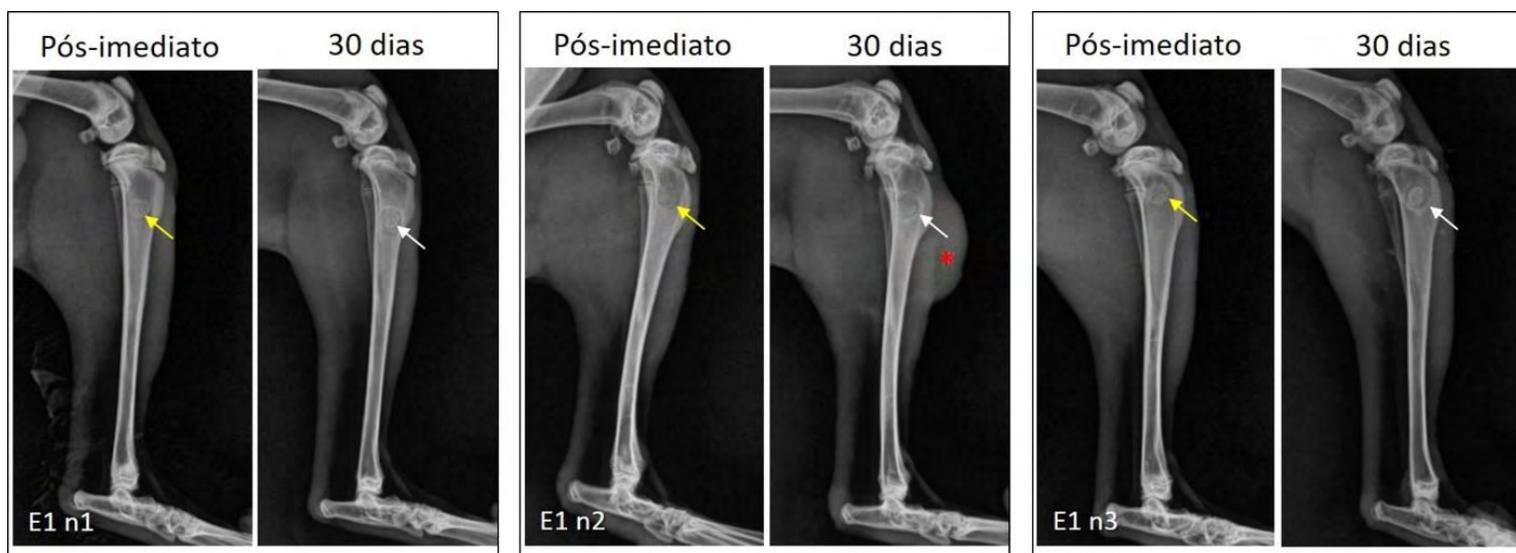
Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP e Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa (CAEP/VCI) – FMVZ/USP.

Observe: regiões correspondentes aos compósitos das tíbias dos coelhos (E4 n2 e 3) são mais radiopacas que os tecidos ósseos adjacentes.

Avaliações radiográficas digitais de tíbias dos coelhos implantadas com compósitos constituídos de MOMHTb e quitosana

No 30º dia de pós-operatório os compósitos constituídos de MOMHTb e quitosana apresentavam variações de densidades nas interfaces com os leitos receptores quando comparado ao pós-operatório imediato, demonstrando, com isso, proliferações ósseas detectáveis nas tomadas radiográficas das tíbias implantadas dos coelhos (E1, n: 1, 2 e 3). Notou-se cranial a crista tibial aumento de tecido mole do coelho (E1n2) e área elíptica radiopaca no leito receptor da tíbia do coelho (E1n3) (Figura 37).

Figura 35. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias esquerdas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTb e quitosana no pós-operatório imediato (setas amarelas) e aos 30 dias (setas brancas).

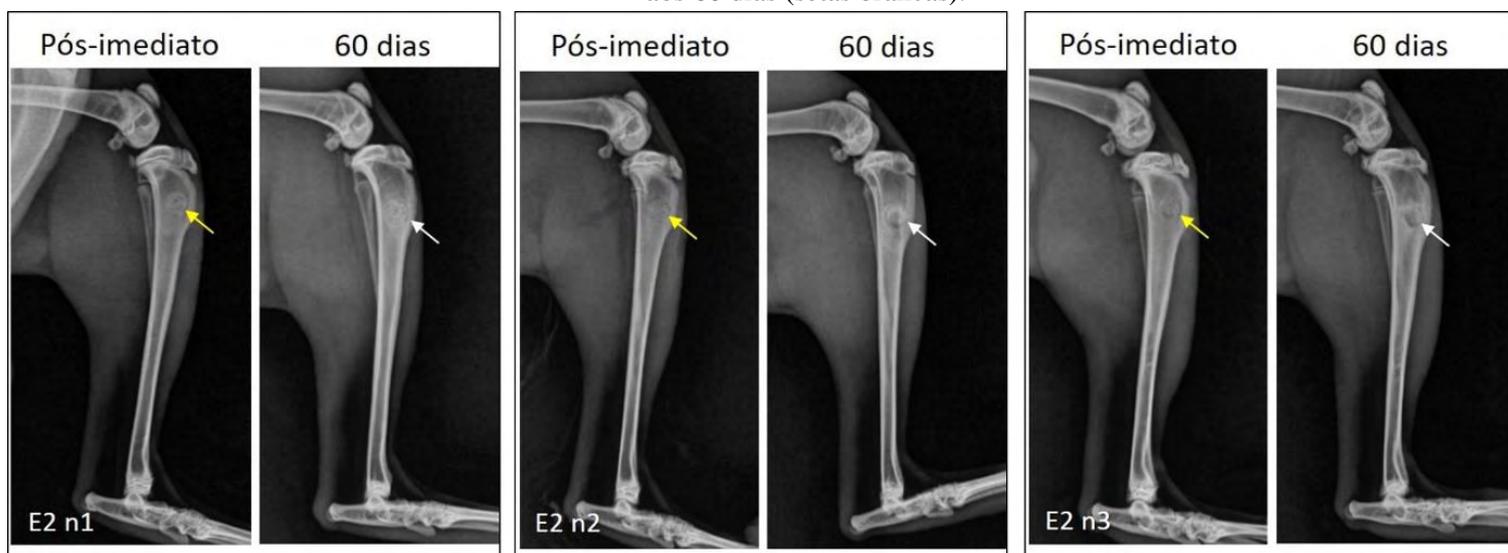


Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP e Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa (CAEP/VCI) – FMVZ/USP.

Observe: áreas radiopacas da MOMHTb e circulares envolvendo os compósitos implantados nas tíbias dos coelhos (E1, n:1, 2 e 3). Observar área circular radiolúcida entre compósito e leito receptor da tibial do coelho (E1n3).

No 60º dia de pós-operatório os compósitos constituídos de MOMHTb e quitosana apresentavam aumento de densidades (áreas radiopacas) nas interfaces com os leitos receptores quando comparado ao pós-operatório imediato, sugerindo proliferações ósseas, detectáveis nas tomadas radiográficas das tíbias implantadas dos coelhos (E2, n: 1, 2 e 3) (Figura 38).

Figura 36. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias esquerdas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTb e quitosana no pós-operatório imediato (setas amarelas) e aos 60 dias (setas brancas).

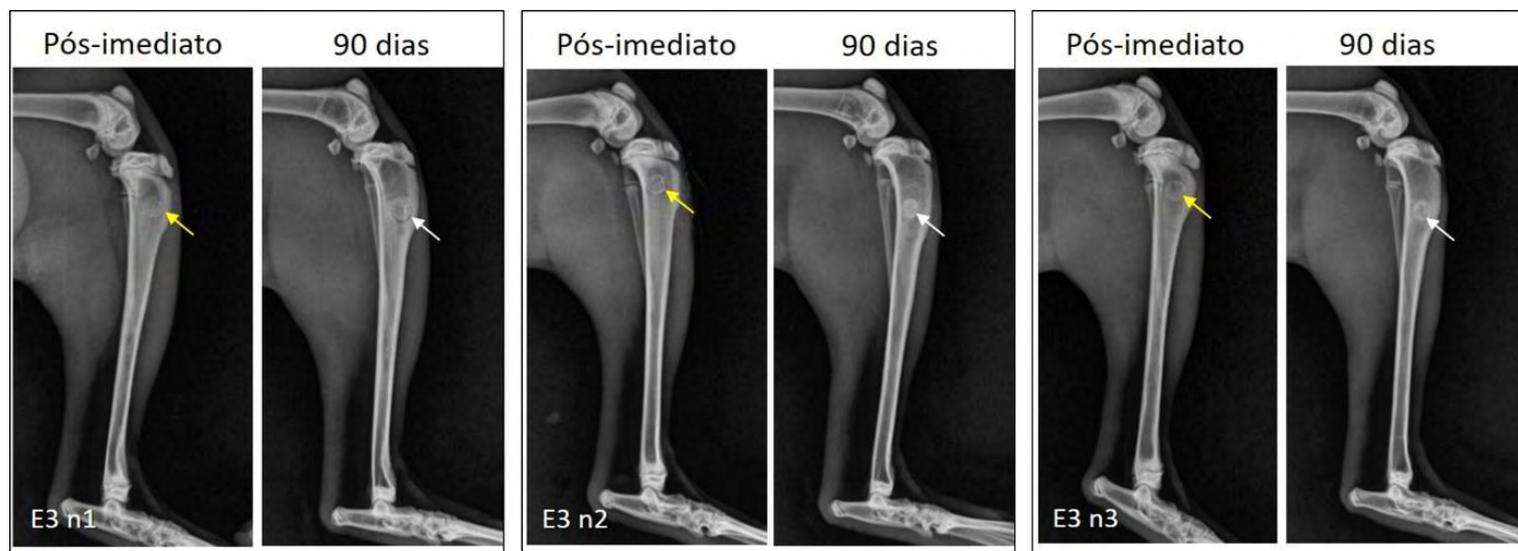


Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP e Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa (CAEP/VCI) – FMVZ/USP.

Observe: áreas radiopacas de MOMHTb e circulares radiopacas envolvendo os compósitos implantados nas tíbias dos coelhos (E2, n:1, 2 e 3) dias. Observar diferença de densidade entre compósito e tecido ósseo adjacente.

No 90° dia de pós-operatório os compósitos constituídos de MOMHTb e quitosana apresentavam as interfaces com os leitos receptores bastante radiopacas quando comparado ao pós-operatório imediato detectáveis nas tomadas radiográficas das tíbias implantadas dos coelhos. Além disso os compósitos no 90° dia também apresentavam bem mais radiopacos em comparação aos compósitos do pós-operatório imediato (E3, n: 1, 2 e 3) (Figura 39).

Figura 37. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias esquerdas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTb e quitosana no pós-operatório imediato (setas amarelas) e aos 90 (setas brancas).

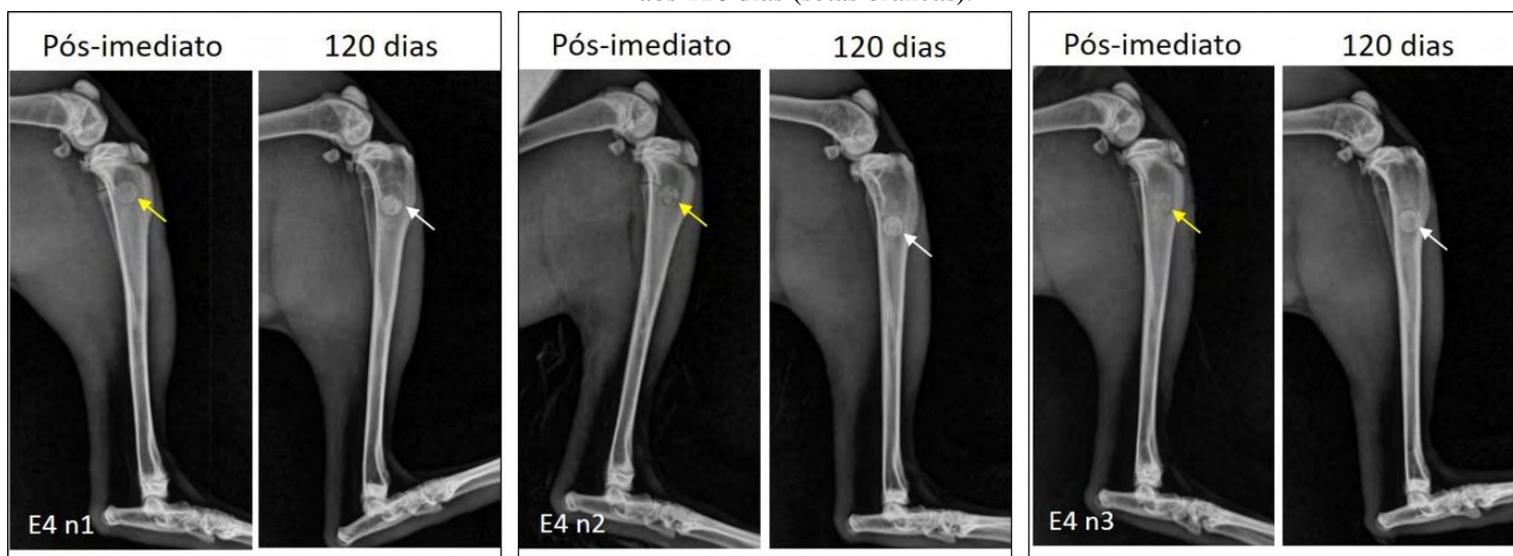


Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP e Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa (CAEP/VCI) – FMVZ/USP.

Observe: áreas radiopacas de MOMHTb e circulares radiopacas bem definidas envolvendo os compósitos implantados nas tíbias dos coelhos (E3, n:1, 2 e 3). Observar que o compósito implantado na tíbia do coelho (E3n2) encontra-se bem mais radiopaco.

No 120º dia de pós-operatório, diferentemente dos compósitos avaliados aos 30, 60 e 90 dias, os compósitos constituídos de MOMHTb e quitosana apresentavam-se bastantes radiopacos quando comparado aos compósitos no pós-operatório imediato e também aos leitoss receptores adjacentes nas avaliações radiográficas das tíbias implantadas dos coelhos (E4, n: 1, 2 e 3) (Figura 40).

Figura 38. Imagem radiográfica na projeção mediolateral de tíbias esquerdas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTb e quitosana no pós-operatório imediato (setas amarelas) e aos 120 dias (setas brancas).



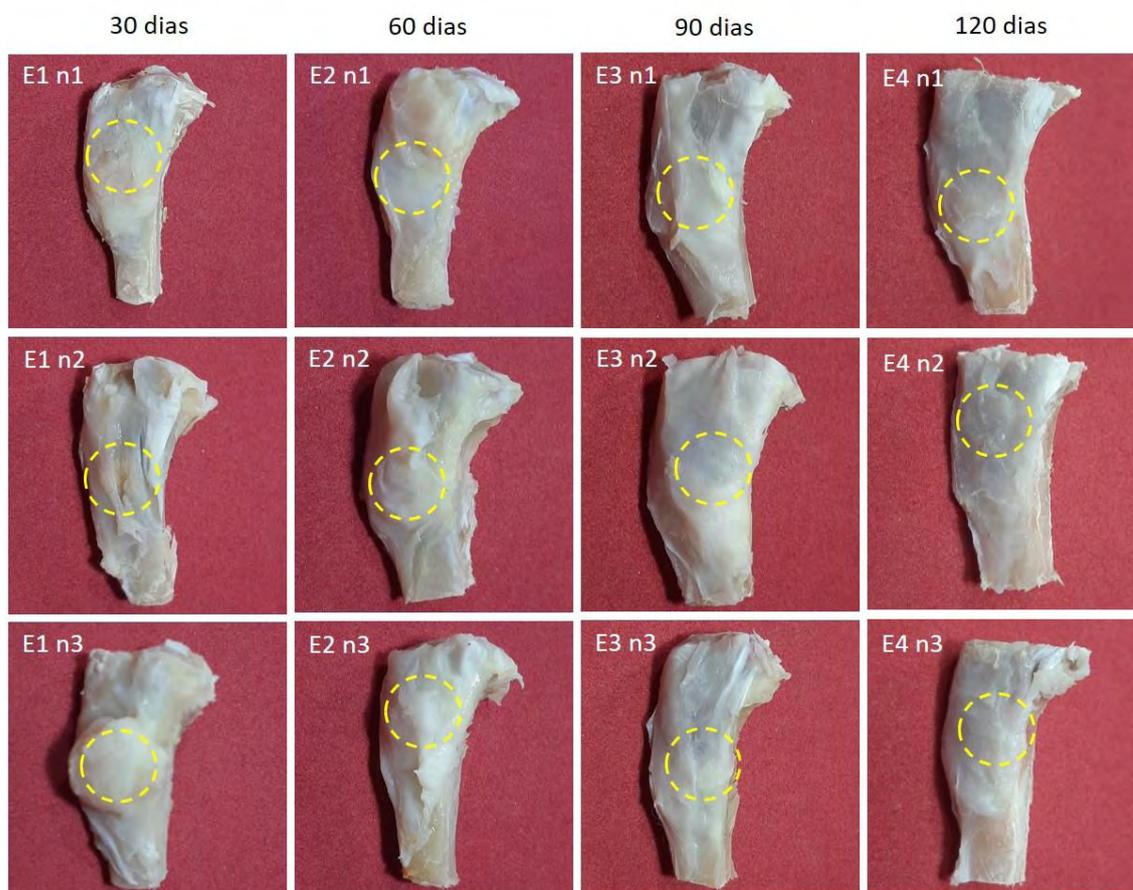
Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP e Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa (CAEP/VCI) – FMVZ/USP.

Observe: os compósitos implantados nas tíbias dos coelhos (E4, n:1, 2 e 3) aos 120 dias apresentavam-se bastantes radiopacos quando comparados aos compósitos implantados no pós-operatório imediato.

AVALIAÇÕES MACROSCÓPICAS DAS METÁFISES PROXIMAIS DE TÍBIAS DOS COELHOS IMPLANTADAS COM COMPÓSITOS CONSTITUÍDOS DE MOMHT (c/b) E QUITOSANA

À avaliação macroscópica das regiões metafisária das tíbias dos coelhos dos grupos E1, E2, E3 e E4, observou-se que dos 12 compósitos constituídos de MOMHTc e quitosana implantados, 11 (92%) encontravam aderidos em seus leitos receptores e sem sinais de reações teciduais e um não estava aderido ao leito receptor (E1n3) (Figura 41).

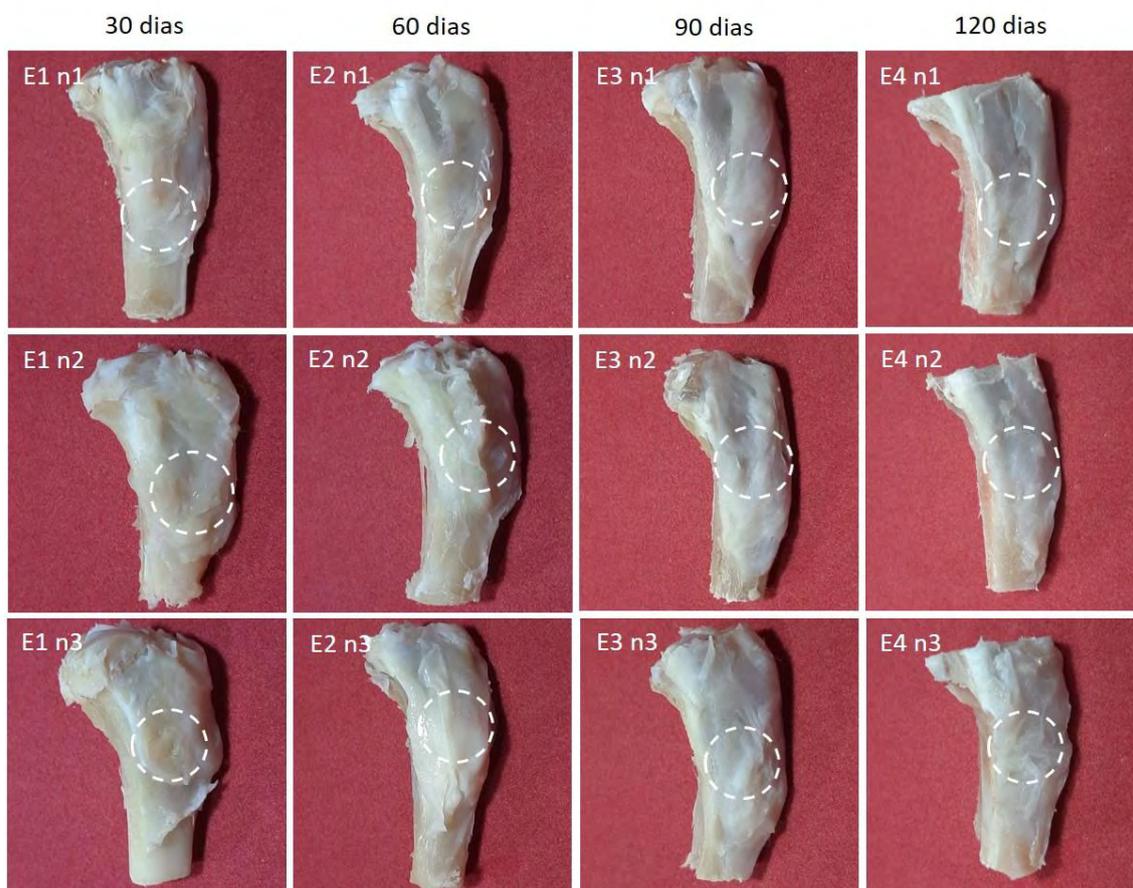
Figura 39. Imagem macroscópica medial do terço proximal de tíbias direitas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTc e quitosana aos 30, 60, 90 e 120 dias (círculos amarelos), após remoção cutânea. Notar aumento de volume sobre o leito receptor do coelho (E1n3).



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

À avaliação macroscópica das regiões metafisária das tíbias dos coelhos dos grupos E1, E2, E3 e E4, observou-se os 12 (100%) compósitos constituídos de MOMHTb e quitosana encontravam-se aderidos em seus leitos receptores e sem sinais de reações teciduais (Figura 42).

Figura 40. Imagem macroscópica medial do terço proximal de tíbias esquerdas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTb e quitosana aos 30, 60, 90 e 120 dias (círculos brancos), após remoção cutânea.



Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

AVALIAÇÕES PELA MEV/EDS DAS INTERFACES ENTRE COMPÓSITOS CONSTITUÍDOS DE MOMHTc E QUITOSANA E TÍBIAS DOS COELHOS

Com auxílio de análise pela MEV, modo composicional, também em plano único, observou-se que dos 12 (100%) compósitos constituídos de MOMHTc e quitosana implantados em tíbias direitas de coelhos dos grupos E1, E2, E3 e E4, 11 (92%) compósitos encontravam-se incorporados em seus respectivos leitos receptores, sendo 8 (67%) observados aos cortes sagitais e 3 (25%) notados aos transversais. Observou-se osseointegração em apenas 3 (25%) compósitos implantados, sendo 2 (17%) observados aos cortes sagitais e 1 (8,3%) ao corte transversa, A osse condução foi observada em 3 (75%) amostras aos cortes transversais (Tabela 2). Notou-se também, que o tecido ósseo do leito receptor (cinza claro) e a MOMHTc (cinza claro) e mantiveram-se preservados.

Tabela 2. Comportamento dos compósitos constituídos de MOMHTc e quitosana em leitões receptores de tíbias direitas de coelhos por meio da MEV.

Grupos	Sub-grupos		Incorporação	Osseointegração	Osseocondução
E₁ 30 dias	n1 (1)	d – corte sagital	+	-	-
	n2 (2)	d – corte sagital	+	-	-
	n3 (3)	d – corte transversal	(-)	-	-
E₂ 60 dias	n1 (4)	d – corte transversal	+	-	+
	n2 (5)	d – corte sagital	+	-	-
	n3 (6)	d – corte sagital	+	-	-
E₃ 90 dias	n1 (7)	d – corte sagital	+	-	-
	n2 (8)	d – corte sagital	+	+ (8 pontos)	-
	n3 (9)	d – corte transversal	+	+ (1 ponto)	+
E₄ 120 dias	n1 (10)	d – corte sagital	+	-	-
	n2 (11)	d – corte sagital	+	+ (1 ponto)	-
	n3(12)	d – corte transversal	+	-	+

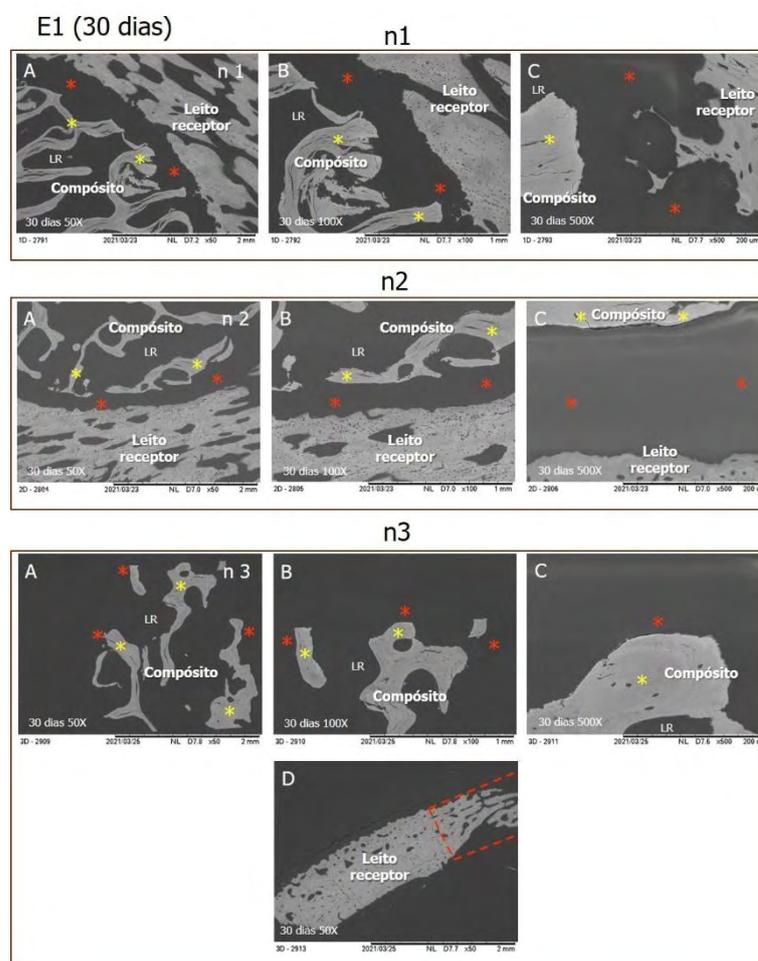
E₁, E₂, E₃ e E₄: grupos de animais; n1, n2 e n3: sub-grupos de animais; d: tíbia direita implantada com a MOMHTc e quitosana; n: animais (1-12); '+' : observada; '-' : não observada.

Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

Além da MEV, foram realizadas análises pela espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS) “*line scan*” dos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P), presentes na superfície das amostras, envolvendo leitões receptores, interfaces e MOMHTc, que apresentaram osseointegração.

Aos 30 dias (E₁), pela MEV, observou-se que as MOMHTc presentes nos compósitos das amostras n1 e n2, nos cortes sagitais, não se integram com seus leitões receptores. Notou-se que o defeito ósseo da tíbia do coelho (n3), ao corte transversal, estava preenchido com tecido ósseo e o compósito não estava presente no sítio de implantação (Figura 43).

Figura 41. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTc e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E1 (30 dias) obtidas de corte sagital (n1-ABC e n2-ABC) e corte transversal ((n3-ABCD).

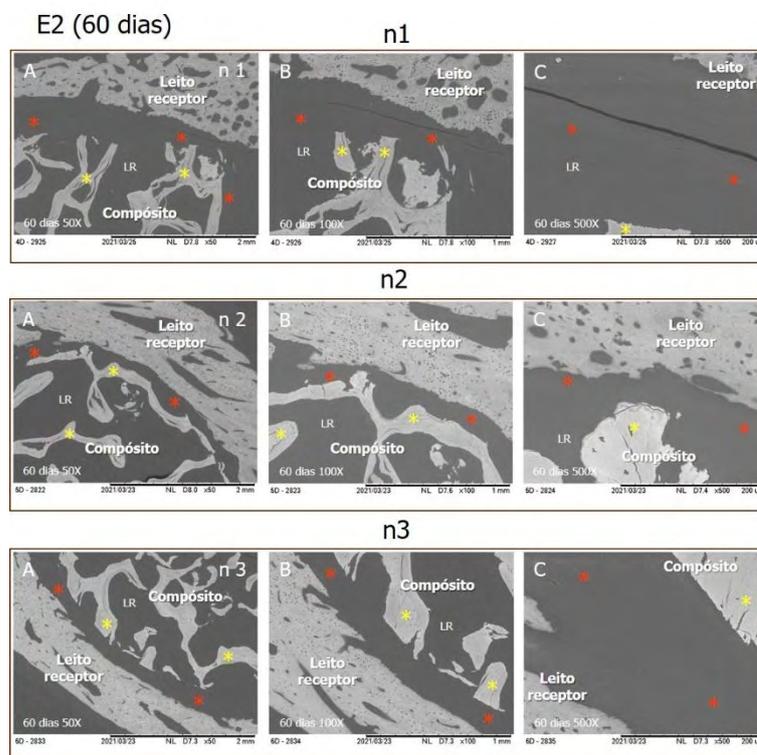


Fonte: Plano de gestão de uso, Microscopia eletrônica de varredura-MEV, equipamento multiusuário (EMU), ZAZ – FZEA/USP.

Observe: leitos receptores (cinza claro) e MOMHTc (cinza claro - asteriscos amarelos) infiltrados e emblocados em resina acrílica (LR) (cinza escuro). Note ausência de contato das MOMHTc com os leitos receptores (asteriscos vermelhos - interface) das amostras n1, n2 e n3, e leito receptor preenchido com tecido ósseo (trapézio vermelho) da amostra n3 (D).

Aos 60 dias (E2), também com uso da MEV, notou-se que as MOMHTc presentes nos compósitos implantados nas tíbias dos coelhos (n1, n2 e n3), nos planos sagitais e transversal, não se integraram com os leitos receptores (Figura 44).

Figura 42. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTc e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E2 (60 dias) obtidas de corte transversal (n1-ABC) e sagitais (n2-ABC e n3-ABC).

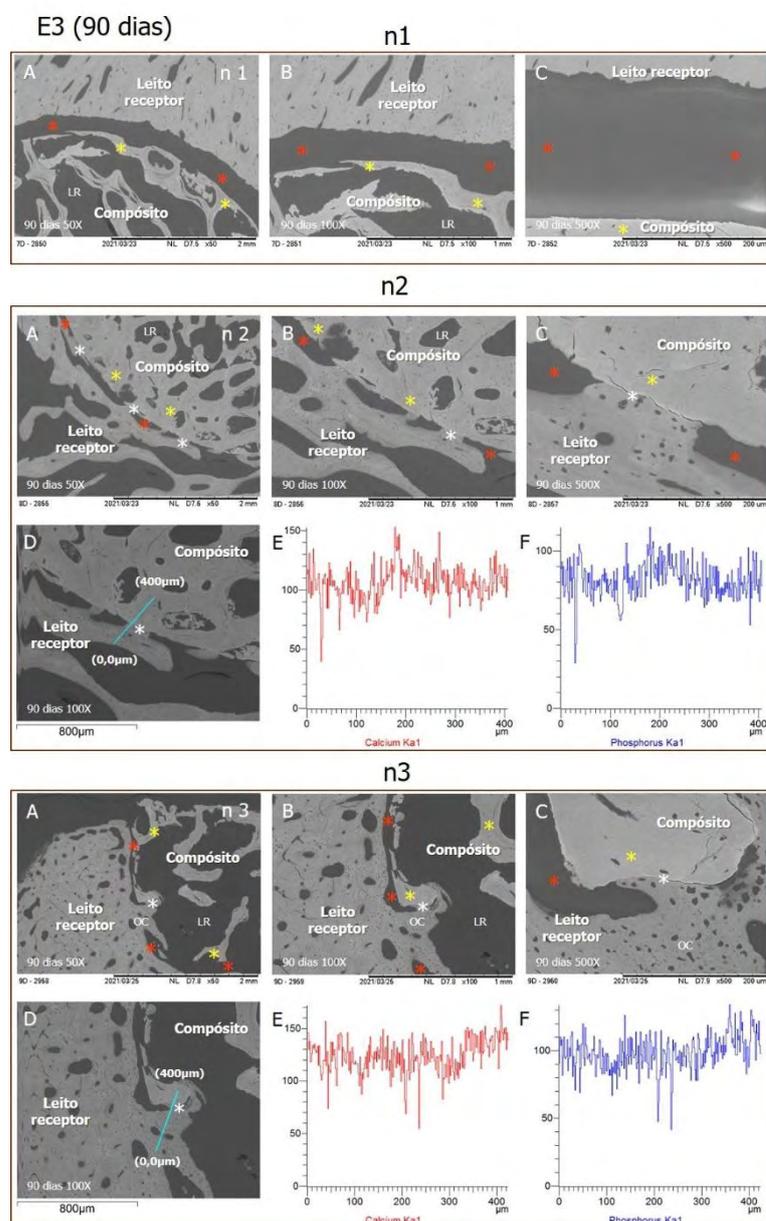


Fonte: Plano de gestão de uso, Microscopia eletrônica de varredura-MEV, equipamento multiusuário (EMU), ZAZ – FZEA/USP.

Observe: leitos receptores (cinza claro) e MOMHTc (cinza claro - asteriscos amarelos) infiltrados e emblocados em resina acrílica (LR) (cinza escuro). Note ausência de contato das MOMHTc com os leitos receptores (asteriscos vermelhos - interfaces) das amostras n1, n2 e n3.

Aos 90 dias (E3), com auxílio da MEV, notou-se ao corte sagital que a MOMHTc presente do compósito implantado na tíbia (n1) não se integrou com o leito receptor. Já as MOMHTc implantadas nas tíbias (n2 e n3), nos planos sagital e transversal, se integraram com seus leitos receptores (Figura 80). Análise com EDS “line scan” do leito receptor e da MOMHTc dos compósitos, notou-se que os elementos químicos Ca e P mantiveram-se constantes, com pontos de declínios foram observados (n2 e n3) (Figura 45).

Figura 43. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTc e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E3 (90 dias) obtidas de cortes sagitais (n1-ABC e n2-ABC) e transversal (n3-ABC).



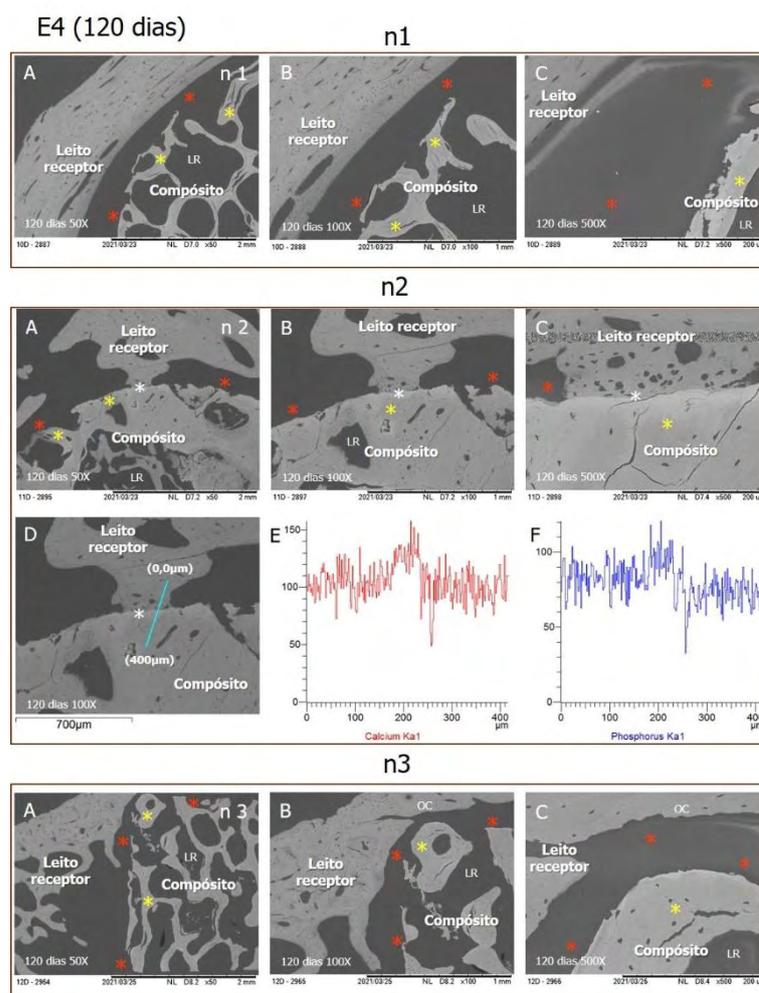
Fonte: Plano de gestão de uso, Microscopia eletrônica de varredura-MEV, equipamento multiusuário (EMU), ZAZ – FZEA/USP.

Observe: leitos receptores (cinza claro) e MOMHTc (cinza claro - asteriscos amarelos) infiltrados e emblocados em resina acrílica (LR) (cinza escuro). Note ausência de contato da MOMHTc com o leito receptor (asteriscos vermelhos - interface) da amostra n1, osseointegração das MOMHTc com os leitos receptores (asteriscos brancos) das amostras n1 e n2, e osseocondução da amostra n3 (ABC). Mapeamento pela espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS), line scan (linha azul) dos elementos químicos Ca e P do leito receptor, osseointegração (asteriscos brancos) e MOMHTc. Observar que as concentrações dos

elementos químicos Ca e P (n2-DEF e n3-DEF) mantiveram-se constantes, com pontos de declínio dos elementos químicos Ca e P.

Aos 120 dias (E4), utilizando a MEV, observou-se ao corte sagital que a MOMHTc presente do compósito implantado na tibia (n2) integrou com o leito receptor. Já as MOMHTc implantadas nas tíbias (n1e n3), nos planos sagital e transversal, respectivamente, não se integraram com seus leitos receptores (Figura 81). Análise com EDS “line scan” do leito receptor e da MOMHTc do compósito, notou-se que os elementos químicos Ca e P mantiveram-se constantes, com pontos de declínios foram observados (n2) (Figura 46).

Figura 44. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTc e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E4 (120 dias) obtidas de cortes sagitais (n1-ABC e n2-ABC) e transversal (n3-ABC).



Fonte: Plano de gestão de uso, Microscopia eletrônica de varredura-MEV, equipamento multiusuário (EMU), ZAZ – FZEA/USP.

Observe: leitos receptores (cinza claro) e MOMHTc (cinza claro - asteriscos amarelos) infiltrados e emblocados em resina acrílica (LR) (cinza escuro). Note ausência de contato das MOMHTc com os leitos receptores (asteriscos vermelhos - interface) das amostras n1 e n3, osseointegração da MOMHTc com o leito receptor (asteriscos brancos) da n2, e osseocondução (OC) da amostra n3. Mapeamento pela espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS), line scan (linha azul) dos elementos químicos Ca e P do leito receptor, osseointegração (asterisco branco) e MOMHTc. Observar que as concentrações dos elementos químicos Ca e P (n2-DEF) mantiveram-se constantes, com pontos de declínio dos elementos químicos Ca e P.

AVALIAÇÕES PELA MEV/EDS DAS INTERFACES ENTRE COMPÓSITOS CONSTITUÍDOS DE MOMHTb E QUITOSANA E TÍBIAS DOS COELHOS

Com auxílio de análise pela MEV, modo composicional, também em plano único, observou-se que os 12 (100%) compósitos constituídos de MOMHTb e quitosana implantados em tíbias esquerdas de coelhos dos grupos E1, E2, E3 e E4 encontravam-se incorporados em seus respectivos leitos receptores, sendo 8 (67%) observados aos cortes sagitais e 4 (33.3%) notados aos cortes transversais. Observou-se osseointegração em apenas 5 (42%) compósitos implantados, sendo 3 (25%) observados aos cortes sagitais e 2 (17%) notados aos cortes transversais. Observou-se osseocondução nas 4 (100%) amostras, aos cortes transversais (Tabela 3). Notou-se também, que o tecido ósseo do leito receptor (cinza claro) e a MOMHTc (cinza claro) e mantiveram-se preservados.

Tabela 3. Comportamento dos compósitos constituídos de MOMHTb e quitosana em leitões receptores de tíbias esquerdas de coelhos por meio da MEV.

Grupos	Sub-grupos		Incorporação	Osseointegração	Osseocondução
E₁ 30 dias	n1 (1)	e – corte sagital	+	-	-
	n2 (2)	e – corte sagital	+	-	-
	n3 (3)	e – corte transversal	+	-	+
E₂ 60 dias	n1 (4)	e – corte sagital	+	+ (1 ponto)	-
	n2 (5)	e – corte sagital	+	-	-
	n3 (6)	e – corte transversal	+	-	+
E₃ 90 dias	n1 (7)	e – corte sagital	+	-	-
	n2 (8)	e – corte transversal	+	+ (9 pontos)	+
	n3 (9)	e – corte sagital	+	+ (4 pontos)	-
E₄ 120 dias	n1 (10)	e – corte transversal	+	+ (1 ponto)	+
	n2 (11)	e – corte sagital	+	-	-
	n3 (12)	e – corte sagital	+	+ (8 pontos)	-

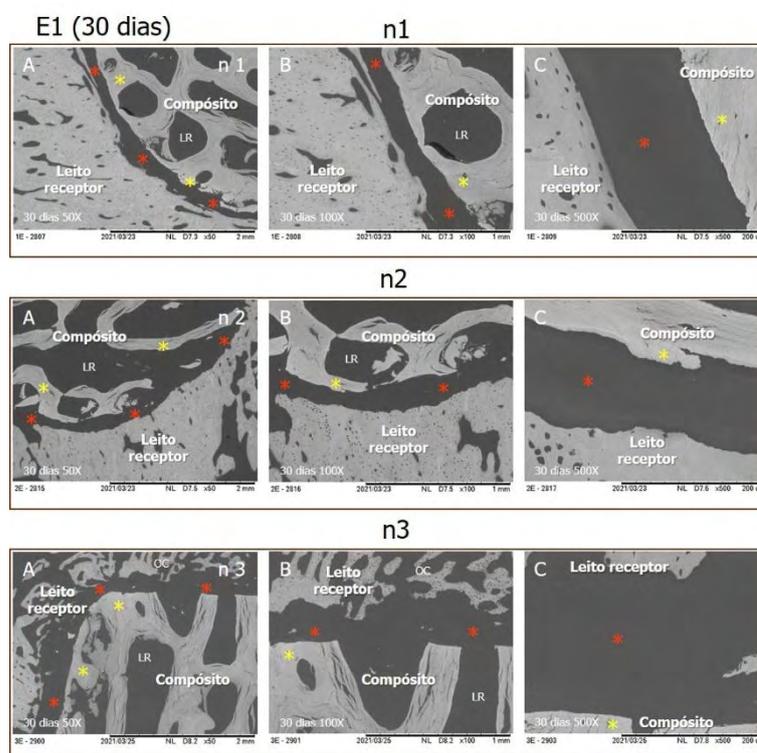
E₁, E₂, E₃ e E₄: grupos de animais; n1, n2 e n3: sub-grupos de animais; e; tibia esquerda implantada com MOMHTb e quitosana; n: animais (1-12); '+' : observada; '-' : não observada.

Fonte: Laboratório de Biomateriais com Potencial Aplicação Clínica (LABIPAC/ZMV) – FZEA/USP.

Além da MEV, foram realizadas análises pela espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS) “*line scan*” dos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P), presentes na superfície das amostras, envolvendo leitões receptores, interfaces e MOMHTb, que apresentaram osseointegração.

Aos 30 dias (E₁), com emprego da MEV, observou-se que os compósitos encontravam em seus sítios de implantações e que as MOMHTb das amostras das tíbias (n1 e n2), nos cortes sagitais, não se integram com seus leitões receptores com bordas irregulares. Ao corte transversal, a MOMHTb da amostra da tibia (n3) também não se integrou ao leito receptor, com presença de osseocondução (Figura 47).

Figura 45. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTb e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E1 (30 dias) obtidas de corte sagitais (n1-ABC e n2-ABC) e transversal (n3-ABC).

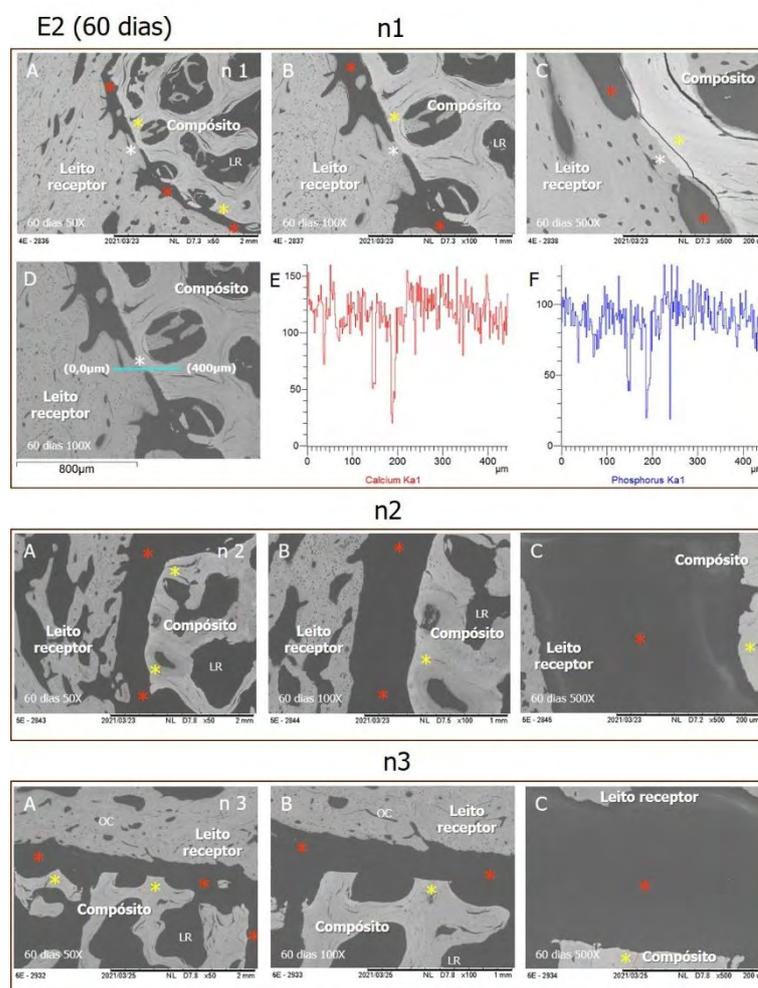


Fonte: Plano de gestão de uso, Microscopia eletrônica de varredura-MEV, equipamento multiusuário (EMU), ZAZ – FZEA/USP.

Observe: leitos receptores (cinza claro) e MOMHTc (cinza claro-asterísco amarelo) infiltrados e emblocados em resina acrílica (LR) (cinza escuro). Note ausência de contato das MOMHTb com os leitos receptores (asteriscos vermelhos - interfaces) nas amostras n1, n2 e n3 e osteocondição (OC) na amostra n3 (AB).

Aos 60 dias (E1), utilizando a MEV, observou-se que os compósitos encontravam em seus sítios de implantações e que as MOMHTb das amostras n2 (corte sagital) e n3 (corte transversal) não se integram com seus leitos receptores. Já a MOMHTb da amostra da amostra n1 integrou ao leito receptor (Figura 48). Análise com EDS “line scan” do leito receptor e da MOMHTb do compósito, notou-se que os elementos químicos Ca e P mantiveram-se constantes, com pontos de declínios foram observados (n1) (Figura 48).

Figura 46. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTb e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E2 (60 dias) obtidas de cortes sagitais (n1-ABC e n2-ABC) e transversal (n3-ABC).

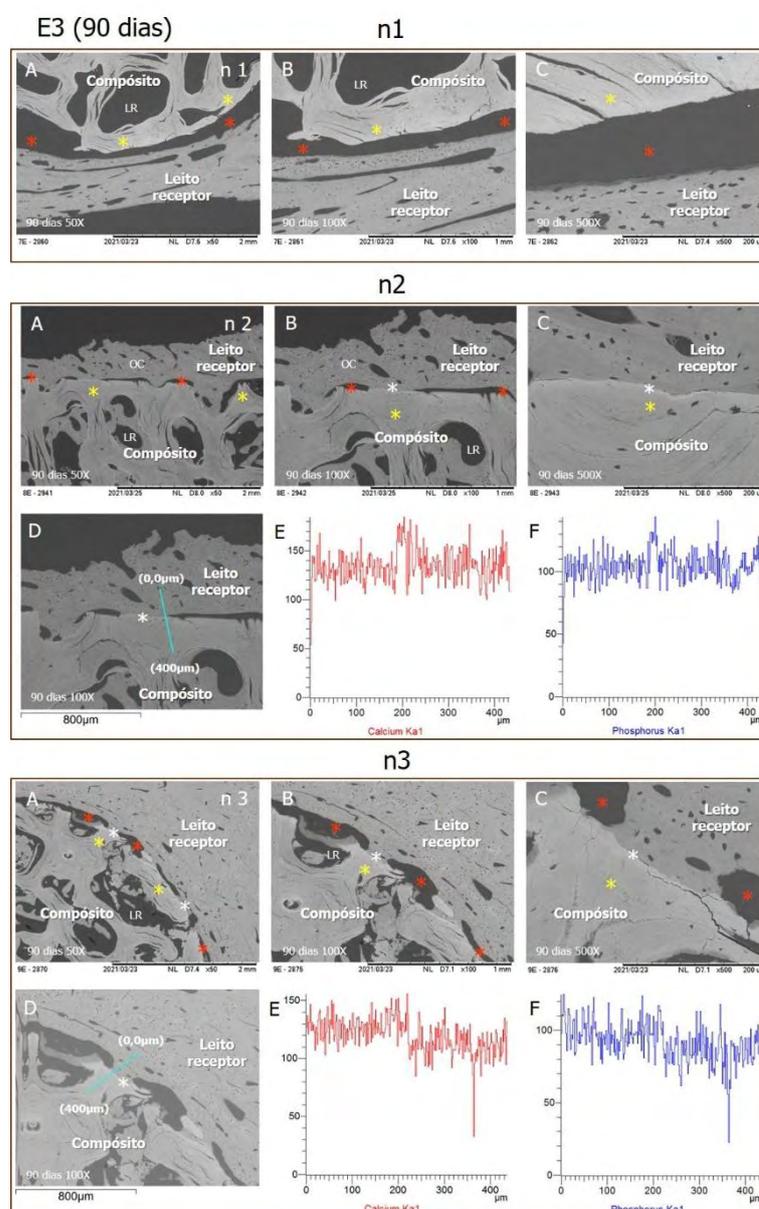


Fonte: Plano de gestão de uso, Microscopia eletrônica de varredura-MEV, equipamento multiusuário (EMU), ZAZ – FZEA/USP.

Observe: leitos receptores (cinza claro) e MOMHTb (cinza claro-asteriscos amarelos) infiltrados e emblocados em resina acrílica (LR) (cinza escuro). Note ausência de contato das MOMHTb com o leito receptor (asteriscos vermelhos - interface) (n2 e n3), osseointegração da MOMHTb com o leito receptor (asteriscos brancos) na amostra n1 e osteocondução (OC) na amostra n3 (AB). Com uso da espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS), line scan (linha azul) dos elementos químicos Ca e P do leito receptor, observou-se osseointegração (asterisco branco) e MOMHTb. Note que as concentrações dos elementos químicos Ca e P (n1-DEF) mantiveram-se constantes, com pontos de declínio dos elementos químicos Ca e P.

Aos 90 dias (E3), com uso da MEV, notou-se ao corte sagital que a MOMHTb presente do compósito implantado na tibia (n1) não se integrou com o leito receptor. Já as MOMHTb implantadas nas tíbias (n2 e n3), nos planos transversal e sagital respectivamente, se integraram com seus leitos receptores (Figura 49). Por meio de análise com EDS “line scan” do leito receptor e da MOMHTb dos compósitos, notou-se que os elementos químicos Ca e P mantiveram-se constantes, com pontos de declínios foram observados (n2 e n3) (Figura 49).

Figura 47. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTb e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E3 (90 dias) obtidas de cortes sagitais (n1-ABC) e transversal (n2-ABC).

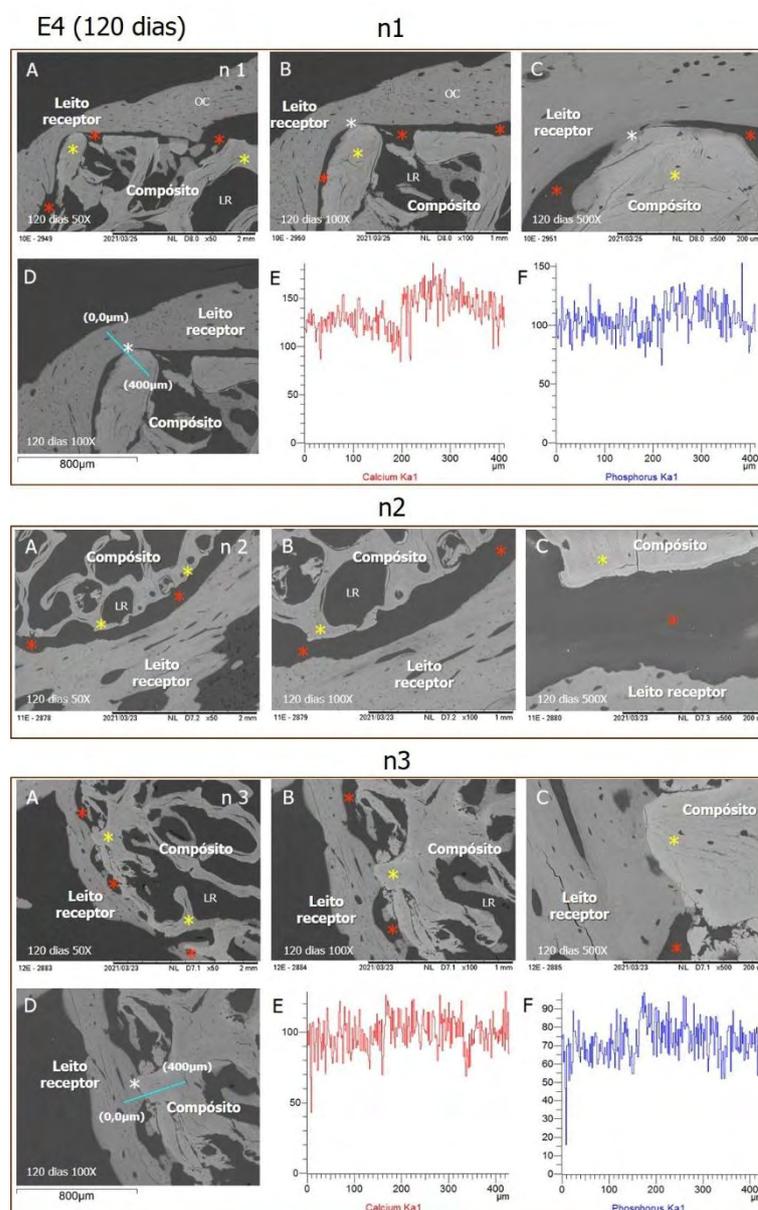


Fonte: Plano de gestão de uso, Microscopia eletrônica de varredura-MEV, equipamento multiusuário (EMU), ZAZ – FZEA/USP.

Observe: leitos receptores (cinza claro) e MOMHTb (cinza claro-asteriscos amarelos) infiltrados e emblocados em resina acrílica (LR) (cinza escuro). Note ausência de contato da MOMHTb com o leito receptor (asteriscos vermelhos - interface) na amostra n1, osseointegração das MOMHTb com os leitos receptores (asteriscos brancos) nas amostras n2 e n3 e osseocondição na amostra n2 (AB). Por meio do mapeamento pela espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS), line scan (linha azul) dos elementos químicos Ca e P do leito receptor, osseointegração (asteriscos brancos) e MOMHTb. Observe que as concentrações dos elementos químicos Ca e P (n2-DEF e n3-DEF) mantiveram-se constantes, com pontos de declínio dos elementos químicos Ca e P.

Aos 120 dias (E4), com uso da MEV, notou-se ao corte sagital que a MOMHTb presente do compósito implantado na tíbia (n2) não se integrou com o leito receptor. Já as MOMHTb implantadas nas tíbias (n1 e n3), nos planos transversal e sagital, respectivamente, se integraram com seus leitos receptores (Figura 50). Por meio de análise com EDS “line scan” do leito receptor e da MOMHTb dos compósitos, notou-se que os elementos químicos Ca e P mantiveram-se constantes, com pontos de declínios foram observados (n1 e n3) (Figura 50).

Figura 48. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTb e quitosana) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E4 (120 dias) obtidas de cortes sagitais (n2-ABC e n3-ABC) e transversal (n1-ABC).



Fonte: Plano de gestão de uso, Microscopia eletrônica de varredura-MEV, equipamento multiusuário (EMU), ZAZ – FZEA/USP.

Observe: leitos receptores (cinza claro) e MOMHTb (cinza claro-asteriscos amarelos) infiltrados e emblocados em resina acrílica (LR) (cinza escuro). Note ausência de contato da MOMHTb com o leito receptor (asteriscos vermelhos - interface) na amostra n2, osseointegração das MOMHTb com os leitos receptores (asteriscos brancos) nas amostras n1 e n3 e osseocondução na amostra n1 (AB). Por meio do mapeamento pela espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS), line scan (linha azul) dos elementos químicos Ca e P do leito receptor, osseointegração (asteriscos brancos) e MOMHTb. Observe que as concentrações

dos elementos químicos Ca e P (n2-DEF e n3-DEF) mantiveram-se constantes, com pontos de declínio dos elementos químicos Ca e P.

6. DISCUSSÃO

De acordo com a normativa (ISO 10993- 5: 2009), o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a compatibilidade de um biomaterial, que pode ser por contato direto ou indireto. A escolha do tipo de teste determinará os procedimentos e etapas detalhados, com a finalidade de obter com precisão os resultados almejados. Baseando-se nessa teoria e, também, em experimentos anteriores, para este projeto, foi escolhido o procedimento através do método indireto. Tal escolha foi devido à relação tamanho dos compósitos e o tamanho dos poços da placa, com a finalidade de se obter o maior efeito das substâncias liberadas das amostras e seu respectivo efeito sobre as células (ROGERO et al. 2003).

Os procedimentos utilizados para definir a citotoxicidade podem ser classificados de acordo com os seguintes critérios: mensuração de crescimento celular, análise de danos celulares através do morfológico celular, avaliação do metabolismo e crescimento celular. Fica ao critério do pesquisador aplicar a técnica que mais se encaixa no procedimento escolhido. Sendo assim, optou-se pela análise através do metabolismo celular, uma vez que quando clivado pelas mitocôndrias de células ativas, o substrato adquire uma coloração diferenciada, modificando-se de amarelo pálido a formazan azul, o qual possui uma tonalidade próximo ao violeta (ISO 10993- 5: 2009). Deste modo, quanto maior for a intensidade da coloração azulada/violeta, significa que há maior atividade celular, ou seja, maior quantidade de células permaneceu vivas mediante a substância exposta.

O grupo positivo (DMSO) apresentou maior reação citotóxica de todos os tratamentos analisados, alterando consideravelmente a viabilidade celular, com redução da transformação colorimétrica do teste. Já o grupo controle negativo (CT), por não possuir nenhuma substância tóxica que lesione as células, manteve a transformação colorimétrica do teste, devido a preservação do metabolismo celular. Logo, devido suas características, eles são inversamente proporcionais (Tabela 1, Figuras 31 e 32).

Segundo a ISO 10993-5 (2009), quando a viabilidade celular fica abaixo de 70%, o material testado possui potencial citotóxico.

Correlacionando os grupos controles negativos (CT) com diferentes concentrações de extratos obtidas dos compósitos à base de MOMHT(c/b) e quitosana, os efeitos mais citotóxicos foram observados nos extratos de C1 (diluição de 100%), ou seja, a solução mais pura e com menor viabilidade celular. Correlacionando os efeitos citotóxicos dos extratos de C1 dos dois tratamentos, observou-se que o extrato C1 (MOMHTb e quitosana: 51% de viabilidade celular)

foi o menos citotóxico, do que o extrato C1 (MOMHTc e quitosana: 38% de viabilidade celular), que apresentou maior efeito citotóxico (Tabela1, Figuras 31 e 32).

A opção cirúrgica mais viável para reparar defeitos ósseos é sem dúvidas com o tecido ósseo autógeno, pois possui células que estimulam osteogênese, induzem a osseocondução e osseointegração; contudo, na maioria das vezes necessita de dois tempos cirúrgicos, além de ser oneroso. Por isso, optou-se pelo uso de compósitos constituídos de MOMHT(c/b) associadas à quitosana por se tratar de biomateriais viáveis, de fácil obtenção e acondicionamento, que necessitam apenas de um único procedimento cirúrgico para implantação (FREITAS et al., 2013; MOREIRA et al., 2014).

O glicerol a 98% em temperatura ambiente, de acordo com nossos resultados, continua sendo excelente meio de preservação de material biológico, que pode ser empregado para conservação de tecidos ósseos (SILVA et al., 2003; FREITAS et al., 2014). Dessa forma, a implantação de banco ósseo em centros cirúrgicos veterinários, para aplicação em procedimentos cirúrgicos ortopédicos, já que os tecidos ósseos liofilizados e criopreservados, além de onerosos, não fazem parte do arsenal ortopédico da medicina veterinária nacional (FREITAS et al., 2012).

Atualmente não há consenso quanto ao tempo mínimo de permanência do tecido ósseo em glicerol a 98%; no entanto, as MOMHT(c/b) empregadas no preparo dos compósitos foram acondicionadas no meio por mais de 30 dias que, para Melo et al. (1998), Freitas et al. (2008) e Vilela et al. (2010), é período adequado para que os tecidos biológicos possam ser utilizados em procedimentos cirúrgicos com segurança. Mesmo o glicerol a 98% apresentando propriedades conservadora e bactericida, para uso, os compósitos foram acondicionados em grau cirúrgico e autoclavados, para prevenir contaminação dos leitos receptores por patógenos.

Na ocasião do preparo dos compósitos, os materiais utilizados para manipular e acondicionar as MOMHT(c/b) foram esterilizados em autoclave e em luz de ultravioleta em cabine de segurança. Após o processamento, os compósitos foram submetidos a esterilização por meio de autoclave, que para Vilela et al. (2010) e Moreira et al. (2014) é fundamental, pois previne a infecção local e, conseqüentemente, osteólise local que levaria instabilidade e/ou migração do compósito do leito receptor.

A região proximal medial da tíbia de coelhos foi definida para acomodar os compósitos, por se tratar de uma área de fácil acesso e, também, por possuir pouco tecido mole adjacente, o que tornou o procedimento cirúrgico rápido e exequível (REZENDE et al., 1998; FREITAS et al., 2020). Além disso, essa região também é sede de reabsorção e de propriedades osteogênicas,

sendo, inclusive, metabolicamente, a mais ativa desse osso. Essas características são almeçadas e favorecem uma resposta celular mais eficiente entre os compósitos em estudo e o sítio receptor (SUOMINEN et al., 1995; TURRER e FERREIRA., 2008).

Os coelhos, após retorno anestésico, mantiveram os membros operados apoiados nas bandejas das Racks ventiladas, demonstrando que a técnica cirúrgica utilizada para criar o defeito ósseo para implantação do compósito não comprometeu a estrutura físicas das tíbias dos coelhos, corroborando com os mesmos resultados encontrados por Melo et al. (1998) e Freitas et al. (2020). As feridas cirúrgicas no décimo segundo dia apresentavam-se com as bordas aposicionadas e celadas, sem sinais de reações locais que sugerisse infecção ou rejeição dos compósitos ao leito receptor, demonstrando que a antisepsia e assepsia, a antibioticoterapia e o manejo das feridas foram adequados (MOREIRA et al., 2014).

As reações entre os compósitos e o leito receptor, como por exemplo, proliferações, lise óssea e/ou infecção, não foram notadas neste estudo. Isso se deve provavelmente ao emprego adequado da técnica cirúrgica e, também, ao uso apropriado de método de esterilização, manejo das feridas, que para Kuhl et al., 2017 são fatores fundamentais para ocorra incorporação e/ou integração dos compósitos aos leitos receptores.

O emprego da técnica radiológica digital neste estudo permitiu acompanhar o comportamento dos compósitos nos leitos receptores de tíbias de coelhos em diferentes tempos (SILVA et al., 2003; MOREIRA et al., 2014; KUHL et al., 2017). As avaliações radiográficas, projeção médio-lateral, realizadas nas tíbias dos coelhos no pós-operatório imediato demonstraram que todos os compósitos implantados encontravam-se acomodados em seus leitos receptores. No entanto, na ocasião da avaliação macroscópica observou que um compósito (Tabela 1, Figura 78) encontrava deslocado externamente de seu leito receptor, que também foi confirmado na ocasião da avaliação macroscópica e pela MEV (Figura 39 e 41 respectivamente: E1N3). Logo, para uma avaliação mais precisa do compósito implantado, uma segunda projeção radiográfica crânio-caudal, deveria ser empregada. Além disso, outras técnicas como microtomografia e análise histomorfológica de secções de tecido não descalcificado poderiam ser empregadas para acompanhar os eventos locais do compósito no leito receptor com maior precisão.

Aos 30 dias de pós-operatório os compósitos de MOMHT(c/b) e quitosana demonstravam variações de densidades em suas interfaces com os leitos receptores quando comparados aos dos pós-operatório imediato. Esse evento também foi observado aos 60, 90 e 120 dias. Provavelmente essa diferença de densidade, ou seja, a osseointegração, esteja relacionada com

a neoformação vascular e invasão tissular de fibroblastos seguida por deposição de tecido fibrocartilaginoso e osteogênese, caracterizando a osseointegração do compósito (GUTIERRES et al., 2006; TURRET et al., 2008, MOREIRA et al., 2014, COSTA et al., 2015).

A osseointegração de um biomaterial, atualmente, não possui um consenso entre estudiosos que pesquisam sobre a biologia do tecido ósseo. Por isso, estudos relacionados às respostas biológicas local, a biomecânica e os biomateriais que influenciam a osseointegração de biomateriais ao leito receptor, são necessários e estão cada vez mais sendo realizados (LEGEROS e CRAIG, 1993; MOREIRA et al. 2014; FREITAS et al. 2020). Os biomateriais funcionais podem ter contato direto, osseointegração, ou indireto, fibrointegração, com o leito receptor. Entretanto a falha e a perda desses tem sido atribuída à formação de tecido fibroso, ou seja, a osseointegração indireta, que pode ser analisada pela técnica de MEV, demonstrando que o tecido ósseo mineralizado apresenta-se de coloração cinza clara enquanto que o tecido fibroso pode ser observado de coloração de cinza mais escuro (LEGEROS e CRAIG, 1993; KANG et al. 2015).

Na tentativa de aumentar a eficácia desse biomaterial na reparação óssea, foi adicionado a ele um segundo biomaterial, ou seja, a quitosana (Kuhl et al., 2017), tornando-o mais biocompatíveis, com menor possibilidade de falha e com propriedades superiores as dos componentes isolados. No entanto, como demonstrado nesse experimento essa associação não apresentou resultados satisfatórios.

Por meio de técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a superfície da interface entre biomaterial e o leito receptor poderá ser caracterizada morfológicamente em alta resolução para observar adaptações e propriedades de tecidos inorgânicos ou orgânicos com diferentes densidades, que são fatores fundamentais para a compreensão da biologia óssea local (SABOIA et al. 2000, HUJA e ROBERTS, 2004; MAYER et al. 2013, COSTA et al. 2015).

Com esses recursos, foi possível estabelecer não só o limite morfológico entre o contato físico dos compósitos constituídos de MOMHT(c/b) associadas à quitosana, com o leito receptor, mas também a microanálise qualitativa dos elementos químicos presentes nas superfícies de seus componentes, demonstrando que a MEV é um método valioso para estudo das estruturas presentes na interface entre o compósito e o leito receptor de tíbias de coelhos.

Análise pela MEV foi decisiva para avaliar as interfaces dos compósitos implantados nos leitões receptores de tíbias dos coelhos. Dos 24 compósitos constituídos de MOMHT(c/b) e quitosana que foram implantados nas tíbias de coelhos, 23 foram incorporados em seus respectivos leitões receptores e somente oito se osseointegraram, sendo cinco de origem bovina

e três de canina. Com uso da MEV, a análise é pontual e nesse estudo ela foi utilizada nos cortes sagital e transversal. Provavelmente, análises das interfaces entre os compósitos constituídos de MOMHT(c/b) e quitosana e os leitos receptores de tíbias de coelhos com uso de microtomografia, os resultados poderiam ser mais satisfatórios, pois esse equipamento permite avaliação em vários planos.

Devido às suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade, atualmente o polímero de quitosana vem sendo pesquisado e aplicado como substituto ósseo com resultados satisfatórios (MUZZARELLI e MUZZARELLI, 2002; SPIN-NETO et al. 2008; PIRES et al. 2015). No entanto, neste estudo, das 24 tíbias implantadas (12 - MOMHTc e quitosana / 12 – MOMHTb e quitosana), somente oito foram integradas, sendo cinco de origem bovina e três de canina. Por isso, para que a quitosana obtida do gladio de lula possa ser associada a outro biomaterial, transformando em compósito, e ser clinicamente aplicada, novos estudos serão necessários.

A microanálise através da espectrometria de energia dispersiva (EDS), com uso de detector de energia de raio-X acoplado ao MEV, permite avaliar qualitativa e semi-quantitativamente elementos químicos presentes sobre a superfície de uma amostra. Por meio de análise pela EDS, (line scan), observou-se nesta pesquisa que as concentrações de cálcio e de fósforo sobre a região de integração, com início no leito receptor, cruzando a interface e finalizando na MOMHT (c/b) presentes nos compósitos, mantiveram-se constantes. Quando não há integração do biomaterial com o leito receptor, observa-se na ocasião da microanálise pela EDS (*line scan*), declínio das concentrações de elementos químicos, como o cálcio e o fósforo, na interface (SABOIA et al., 2000; SERHAN et al. 2004; FAEDA et al. 2009; MAYER et al., 2013; COSTA et al., 2015), que foi observado nas microanálises realizadas neste experimento, na maioria das amostras.

Avaliações das interfaces entre os compósitos constituídos de MOMH (c/b) e quitosana e leitos receptores de tíbias de coelhos com uso de microtomografia, que permite análise em diferentes planos com mais detalhes, poderia demonstrar mais informações referentes à interação dos compósitos com o sítio de implantação das tíbias dos coelhos.

7. CONCLUSÃO

Dos compósitos implantados e analisados, os constituídos de MOMHTb associados a quitosana apresentaram melhor performance. Logo, esse biomaterial seria o mais recomendado como substitutos para preencher e reparar falhas ósseas.

8. REFERÊNCIAS

AKAMOTO, T.; TRENTO, C.L. Implante homogêneo de matriz dentinária desmineralizada conservada em glicerina a 98% em alvéolo dental – estudo microscópico em rato. **Revista Ciências Odontológicas**, n.5, p.33-43, 2002.

ALEXANDER, J.W. Bone grafting. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v.17, n.4, p.811-819, 1987.

ALIEVI, M.M.; SCHOSSLER, J.E.W.; GUIMARAES, L.D.; OLIVEIRA, A.N.C.; TRAESLEL, C.K.; FERREIRA, P.A. Implante ósseo cortical alógeno conservado em mel na reconstrução de falha óssea diafisária em fêmur de cães: avaliação clínica e radiográfica. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, p. 450-457. 2007.

ALJUMAILY, M. A. Open osteotomy of ulna as a model for fracture healing studies in rabbits. **Journal of the faculty of medicine**. v. 52, n. 3, p. 259-262, 2010.

AZEVEDO, A.D; SÁ, M.J.C; FOOK, M.V.L; NETO, P.I.N. Hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea no reparo do tecido ósseo em coelhos. Estudo histológico e morfométrico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.7, p.1265-1270, jul, 2013.

BOJRAB, M. J. Enxerto ósseo. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3ed. São Paulo: Roca, p. 786-793, 1996.

BRAZ, F.; RAHA, S.C.; ROCHA, N.S.; TAGA, E.; BIASI, F. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 1, p.01-12, 2003.

BURGER, C.P.; MORAES, P.C.; MANISCALCO, C.L.; BORGES, P.A.; BATISTA, P.A.C.S.; CANOLA, J.C.; MEIRELLES, A.E.W.B.; SABINO, M.G.; ROSSETTO, H. Cimento de aluminato de cálcio: uso em defeitos ósseos induzidos em fêmur de coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e Zootecnia**, v.65, n.3, p.757-762, 2013.

CATELLO, J.C.; DÓRIA, RENATA G.S.; FANTINATO NETO, P.; CAMARGO, LÁZARO M.; SHIMANO, A.C.; YAUMACHI, K.C.I.; AMBROSIO, C.E.; FREITAS, S.H. Estudo comparativo da resistência mecânica da força de compressão entre biomateriais naturais, sintéticos e mistos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, p.91 - 96, 2017.

CHEN, X.; XIA, W.S.; YU, X.B. Purification and characterization of two types of chitosanase from *Aspergillus* sp CJ22-326. **Food Research International**, v.38, n.3, p.315-322, 2005.

CHOW, L.C. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. **Dental Materials**. v.28, n.1, p.1-10, 2009.

COSTA, B.D.; CAMARGO, N.H.; OLESKOVICZ, N.; GAVA, A.; DALLABRIDA, A.L.; REGALIN, D.; LIMA, M.P.A.; MORAES, A.N. Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.2, p.177-187, 2015.

DAMIAN, C. BEIRÃO, L.H; FRANCISCO, A; ESPÍRITO SANTO, M. L. P; TEIXEIRA, E. Quitosana: Um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição**, v.16, nº2, p.195-205. Araraquara, 2005.

DASSO, G.; FERNANDEZ, M.S.; ARIAS, J.L. Reparacion ósea mediante aloimplantes sometidos a diferentes métodos de conservación em conejos, **Archivos de medicina veterinaria**, v.30, n.2, p.57-66, 1998.

DAVID F. WILLIAMS, Definitions of biomaterials for the twenty-first century, Proceedings of a Consensus Conference Held in Chengdu, **People's Republic of China** June 11th and 12th 2018 Edited by DAVID WILLIAMS and XINGDONG ZHANG, Cap II pg 22.

DEDAVID, B.A; GOMES, C. I; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras – materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, p.11-17, 2007.

FAEDA, R.S.; TAVARES, H.S.; SARTORI. R.; GUASTALDI, A.C.; MARCANTONIO, E.JR. Biological performance of chemical hydroxyapatite coating associated with implant surface modification by laser beam: biomechanical study in rabbit tibias. **Journal Oral Maxillofac Surgery**, v.67, n.8, p.1706-15, 2009.

FAKHRY, A., SCHNEIDER, G. B., ZAHARIAS, R., & SENEL, S. Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts. **Biomaterials**, v. 25, p. 2075–2079, 2004.

FERNANDES, A. Y.; LARONGA, P.R.; COELHO, R.A.; DUCATI, L. G.; SILVA, M.V. Prototipagem como forma alternativa para realização de cranioplastia com metilmetacrilato. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.62, n.3-B, p.865-868, 2004.

FREITAS S.H., DÓRIA R.G.S., MINTO B.W., NARDI A.B., MELO M.M., CAMARGO L.M., SANTOS M.D., SHIMANO A.C., AMBRÓSIO C.E. Haste intramedular modificada no tratamento de fratura diafisária de fêmur em cão - relato de caso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.35, p.323-328, 2013b.

FREITAS S.H.; DÓRIA R.G.D.; MENDONÇA F.S.; CAMARGO L.M.; PRESSER, C.I.; SANTOS, M.D.; SHIMANO, A.C., AMBRÓSIO, C.E. Avaliação morfológica e por imagem radiográfica da matriz óssea mineralizada heteróloga fragmentada e metilmetacrilato,

preservados em glicerina para reparação de falhas ósseas em tíbias de coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.6, p.765-770, 2013a.

FREITAS S.H.; DÓRIA R.G.S.; MENDONÇA F.S.; SANTOS M.D.; MOREIRA R.; SIMÕES R.S.; CAMARGO L.M.; MARQUES A.T.C.; SIMÕES M.J. Tomografia computadorizada da matriz óssea mineralizada heteróloga fragmentada e metilmetacrilato na reparação de falhas ósseas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, p.1547-1554, 2012.

FREITAS, S. H.; DÓRIA, R. G. D.; MENDONÇA, F. S. et al. Aspecto radiológico de heteroenxerto ósseo cortical fragmentado na reparação de falhas ósseas em coelhos. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.15, n.3, p.107-110, 2008.

FREITAS, S.H.; DÓRIA, R.G.S.; MENDONÇA, F.S.; SANTOS, M.D.; ENGRÁCIA FILHO, J.R.; VIDANE, A.S.; MARQUES, A.T.C.; AMBRÓSIO, C.E. Tomographic imaging of fragmented cortical bone heteroimplant and methylmethacrylate in segmental bone defect of rabbit tibia. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.29, n.12, p.794-800, 2014.

FREITAS, S.H.; DÓRIA, R.G.S.; MÜLLER, A.F.; FADEL, T.R.; MENDONÇA, F.S.; CAMARGO, L.M.; SANTOS, M.D.; AMBRÓSIO, C.E. Região metafisária da tíbia de coelhos: uma opção para estudos dos substitutos ósseos, **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.27, n.3, p.104-09, 2020.

FRIEDLAENDER, G.E. Current concepts review: bone banking. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.64, p.307-311, 1982.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Tratado de histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

GERENTES, P.; VACHOUD, L.; DOURY, J; DOMARD, A. Study of a chitin-based gel as injectable material in periodontal surgery. **Biomaterials**, v.23: 1295-1302, 2002.

GIANNOUDIS, P.; PSARAKIS, S.; & KONTAKIS, G. Can we accelerate fracture healing? A critical analysis of the literature. **Injury**, v. 38, n. 1, p. 81–89, 2007.

GUTIERRES, M.; LOPES, M. A.; HUSSAIN, N. S.; CABRAL, A.T.; ALMEIDA, L.; SANTOS, J.D. Substitutos ósseos: revisão, **Arquivos de Medicina**, v.19, n.4, p.153-162, 2006.

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I. I. Bone remodeling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1092, p. 385–96, 2006.

HUJA, S. S.; ROBERTS, W. E. Mechanics of osseointegration: characterization of supporting bone with indentation testing and backscattered imaging. **Seminars in Orthodontics**, v,10, p.162-173, 2004.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993 -5: 2009.

Biological evaluation of medical devices - Part 5: **Tests for in vitro cytotoxicity**. Geneva, 2009.

International standard: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods. ISO 10993-5, 1992.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. *Histologia Básica*. Ed. 2017.

KALFAS, I. H. Principles of bone healing. **Neurosurgical Focus**, v.10, n.4, p.1-4, 2001.

KANG, C.G.; PARK, Y.B.; CHOI, H.; OH, S.; LEE, K.W.; CHOI, S.H.; SHIM, J.S. Osseointegration of implants surface-treated with various diameters of TiO₂ nanotubes in rabbit. **Journal Nanomaterials**. 2015: 11.doi.org/10.1155/2015/634650.

KAWANO, C. T.; ROMANO NETO, O.; MONTEIRO, A.C. Classificação dos defeitos ósseos e métodos de correção nas artroplastias primárias de joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.33, n.4, p.287-290, 1998.

KERAMARIS, N. C.; CALORI, G. M.; NIKOLAOU, V. S.; SCHEMITSCH, E. H.; GIANNOUDIS, P. V.). Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. **Injury**, v. 39, n.2, p. 45–57, 2008.

KOLAR, P., SCHMIDT-BLEEK, K., PH, D., SCHELL, H., GABER, T., TOBEN, D., SCHMIDMAIER, G.; PERKA, C.; BUTTGEREIT, F.; DUDA, G. N. The Early Fracture Hematoma and Its Potential Role in Fracture Healing. **Tissue Engineering**. n. 4, p. 427–434, 2010.

KUHL, G.S.; RIGO, E.C.S.; VERCİK, L.C.O.; DÓRIA, R.G.S.; SANTOS, M.D.; HAGE, M.C.F.N.S.; AMBRÓSIO, C.E. AMBROSIO; FREITAS, S.H. Aspecto morfológico da interface entre o compósito, constituído de quitosana e polimetilmetacrilato, e a falha óssea de tibia de coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.12, p.1491-1498, 2017.

LEGEROS, R.Z.; CRAIG, R.G. Strategies to affect bone remodeling: osseointegration. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.8, p.583-596, 1993.

MATOS, M. 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, p. 1-5, 2008.

MAYER, L.; OLIVEIRA, M.G.; MASSOTTI, F.P.; GOMES, F.V.; GUYOTI, V.; GONZÁLEZ, F.H.D.; WEBER, J.B.B. Metodologia para avaliação do efeito sistêmico e local da LLLT na osseointegração de implantes dentários em mandíbula de coelhos: nota prévia. **Revista da faculdade de odontologia**, v. 18, n. 2, p. 235-245, 2013.

MELO, E.G.; REZENDE, C.M.F.; BORGES, A.P.B.; NOBREGA NETO, P.I. Aloenxerto ósseo cortical: avaliação do seu emprego em tibia de cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.4, p.385-394, 1998.

MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R.L.C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v.34, n.5, p.831-840, 2011.

MILORI, F.P.; QUITZAN, J.; SOUZA, R.S.; CIRIO, S.M.; DORNBUSCH, P.T.; PRADO, A.M.R.P. Placas ósseas confeccionadas a partir de diáfise cortical equina na osteossíntese femoral em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V.33, n.10, p.1201-1207, 2013.

MONTANDON, C; COSTA, M. A. B; CARVALHO, T. N; JÚNIOR, M. E. M; TEIXEIRA, K. S. Sacroilíte: avaliação por imagem. **Radiologia Brasileira**, v. 40, n. 1, p. 53-60, 2007.

MONTECINOS, B. R.; ZENI, S. N. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo. Utilidad clínica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, v. 43, n. 2, p.

MORAES, P.C.; PADILHA FILHO, J.G.; CANOLA, J.C.; SANTOS, L.A.; MACORIS, D.G.; ALESSI, A.C.; CASTRO, M.B.; DÓRIA NETO, F.A. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. **Acta Cirurgia Brasileira**, v. 19, n. 4, p. 351-359, 2004.

MOREIRA R, DÓRIA RGS, CAMARGO LM, SANTOS MD, MINTO BW, DE NARDI AB, AMBRÓSIO CE, FREITAS SH. Aspecto radiológico e macroscópico de matriz óssea mineralizada heteróloga e polimetilmetacrilato autoclavado em falha óssea de tibia de coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.2, p.173-78, 2014.

MOTA, F. D. C.; REBELLATO, K. R.; MORAES, A. C.; OKUBO, R.; BELO, M. A. A; EURIDES, D. Análise das propriedades mecânicas da tibia de ratos submetida à osteotomia por escareação e tratada com decanoato de nandrolona. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 3, n. 6, p. 57-59., 2010.

MUZZARELLI, C.; MUZZARELLI, R.A. Natural and artificial chitosan-inorganic composites. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.92, p.89-94, 2002.

OLIVEIRA, S.M; MIJARES, D. Q; TURNER, G; AMARAL, I.F; BARBOSA, M.A; TEIXEIRA, C.C. Engineering Endochondral Bone: In Vivo Studies. **Tissue Engineering**. Part A, v.15, n.3, p.635-643, 2009.

PEREIRA, C. C. S., JARDIM, E. C. G., CARVALHO, A. C. G. S., GEALH, W. C., MARÃO, H. F., ESPER, H. R., & JÚNIOR, I. R. G. Técnica cirúrgica para obtenção de enxertos ósseos autógenos intrabucais em reconstruções maxilomandibulares. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial**, 2012.

PESSOA, E. A. M., BRAUNE, A., CASADO, P. L., & TANNURE, P. N. Enxertos ósseos alveolares na fissura labiopalatina: protocolos atuais e perspectivas futuras. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, 27(1), 49-55, (2017).

PHILLIPS, A. M. Overview of the fracture healing cascade. **Injury**, v. 36 n. 3, p. 5–7, 2005.

PIRES A.L.R., BIERHALZ A.C.K.; MORAES Â.M. **Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. Química Nova**, v.38, p957-971, 2015.

POLO-CORRALES, L., LATORRE-ESTEVEZ, M., E RAMIREZ-VICK, J. E. Scaffold design for bone regeneration. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v.14(1), p. 15-56, 2014.

PRECHEUR, H.V. Bone Graft Materials. **Dental Clinics of North. America.**, v.51, p.729-746, 2007.

RANZANI, J. J. T.; SAMPAIO, G. R.; FRANCO, M.; CASTRO, G. B. Aplicação de membrana biológica heteróloga conservada em glicerina, na reparação de lesão em coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, v.8, p.35-45, 1996.

REZENDE, C.M.F; BORGES, A.P.B.; BERNIS, W.O.; MELO, E.G.; NOBREGA NETO, P.I. Aspecto clínico-cirúrgico e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.5, p.537-545, 1998.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v.31 (7), p. 603-632, 2006.

ROGERO, S.O.; LUGAO, A.B.; IKEDA, TAMIKO, I.; CRUZ, Á.S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v.16, n. 3, p.317-320, 2003.

ROZEN, N.; LEWINSON, D.; BICK, T.; MERETYK, S.; SOUDRY, M. Role of bone regeneration and turnover modulators in control of fracture. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 17, n. 3, p. 197–213., 2007.

SABOIA, V. de P. A.; SAITO, S. K.; PIMENTA, L. A. F. Aspectos micromorfológicos da interface adesiva em função da variação no preparo do espécime. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 340-344, 2000.

SANTOS, J. E. Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de shiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. **Dissertação de doutoramento**, Universidade federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, 2004.

SARAIVA, G. L.; CASTRO-LAZARETTI, M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação óssea na Prática Clínica. **Arquivo brasileiro de endocrinologia e metabologia**, v. 46, n.1, p. 72-78, 2002.

SCHINDELER, A.; MCDONALD, M. M.; BOKKO, P.; LITTLE, D. G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, p. 459–466, 2008.

SERHAN, H.; SLIVKA, M.; ALBERT, T.; KWAK, S.D. Is galvanic corrosion between titanium alloy and stainless steel spinal implants a clinical concern? **Spine Journal**, v.4, n.4, p.379-87, 2004.

SILVA, A. M.; DEL CARLO, R. J.; VILORIA, M. I. V. et al. Matriz óssea homóloga desmineralizada na preparação de falhas ósseas segmentares produzidas no rádio de coelhos. **Ciência Rural**, v.33, p.539-545, 2003.

SILVEIRA, M. Preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. São Paulo: USP, 1989. v.1, p.71-79.

SINIBALDI, K. Evaluation of full cortical allografts in 25 dogs. **Journal of America Veterinary Medicine Association**, v.194, n.11, p.1570-1577, 1989.

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

SOUZA, S. L. S; et al. Biomateriais na instalação de implantes osseointegrados. **Periodontologia e implantodologia: soluções estéticas e recursos clínicos**. Ed. Napoleão: Nova Odessa, 2010.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R.M.; MARCANTONIO, R.A.C.; MARCANTONIO-JÚNIOR, E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e

odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37(2), p. 155-161, 2008.

SUOMINEN, E.A.; AHO, A.J.; JUHANOJA, J.; Yli-Urpo, A. Hydroxyapatiteglass composite as a bone substitute in large metaphyseal cavities in rabbits. **International Orthopaedic**, v.19, p.167-173, 1995.

TAKAYANAGI, H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, n. 3, p. 170–179, 2005.

TIMM, L.L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI, Canoas**, v.2, n.1, p.231-239, 2005.

TSIRIDIS, E.; UPADHYAY, N.; GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? **Injury**, v. 38, n. 1, p.11–25, 2007.

TURRER, C.L.; FERREIRA, F.P.M. Biomateriais em cirurgia craniomaxilofacial: princípios básicos e aplicações: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.23, p.234-239, 2008.

VILELA, L.M.; DEL CARLO, R.J.; OLIVEIRA, R.C.; RODRIGUES, M.C.D.; MONTEIRO, B.S.; REIS, A.M.S; MACHADO, D. P.D. Propriedades mecânicas de meniscos frescos de coelhos e preservados em glicerina 98%. **Ciência Rural**, v.40, p.1114-1120, 2010.

VON RECUM, A.F.; LABERGE, M. Educational goals for biomaterials science and engineering: perspective view. **Journal of Applied**, v.6, p.137-144, 1995.

WEINFELD, I.; MAGALHÃES, L.V.; VILA, N. Estudo histológico de um novo material (biobone) indicado para reparação óssea. **Revista Paulista de Odontologia**, v.21, p.9-10, 1999.