*Estudo da Influência das dimensões dos
Grânulos de Hidroxiapatita na
Integração Óssea*

Autor: Adriana dos Santos Barone Moreira

Orientador: Prof. Dr. Helton Luiz A. Defino

**BIOENGENHARIA
USP**

Curso de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia

*Escola de Engenharia de São Carlos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Instituto de Química de São Carlos*

Adriana S. Barone Moreira

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS DIMENSÕES DOS GRÂNULOS
DE HIDROXIAPATITA NA INTEGRAÇÃO ÓSSEA**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS DIMENSÕES DOS GRÂNULOS
DE HIDROXIAPATITA NA INTEGRAÇÃO ÓSSEA**

ADRIANA S. BARONE MOREIRA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO
CARLOS DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO PARA OBTENÇÃO DE TÍTULO
DE MESTRE EM FISIOTERAPIA

ORIENTADOR: Prof. Dr. HELTON L. A. DEFINO

CO-ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a MARIA ANGELES L. VELLUDO

**RIBEIRÃO PRETO
2000**

Class.	TF SE-EEQU
Cutt.	3800
Tombo	T0254/00

112 9942

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto / USP

Moreira, Adriana dos Santos Barone

Estudo da influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita
na integração óssea. Ribeirão Preto, 2.000.

64 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Escola de Engenharia de
São Carlos e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto /USP.

Orientador: Defino, Helton Luíz Aparecido.

1. Osteointegração. 2.Hidroxiapatita. 3.Grânulos.

Universidade de São Paulo
Curso de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia
Escola de Engenharia de São Carlos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Instituto de Química de São Carlos

Av. Dr. Carlos Botelho, 1465 - C.P. 359 - 13560-970 - São Carlos - SP - BRASIL
Tel. (016) 273-9585 Fax: (016) 273-9586 Email: bioeng@sc.usp.br

**MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DA ALUNA ADRIANA DOS SANTOS BARONE APRESENTADA AO CURSO DE
PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA EESC/FMRP/IQSC-
USP, EM 24/03/00.**

Prof. Dr. Helton L. A. Defino (orientador) – FMRP/USP

Prof. Dr. José Batista Volpon – FMRP-USP

Prof. Luiz Antonio Salata – FMRP-USP

A ciência se compõe de erros que,
por sua vez,
são os passos até a verdade.

Julio Verne
(1828-1905)

Dedicatória

*aos meus pais, Mário (in memorian) e Josephina,
pelos ensinamentos recebidos, amor e incentivo
sempre.*

ao meu marido, Lécio pelo apoio, respeito e amor.

*ao meu querido filho, Lécio que foi o incentivo
constante para que eu concluísse este trabalho.*

AGRADEÇO

ao **Prof. Dr. Helton L. Defino**, pela orientação na realização deste trabalho;

à **Profa.Dra. Maria Angeles L. Velludo**, pela valiosa co-orientação;

ao **Laboratório de Cirurgia Experimental e Técnica Cirúrgica** do Departamento de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, especialmente ao biólogo, **Hermes Murtha Oliveira**, pela contribuição na parte experimental deste trabalho;

ao Serviço de Radiodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, especialmente à funcionária **Maria Cristina K. Ioshimine**, pelo auxílio na realização das radiografias;

ao **Dr. Luiz Henrique Damasceno**, pela colaboração na realização do projeto;

à **Dra. Leonir Terezinha Feltrin**, pela análise dos resultados radiológicos;

à **Sra. Auristela de Mello Martins**, pela confecção das lâminas;

à **Dra. Mônica T. Pastorello** e ao **Dr. Cleto D. Noqueira**, pelo auxílio na análise dos resultados histológicos;

à **Prof. Dra. Elvira Maria C. Silva**, pela análise estatística;

ao **Prof. Dr. Nilton Mazzer** e à **Ft. Marisa de Cássia Fonseca**, pela compreensão, colaboração e oportunidades concedidas para realização deste trabalho;

a todos os amigos da **Seção de Reabilitação Neuro-Muscular**, especialmente do ambulatório, pelo apoio e tolerância;

aos funcionários e colegas do **Laboratório de Bioengenharia** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao **Adriano**, pela grande ajuda com o computador;

às funcionárias **Sra. Rosa P. Brittes Alves**, **Sra. Maria de Fátima F. Lima** e **Sra. Elisângela B. Oliveira** do Departamento de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela colaboração;

à **Baumer Ortopedia**, pelo fornecimento do material empregado neste trabalho;

à minha mãe **Josephina**, pelo seu constante incentivo e pelos cuidados com o meu filho nas minhas horas ausentes;

ao meu marido **Lécio**, pelo incentivo e companheirismo;

ao meu filho **Lécio**, pelos momentos felizes e confortantes que traz à minha vida;

aos meus **tios e tias**, meus torcedores constantes, pelo interesse e amor;

a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
RESUMO	iii
SUMMARY.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Biomateriais.....	2
1.2 Hidroxiapatita	3
1.2.1 Origem.....	7
1.2.1.1 Provenientes de corais.....	7
1.2.1.2 Provenientes de ossos bovinos	8
1.2.1.3 Sintéticas	9
1.2.2 Propriedades Mecânicas.....	11
1.2.3 Configuração, Densidade e Tamanho dos Poros	12
2 OBJETIVO DO TRABALHO.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Material	16
3.1.1 Animal Utilizado.....	16
3.1.2 Hidroxiapatita	16
3.2 Métodos.....	17
3.2.1 Modelo Experimental.....	17
3.2.2 Técnica Cirúrgica.....	19
3.2.3 Grupos Experimentais	20
3.2.4 Coleta de material	21
3.2.5 Métodos de Avaliação.....	22
3.2.5.1 Estudo Radiológico.....	22
3.2.5.2 Estudo Histológico.....	24
3.3 Análise Estatística.....	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Considerações Gerais.....	26
4.2 Avaliação Radiológica	26
4.2.1 Período Pós-operatório imediato	26
4.2.2 Período Pós-operatório de 30 dias	27
4.2.3 Período Pós-operatório de 90 dias	27
4.2.4 Período Pós-operatório de 180 dias	28
4.3 Análise com Paquímetro	28
4.4 Avaliação Histológica	30
4.4.1 Período Pós-operatório de 30 dias	30
4.4.2 Período Pós-operatório de 90 dias	31
4.4.3 Período Pós-operatório de 180 dias	31
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÕES.....	53
ANEXOS	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia ilustrando as diferentes dimensões dos grânulos de hidroxiapatita utilizados para preenchimento das falhas ósseas produzidas: Tipo I (212 μ); B: Tipo II (500 μ) e C: Tipo III (1.000 μ).....	17
Figura 2. A: Abordagem cirúrgica da superfície óssea por meio de incisão longitudinal na face ântero-lateral da coxa do animal, para a criação da falha óssea. B: Falha óssea produzida. C: Preenchimento da falha óssea produzida com grânulos de hidroxiapatita do tipo II.	18
Figura 3. Fotografia ilustrando o paquímetro digital utilizado para realizar as mensurações das falhas ósseas.....	24
Figura 4. Radiografias em perfis de diferentes animais demonstrando a localização das falhas ósseas produzidas e o preenchimento destas com os grânulos de H.A. Tipo I, Tipo II e Tipo III e o controle (sem preenchimento). A, B, C e D: Radiografias do pós operatório imediato das falhas preenchidas com a H.A. Tipo I, Tipo II e Tipo III e controle, respectivamente. Observar imagem radiopaca da H.A. E, F, G e H: Radiografias com 30 dias de pós-operatório das falhas preenchidas com a H.A. Tipo I, Tipo II e Tipo III e controle, respectivamente, ilustrando a presença de reação periostal nas falhas e início do remodelamento do canal medular. Observar início de formação do osso cortical (H).....	33
Figura 5. A, B, C e D: Radiografias das falhas ósseas produzidas após 90 dias de cirurgia de diferentes animais, preenchidas com os grânulos de hidroxiapatita Tipo I, Tipo II e Tipo III e controle, respectivamente, demonstrando aumento da reação periostal nas falhas em relação ao período anterior. Observar completa reorganização da falha do grupo controle (D). E, F, G e H: Radiografias das falhas após 180 dias de evolução, realizadas em diferentes animais, preenchidas com os grânulos de H.A. Tipo I, Tipo II, Tipo III e controle, respectivamente demonstrando diminuição da reação periostal nas falhas em relação ao período de 90 dias de pós-operatório. Observar reorganização óssea nas falhas.	34
Figura 6. Gráficos ilustrando os resultados radiológicos em relação à formação óssea nas falhas preenchidas com os grânulos de H.A. Tipo I (212 μ), Tipo II (500 μ), Tipo III (1.000 μ) e controle. A: 30 dias de pós operatório. B: 90 dias de pós-operatório. C: 180 dias de pós-operatório.....	35
Figura 7. Gráficos demonstrando os resultados radiológicos envolvendo o remodelamento do canal medular e do osso cortical nas falhas preenchidas com os grânulos de H.A. Tipo I (212 μ), Tipo II (500 μ) e Tipo III (1.000 μ). A: 30 dias de pós operatório. B: 90 dias de pós-operatório. C: 180 dias de pós-operatório.	36
Figura 8. Gráfico ilustrando a presença da reação periostal nas falhas ósseas dos grupos experimentais I, II, III e controle, com 30, 90 e 180 dias de pós-operatório. Observar maior aumento da reação periostal no período com 90 dias de pós-operatório.	37
Figura 9. A, B e C: Fotografias de lâminas histológicas coradas pela técnica hematoxilina-eosina, de falhas ósseas de fêmures de ratos, preenchidas com grânulos de hidroxiapatita do tipo I (212 μ) respectivamente após 30, 90 e 180 dias de evolução, evidenciando união óssea (1), osso trabecular (2) e presença	

de osso cortical (3) (20x).Observar presença de grânulos de H.A. na falha (A) e completa reorganização esponjosa e cortical da falha (C).	38
Figura 10. A, B, e C:.. Fotografias de lâminas histológicas coradas pela técnica hematoxilina-eosina, de falhas ósseas de fêmures de ratos, preenchidas com grânulos de hidroxiapatita do tipo II (500 μ), nos períodos de 30, 90 e 180 dias de pós operatório, respectivamente demonstrando o tipo de união óssea na falha (1), formação de osso esponjoso (2) e reorganização de osso cortical (3) (20x).Observar completa reorganização da falha óssea (C).	39
Figura 11. A, B, e C: Fotografias de lâminas histológicas de falhas ósseas coradas pela técnica hematoxilina-eosina, de fêmures de ratos, preenchidas com grânulos de hidroxiapatita do tipo III (100 μ), após 30, 90 e 180 dias do ato cirúrgico, respectivamente, evidenciando a presença de união óssea (1), reorganização esponjosa (2) e formação de osso cortical (3) (20x). Observar união fibrosa (1A), união osteocondral (1B) e completa reorganização da falha (C).	40
Figura 12. Fotografia de lâmina histológica corada pela técnica hematoxilina-eosina, de falha óssea de fêmur de rato do grupo controle após 180 dias de pós operatório, demonstrando completa reorganização da falha (1), completa reorganização esponjosa (2) e osso cortical completamente formado (3). (20x).	41
Figura 13. Gráficos demonstrando os resultados histológicos em relação ao tipo de união óssea nas falhas preenchidas com os grânulos de H.A. do Tipo I (212 μ), tipo II (500 μ) e Tipo III(1.000 μ) e o controle, após 30, 90 e 180 dias de cirurgia. A: 30 dias de pós-operatório. B: 90 dias de pós-operatório. C: 180 dias de pós-operatório.	42
Figura 14. Gráficos demonstrando os resultados histológicos em relação à reorganização esponjosa nas falhas preenchidas com os grânulos de H.A. do Tipo I (212 μ), tipo II (500 μ) e Tipo III (1.000 μ) e o controle, após 30, 90 e 180 dias de cirurgia. A: 30 dias de pós-operatório. B: 90 dias de pós-operatório. C: 180 dias de pós-operatório.	43
Figura 15. Gráficos demonstrando os resultados histológicos em relação à reorganização do osso cortical nas falhas preenchidas com os grânulos de H.A. do Tipo I (212 μ), tipo II (500 μ) e Tipo III (1.000 μ) e o controle, com 30, 90 e 180 dias de pós cirúrgico. A: 30 dias de pós-operatório. B: 90 dias de pós-operatório. C: 180 dias de pós-operatório.	44

RESUMO

Este estudo teve como finalidade analisar experimentalmente a aplicação de diferentes tamanhos de grânulos de hidroxiapatita em falhas ósseas produzidas em ambos os fêmures de ratos machos da raça Wistar e investigar as correlações dos tamanhos dos grânulos com a quantidade de tecido ósseo neoformado. Cada falha óssea foi preenchida com um dos três tamanhos de grânulos de hidroxiapatita utilizados neste estudo (212 μ , 500 μ e 1000 μ).

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais compostos por 15 animais cada, sendo que cada grupo foi sacrificado de acordo com a data do sacrifício: 30, 90 e 180 dias de período de pós-operatório, respectivamente e posteriormente submetidos ao estudo histológico. No terceiro grupo experimental, foi também realizado estudo radiológico no período de pós-operatório imediato, aos 30, 90 e 180 dias. O grupo controle, composto por 10 animais, que não tiveram preenchimento de suas falhas ósseas, foram submetidos aos estudos histológico e radiológico nos mesmos períodos que o terceiro grupo experimental.

De acordo com os resultados dos estudos radiológico e histológico, concluiu-se que a hidroxiapatita empregada foi biocompatível, no entanto, atrasou o processo de reparação óssea na falha, enquanto que o grupo controle apresentou os melhores resultados, com completa reorganização da falha óssea com apenas 90 dias de período de pós-operatório.

SUMMARY

This study evaluated the hydroxyapatite granules osteointegration in defects produced on both femurs of Wistar rats. The defects were filled with one of the three different sizes of hydroxyapatite granules (212 μ , 500 μ and 1.000 μ). The rats were divided in 3 groups of 15 animals, which were sacrificed at 30, 90 and 180 days after the operation, followed by histological study of the femurs and radiological study of the latter group. The control group, of 10 animals, had no filling of it's defects and had radiological study and were sacrificed at 180 days after the operation, followed by histological study.

It concludes from radiological and histological studies that all sizes of hydroxyapatite granules applied were biocompatible, although it delayed the bone repair. In this study the bone restoration was better observed on the control group.

Key words: osteointegration, hydroxyapatite, granules.

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A busca por enxertos que promovam uma osteointegração mais efetiva com a função de restabelecer, remodelar ou reforçar estruturas ósseas, fez com que muitos pesquisadores procurassem novos materiais sintéticos que pudessem suprir algumas necessidades encontradas nos enxertos autógenos, homogêneos e heterogêneos que, embora possuam efeitos biológicos e mecânicos eficientes, apresentam algumas limitações em seu uso, como a necessidade de grandes quantidades de enxerto ósseo, presença de reações imunológicas, alterações das propriedades mecânicas do enxerto e dificuldade no armazenamento.

A escolha e a aplicação de materiais aloplásticos para implantes cirúrgicos têm sido diretamente dependentes dos perfis de biocompatibilidade, sendo esta definida por WILLIAMS & ROAF (1973) como: *habilidade de um material realiza uma resposta apropriada em uma aplicação específica*. Outra definição para biocompatibilidade tem sido baseada nas interações entre os implantes sintéticos e os tecidos orgânicos, resultando em mínima agressão ao hospedeiro e ao material implantado (LEMONS, 1996) promovendo, desta forma, uma interface estável entre o tecido e o biomaterial implantado.

1.1 Biomateriais

WILLIAMS (1982) definiu biomaterial como qualquer substância ou combinação de substâncias que não drogas, sintéticas ou de origem natural, que podem ser utilizadas por período de tempo indeterminado, como um todo ou como parte de um sistema que trata, melhora ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo.

Os biomateriais são divididos em: metálicos, cerâmicos, polímeros e compostos de acordo com as ciências dos materiais. As cerâmicas de interesse em nosso estudo apresentam larga aplicação biológica e são denominadas biomateriais, podendo ser completamente reabsorvíveis ou não, de acordo com o seu comportamento biológico, sendo amplamente empregadas em cirurgias ortopédicas, traumatológicas e odontológicas (MARIOLANI & ARRUDA, 1991).

Os biomateriais cerâmicos oferecem várias vantagens para os implantes musculoesqueléticos e para as interações diretas com o osso como, por exemplo, poderem ser constituídos de elementos que são naturais no ambiente biológico humano, por promoverem condutividade térmica e elétrica controlada; serem utilizadas como uma interface de inércia ou como uma barreira isolante entre os materiais e os tecidos, apresentar densidade e cor semelhantes aos ossos e dentes, proporcionam moldagens elásticas que são semelhantes ao osso (LEMONS, 1996).

Dentre os materiais cerâmicos mais utilizados para substituições ósseas, destacamos os minerais de fosfatos de cálcio (Hidroxiapatita (H.A) e Fosfato Tricálcio), pois permitem a determinação de seu formato e tamanho, têm facilidade em sua fabricação (JARCHO, 1981), oferecem recursos para que ocorra a

osteocondução e, devido à sua biocompatibilidade, ligam-se diretamente ao osso sem interposição de tecido fibroso (LANGE & DONATH, 1989). Este contato direto entre o tecido vivo e o biomaterial é definido como *osseointegração* (ALBREKTSSON & ALBREKTSSON, 1987), sendo possível devido às semelhanças iônicas destes compostos.

Os materiais de fosfato de cálcio podem ter origem natural ou sintética e podem ser utilizados em diferentes formas físicas como partículas densas ou porosas ou, ainda, em forma de blocos. São usados para revestimento de implantes metálicos, reparação e ou substituição óssea (LE GEROS, 1993).

1.2 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita, que é um sal de fosfato de cálcio com uma organização cristalina bastante complexa, sendo o mais eficaz dos biomateriais osteocondutores. É representada pela fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, onde cada cristal de hidroxiapatita é formado por centenas ou milhares destas unidades, que se mantêm unidas através de atrações eletrostáticas de seus átomos. Normalmente o cristal de hidroxiapatita apresenta forma hexagonal com os átomos das unidades dispondo-se de forma bastante complexa para um fosfato de cálcio.

Estudos de difração de Raios X, mostraram que a hidroxiapatita sintética e dos cristais ósseos são semelhantes. O tamanho dos cristais de hidroxiapatita e ósseos são similares, variando suas dimensões em aproximadamente a $25 \text{ a } 50 \text{ \AA} \times 400 \text{ \AA} \times 200 \text{ a } 350 \text{ \AA}$, apresentando sua arquitetura biocompatível com a estrutura óssea humana (TUREK, 1991).

A cerâmica de hidroxiapatita vem sendo estudada por se tratar de uma substância bioativa não tóxica, que provoca pouca reação tecidual, mostrando-se um importante recurso para a substituição óssea (USCHIDA et al. 1990). Seu emprego tem se destinado ao preenchimento de falhas ósseas e reconstrução de defeitos ósseos (após ressecções tumorais), revestimentos de componentes metálicos para fixação promovendo uma cimentação óssea bioativa e revestimento de superfícies de metais porosos, sem cimento, fornecendo uma fixação mais rígida e forte (OONISH, 1991).

A cerâmica de hidroxiapatita vem sendo também empregada clinicamente com grande sucesso na odontologia para o tratamento cirúrgico dos defeitos periodontais (KENNEY, et al. 1984).

Entre as vantagens para o uso dessa cerâmica, destacamos a ausência de reação imunológica, o que comprova sua biocompatibilidade (CHIROFF et al. 1975); (CROCI et al.,1992); (OLIVEIRA et al.,1993); (EVANS,1991) e (DEFINO et al. 1998); permite adequado preenchimento ósseo, ausência de mudanças morfológicas no pós-operatório e estimula a formação de tecido novo (OONISH, 1991), embora não esteja comprovada sua capacidade osteogênica (ITATANI & MARSHALL, 1984 apud SARTORIS et al.,1986)¹. Não há evidências conclusivas de que a hidroxiapatita seja osteoindutora, porém é considerado seu poder de osteocondução, permitindo o crescimento intrínseco ósseo (BUCHOLZ, et al. 1987).

A hidroxiapatita e o trifosfato de cálcio durante a sua biorreabsorção liberam íons de fosfato e cálcio. A degradação do implante ocorre pela dissolução

¹ITATANI C, MARSHALL G J. Cellular responses to implanted replamineform hydroxyapatita (abstr). Trans Orthop Res Soc. 9: 123,1984.

simples ou pelo processo de fagocitose realizado pelos osteoclastos. Segundo, BUCHOLZ, et al. (1987), a taxa de biodegradação depende da composição química do cristal, e também de sua densidade, área de superfície exposta e de sua proximidade com os tecidos moles e osso. Estudos sugerem que o trifosfato de cálcio dissolve muito mais rapidamente do que a hidroxiapatita, especialmente quando colocado em tecidos moles.

Os processos de biodegradação e biorreabsorção dos materiais de fosfato de cálcio (Ca-P) resultam em alterações físico-químicas, após o seu contato com o meio biológico. As mudanças físicas podem incluir:

- 1) desintegração ou quebra do material em partículas menores;
- 2) perda da força mecânica;
- 3) perda da densidade;
- 4) alterações de micro e macro porosidades;
- 5) alterações do tamanho e/ou peso do implante.

As alterações químicas incluem:

- 1) diminuição do pH no meio do implante causando dissolução parcial do material;
 - 2) redução do tamanho das partículas ou do cristal de cálcio fosfato individualmente;
 - 3) aumento nas concentrações de íons de fosfato de cálcio no meio biológico, levando à formação e depósito de outros Ca-P intimamente associados com matriz orgânica sobre a superfície dos materiais de fosfato de cálcio;
-

- 4) incorporação destes cristais no interior de osso novo formado na interface óssea entre o implante e o hospedeiro (LE GEROS, 1993).

A atividade celular durante a biodegradação e biorreabsorção ocorrem no meio ácido, entretanto, os fatores que afetam a solubilidade ou a dissolução destes materiais de Ca-P são importantes. A liberação de íons de Ca-P no meio biológico pela dissolução desses materiais afetam a proliferação e atividades celulares. O aumento nas concentrações de íons de Ca-P promovem a formação de apatita carbonata, que são similares à apatita óssea. A composição e o material apatítico inicial dependem do pH, temperatura, composição da solução e molde de preparo (LE GEROS, 1993).

Todos os implantes deveriam ser completamente reabsorvidos, permitindo, com isso, um remodelamento gradual do crescimento interno ósseo. Infelizmente, até o momento, não estão disponíveis implantes que tenham propriedades químicas e estruturais padronizadas para permitir prognosticar de forma precisa a taxa de sua biodegradação (BUCHOLZ, et al. 1987).

USCHIDA, et al (1990) utilizam, desde 1983, clinicamente, a cerâmica de hidroxiapatita para preenchimento de superfícies ósseas após ressecção e curetagem de tumores ósseos benignos, e têm obtido bons resultados, tais como a ausência de reações imunológicas, satisfatório preenchimento dos defeitos ósseos auxiliando a osteogênese, confirmando que a cerâmica de hidroxiapatita é um eficiente substituto ósseo.

1.2.1 Origem

1.2.1.1 Provenientes de corais

A hidroxiapatita de origem natural proveniente de corais é formada por recifes encontrados em regiões costeiras do pacífico sul e oeste da Índia (HOLMES, 1979). A couraça destes corais é formada pelos invertebrados marinhos que extraem cálcio e carbonato das águas oceânicas (HOLMES et al., 1984). Estes corais, submetidos a uma conversão química por meio de trocas hidrotermais, permitem a conversão do carbonato de cálcio em hidroxiapatita pura, representada pela fórmula química, já mencionada, $\text{Ca}_{10} [\text{PO}_4]_6 [\text{OH}]_2$. A estrutura do coral permanece inalterada após a conversão química e os grânulos de hidroxiapatita, resultantes desta conversão, ficam destituídos de qualquer matéria orgânica (BUCHOLZ, et al. 1987).

O estudo dos corais tem se direcionado para dois tipos, os quais apresentam arquitetura microscópica semelhante ao osso, sendo adequados para conduzir a osteogênese humana, (WEBER & WHITE, 1973). O gênero *Porites* tem dimensões em média de 230 μ de diâmetro, interconectados por fenestrações de 190 μ de diâmetro; apresentando configurações parecidas com enxerto autógeno, sendo mais utilizado como um enxerto cortical para tratamento das fraturas cominutivas (HOLMES et al. 1984). O gênero *Goniopora*, da ordem *Scleractinian*, conhecido como um “coral verdadeiro” é cercado por inúmeros invertebrados marinhos com poros em sua carcaça (WEBER & WHITE, 1973) apresenta sua microestrutura

semelhante ao osso esponjoso, sendo utilizado em defeitos ósseos subcondrais e fraturas metafisárias de ossos longos (HOLMES et al., 1984).

O primeiro estudo realizado com hidroxiapatita derivada de corais para preenchimento de falhas ósseas, foi iniciado na década de 70. O experimento consistiu na colocação de cilindros de hidroxiapatita, medindo 5mm de diâmetro em osso esponjoso da porção distal do fêmur e proximal da tíbia de cachorros, mostrando que não havia formação de tecido fibroso ou células inflamatórias interpostas entre o implante e a superfície óssea, reforçando a idéia de biocompatibilidade (CHIROFF, et al. 1975) .

FIGUEIREDO et al. (1997) fizeram um estudo experimental comparando a utilização da hidroxiapatita porosa de coral e enxerto ósseo autógeno em defeitos metafisários fêmorais distais de coelhos e obtiveram resultados semelhantes entre os dois tipos de implantes, concluindo que a hidroxiapatita é um substituto adequado para os enxertos ósseos.

1.2.1.2 Provenientes de ossos bovinos

Outra fonte da hidroxiapatita de origem natural é proveniente do osso bovino. Este tipo de hidroxiapatita é obtida através da calcinação do osso bovino cortical e medular a 1.000°C, resultando em um produto bastante pesado com alta densidade, estando disponível para o uso na forma macrogranular, microgranular e na forma de blocos (TAGA,1998).

A indicação para este tipo de biomaterial se direciona para a cirurgia buco-maxilo-facial, cirurgia ortognática e, talvez, a cirurgia plástica.

1.2.1.3 Sintéticas

Existem vários tipos de hidroxiapatitas sintéticas não reabsorvíveis disponíveis no mercado mundial. Normalmente, este tipo de hidroxiapatita sofre um processo denominado *sinterização*, que é o tratamento térmico da cerâmica próximo ao seu ponto de fusão. Nesta técnica, a hidroxiapatita é levada até 1.100°C e mantida nesta temperatura por cerca de 3 a 4 horas (TAGA,1998). Ao final deste processo, surgem alterações dramáticas nas propriedades cristalinas deste biomaterial. As unidades que compõem o biomaterial fortalecem suas ligações eletrostáticas fazendo que o material seja mais compacto. Outra propriedade modificada é a superfície do cristal que se torna mais lisa e principalmente torna o material insolúvel ao meio fisiológico (TAGA,1998).

Este tipo de hidroxiapatita é indicada nos casos de cirurgia buco-maxilo-facial, cirurgia ortognática e para preenchimento de defeitos ósseos.

Cerâmicas de H.A. obtidas por métodos sintéticos diferem em sua cristalinidade. Diferenças nas temperaturas de sinterização promovem alterações na dissolução do cristal e portanto, na sua bioatividade, perfeição e, ainda, no tamanho do cristal. Cristais menores de mesma composição irão dissolver mais rapidamente que cristais maiores devido à maior área de superfície exposta ao ambiente biológico. Da mesma forma, cristais com maior número de defeitos lácides vão dissolver mais rapidamente que aqueles com menores defeitos (LE GEROS, 1993).

DACULSI et al. (1979) apud LEGEROS (1993)¹ demonstraram que cristais cerâmicos preparados a 900°C têm maior número de defeitos lápides que aqueles aquecidos a 1200°C. Isso reflete na alta taxa de dissolução de H.A. preparada numa temperatura mais baixa.

A H.A. coralline (pó) apresenta melhor extensão de dissolução que a H.A. sinterizada e isto não é conseqüente apenas à sua composição, mas também nas diferenças de suas cristalinidades. Estas diferenças de cristalinidade e de composição são conseqüentes aos métodos de preparo e de suas origens (LE GEROS, 1993).

OLIVEIRA et al. (1993) analisaram a resposta tecidual às micropartículas de hidroxiapatita, quando implantados em tecido subcutâneo de ratos, e observaram a ausência de reações imunológicas exacerbadas, confirmando a biocompatibilidade do material.

CROCI et al (1994) utilizaram a hidroxiapatita como substituto de enxerto ósseo autólogo após ressecção intracapsular, seguido de colocação de hidroxiapatita em 31 pacientes com diagnóstico de lesões ósseas benignas. Concluíram que o emprego da hidroxiapatita é uma boa opção como substituto de enxerto ósseo autólogo.

DEFINO et al., (1998) utilizaram microgrânulos de hidroxiapatita sintética para preenchimento de falhas ósseas de 1,00cm de diâmetro, realizadas em tibia de cães com objetivo de estudar a osteointegração e observaram que houve reparação da falha com grande quantidade de tecido ósseo.

¹ Daculsi, G.; Kerebel, G. e Kerebel, L.M. – Mechanisms of acid dissolution of biological and synthetic apatite crystals at the lattice pattern level. Caries Res., 13:277-289, 1979.

1.2.2 Propriedades Mecânicas

Embora a hidroxiapatita proveniente de corais não suporte forças como o osso trabecular e não exiba propriedades plásticas devido à ausência de colágeno, (TORGALKAR, 1979; TENCER, 1984) ela se fortifica à medida que ocorre o crescimento intrínseco do osso, embora seja menos compacta da que materiais de enxerto autógeno (HOLMES et al., 1983).

Os estudos relacionados a testes mecânicos (HOLMES et al., 1984) demonstraram que a hidroxiapatita derivada dos corais *Goniopora* é significativamente mais fraca que o osso esponjoso e não apresenta comportamento plástico. Porém, após um período de 6 meses da implantação da hidroxiapatita no osso esponjoso, notaram um aumento triplo de sua resistência mecânica quando comparado ao tecido esponjoso normal, e concluíram que essas mudanças resultam da sobreposição de osso neoformado sobre as trabéculas do enxerto, resultando numa estrutura mais densa.

A hidroxiapatita suporta cargas compressivas com moderação, porém se fragmenta quando sujeita à força de cisalhamento (HOLMES et al., 1984).

Em 1988, foi iniciado um trabalho pioneiro no Brasil, para o preenchimento de lesões cavitárias benignas com o composto de trifosfato de cálcio a 20% e com hidroxiapatita a 80%. A associação destes compostos é utilizada por ser o primeiro composto reabsorvido mais rapidamente, ao passo que o segundo determina maior resistência mecânica, por ser sua substituição mais lenta, concluindo que esta técnica é boa alternativa pela sua biocompatibilidade e resistência mecânica.

ROSSI et. al (1993) utilizaram como material de enxerto o composto de hidroxiapatita e polimetilmetacrilato. Foram realizados testes comparativos de compressão axial em 10 corpos de prova cilíndricos à base de compósito e 10 de polimetilmetacrilato puro (controle). O composto apresentou resistência, elasticidade e rigidez significativamente menores que o cimento acrílico. Concluíram que o compósito de hidroxiapatita-polimetilmetacrilato não deveria ser utilizado em casos de solicitação mecânica elevada.

1.2.3 Configuração, Densidade e Tamanho dos Poros

A hidroxiapatita derivada do coral apresenta seus poros com tamanho uniforme, configurações e fenestrações interconectadas. Apresenta teoricamente vantagens vasculares para o crescimento ósseo, quando comparada a outros tipos de cerâmica (fosfato tricálcio), que não possuem uniformidade em seus poros. No entanto, ainda há controvérsias sobre esta teoria .

Sólidos porosos têm a vantagem de permitir circulação de fluidos corpóreos e aumentam o potencial para uma firme fixação com o tecido ósseo. A hidroxiapatita, sendo um material poroso, inorgânico e estéril, deve ser altamente compatível com o tecido corpóreo e, quando usadas como um implante ósseo, pode se integrar com o osso (ROY & LINNCHAN, 1974).

A escolha do tamanho do poro, segundo KLAWITTER & HULBERT (1971), para se obter o crescimento ósseo efetivo, é de 150 μ . Porém, estudos de FLATLEY et al. (1983) recomendam um diâmetro maior, de 500 μ , baseado em seus experimentos.

O tamanho ideal do poro depende da localização do defeito a ser preenchido. Sendo assim, sua estrutura deverá ser morfológicamente semelhante à área a ser preenchida. Entretanto, a *Goniopora* deverá ser utilizada em defeitos esponjosos, enquanto que o *Porites* com 200 a 250 μ de diâmetro podem ser preferíveis para a substituição cortical. (BUCHOLZ et al., 1987).

Nas cerâmicas de hidroxiapatita sintética, a microporosidade é uma consequência da temperatura e duração da sinterização. Quanto maior a temperatura e maior o período de sinterização, menor será o grau de microporosidade. Por outro lado, macroporosidade é deliberadamente introduzida por adição de agentes voláteis como peróxido de hidrogênio, naftalina ou materiais orgânicos aquecidos abaixo de 100°C para liberar os agentes voláteis e sinterizadas em temperaturas elevadas, geralmente acima de 1100°C.

Acredita-se que as cerâmicas com macroporos sejam mais reativas e favorecem a osteocondução mais que as cerâmicas densas. Entretanto, a porosidade não é o único parâmetro que determina as reações entre o tecido e a cerâmica. Outras características físico-químicas, já citadas, também afetam as reações das cerâmicas. Estudos de RADIN & DUCHEYNE (1994) *in vitro*, mostram que cerâmicas com porosidades idênticas são influenciadas por muitos fatores adicionais, incluindo composição, estrutura e ultraestrutura do cristal.

A densidade do material Ca-P depende das condições de pressão e de temperatura na sinterização. As maiores pressões e temperaturas mais elevadas proporcionam maior densidade. O material com maior densidade ou menor grau de micro/macroporosidade irá dissolver a uma extensão menor que aquela com menor densidade ou maior grau de micro/macroporosidade.

A F.D.A. (Federal Drug Administration) aprovou a utilização da hidroxiapatita em humanos em 1982. A hidroxiapatita era utilizada inicialmente para preencher pequenos defeitos nos ossos longos, sendo empregada posteriormente em escalas maiores devido ao seu bom aproveitamento (BUCHOLZ et al.,1987).

Vários estudos sobre a osseointegração da hidroxiapatita têm sido publicados nas últimas décadas com a finalidade de se conhecer cada vez mais sua aplicação no meio clínico e experimental, como uma alternativa para reconstrução de defeitos ósseos. O interesse de muitos autores por esta cerâmica se baseia nas vantagens que a hidroxiapatita apresenta em relação a outros tipos de enxertos ósseos, como constatados na literatura.

Contudo, a hidroxiapatita apresenta muitas vezes resultados contraditórios a cerca do seu emprego, principalmente em relação à sua porosidade, degradação, propriedade de osteocondução e osteoindução, além de apresentar algumas desvantagens relacionadas à sua propriedade mecânica. Fatos estes que também nos incentivaram ao estudo deste material.

2. OBJETIVO

2 OBJETIVO DO TRABALHO

O objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho da hidroxiapatita, no formato de grânulos de diferentes tamanhos, na correção de falhas ósseas experimentais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Animal Utilizado

Foram utilizados 55 ratos machos da raça Wistar, com peso variando de 200 a 300g, fornecidos pelo Biotério do Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com 5 animais em cada uma, identificados por piques nas orelhas, e receberam água e alimentação padrão *ad libitum*.

3.1.2 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita utilizada para o estudo foi a GEN-PHOS¹ granulada, que é uma hidroxiapatita microporosa, sintética não reabsorvível, tendo sido utilizados três diferentes tipos dessa hidroxiapatita com relação ao tamanho dos seus grânulos, as quais denominamos: Tipo I (212 μ), Tipo II (500 μ) e Tipo III (1.000 μ) (Figura1).

¹ BAUMER ORTOPEDICA

Figura 1. Fotografia ilustrando as diferentes dimensões dos grânulos de hidroxiapatita utilizados para preenchimento das falhas ósseas produzidas: Tipo I (212μ); B: Tipo II (500μ) e C: Tipo III (1.000μ).

3.2 Métodos

3.2.1 Modelo Experimental

A região ântero-lateral do fêmur direito e esquerdo dos ratos foi utilizada para o estudo. Após a exposição cirúrgica dos fêmures, era confeccionada uma falha óssea medindo 5 mm de diâmetro maior e 2 mm de diâmetro menor que era preenchida com hidroxiapatita.

No grupo controle, a falha óssea era realizada do mesmo modo e não era preenchida com a hidroxiapatita.

Figura 2. A: Abordagem cirúrgica da superfície óssea por meio de incisão longitudinal na face ântero-lateral da coxa do animal, para a criação da falha óssea. B: Falha óssea produzida. C: Preenchimento da falha óssea produzida com grânulos de hidroxiapatita do tipo II.

3.2.2 Técnica Cirúrgica

Os animais foram operados no setor de Cirurgia Experimental e Técnica Cirúrgica do Departamento de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, e anestesiados com Nembutal¹ na dose de 33 mg/Kg, com injeção intra-peritoneal. Após a anestesia, era realizada a tricotomia, assepsia e antissepsia dos membros inferiores com *PVPI* degermante² e álcool iodado.

Os fêmures eram abordados por meio de incisão longitudinal na face lateral das coxas, de aproximadamente 2cm de extensão (Figura 2a). Após a dissecação entre os grupos musculares extensores e flexores do joelho, a face lateral do fêmur era exposta, e com a utilização de uma broca odontológica³ n.º 7 de alta rotação era confeccionada uma falha óssea de 5mm de comprimento e 2mm de largura na diáfise ântero-lateral do fêmur, que se aprofundava até a medula óssea (Figura 2b).

A falha óssea era completamente preenchida com a hidroxiapatita com o tipo que dependia do grupo experimental a que pertenciam os animais (Figura 2c).

Após o preenchimento da falha óssea, os planos musculares eram suturados em bloco com pontos separados, utilizando fio Catgut Cromado 3-0⁴, e a pele com fio Mononylon 4-0⁵. No período pós-operatório imediato todos os animais

¹ Abbott

² Povidine – Johnson Hospitalar

³ Modelo Carbide Burs, Marca Jet-Canadá

⁴ Cirumédica

⁵ Cirumédica

foram liberados para deambulação sem restrição e receberam 5.000 U intramuscular de Benzil Penicilina Potássica¹ nos 3 primeiros dias de pós-operatório.

3.2.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, sendo que três deles eram compostos por 15 animais cada, e o quarto com 10 animais, com base no período de sacrifício. No primeiro grupo, os animais foram sacrificados 30 dias após o procedimento cirúrgico, no segundo grupo, após 90 dias e no terceiro e quarto grupos após 180 dias de pós-operatório, respectivamente.

Com objetivo de avaliar os diferentes tipos de hidroxiapatita, no mesmo animal, três combinações da aplicação de hidroxiapatita foram realizadas: Tipo I e Tipo II; Tipo II e Tipo III; e Tipo III e Tipo I, colocadas uma de cada lado do animal. Foram utilizados 15 animais para cada tipo de combinação da aplicação da hidroxiapatita, sendo que 5 animais de cada tipo, eram sacrificados aos 30 dias de período pós-operatório, 5 aos 90 dias e 5 aos 180 dias de período de pós-operatório. (Quadro 1)

No grupo IV, todos animais pertenciam ao grupo controle, no qual 5 animais apresentavam suas falhas ósseas no lado direito e os demais no lado esquerdo, sem preenchimento com hidroxiapatita.

¹ Wycillin R

Quadro 1. Distribuição dos tipos de hidroxiapatita nos grupos experimentais

	nº animais	FÊMUR DIR.	FÊMUR ESQ.
Grupo I (30 dias)	5	Tipo I (212 µm)	Tipo II (500 µm)
	5	Tipo II (500 µm)	Tipo III (1.000 µm)
	5	Tipo III (1.000 µm)	Tipo I (212 µm)
Grupo II (90 dias)	5	Tipo I (212 µm)	Tipo II (500 µm)
	5	Tipo II (500 µm)	Tipo III (1.000 µm)
	5	Tipo III (1.000 µm)	Tipo I (212 µm)
Grupo III (180 dias)	5	Tipo I (212 µm)	Tipo II (500 µm)
	5	Tipo II (500 µm)	Tipo III (1.000 µm)
	5	Tipo III (1.000 µm)	Tipo I (212 µm)
Grupo controle (180 dias)	5	controle	
	5		controle

3.2.4 Coleta de material

Nas datas previstas os animais dos grupos III e IV eram anestesiados pela técnica já mencionada e seus fêmures eram radiografados. Posteriormente, os animais eram sacrificados por meio de anestesia profunda, na dose de 66mg/kg intraperitoneal, provocando uma parada cardio-respiratória. Imediatamente após o sacrifício era realizada uma incisão longitudinal na face anterior da coxa, pela qual os fêmures eram removidos após a desarticulação da coxo-femural e do joelho e armazenados em um recipiente de vidro contendo formol tamponado a 10%. Os recipientes eram, então, encaminhados ao Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para processamento histológico.

3.2.5 Métodos de Avaliação

A avaliação da integração dos diferentes tipos de hidroxiapatita com o tecido ósseo foi realizada por meio de radiografias e lâminas de tecido por meio de microscopia de luz.

3.2.5.1 Estudo Radiológico

O estudo do controle radiológico foi possível somente nos animais dos grupos III e IV, sacrificados com 180 dias. Esses animais foram submetidos a exame radiológico no período de pós-operatório imediato, aos 30, 90 e 180 dias no Centro de Ciências de Imagem e Física Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, utilizando um aparelho convencional de Raios X ¹.

Após a anestesia pela técnica supracitada, os animais foram colocados sobre o “chassis” com filme de mamografia² posicionados a um metro da ampola do aparelho, utilizando-se 38 Kv, mAs 6.4, com foco grosso nas incidências ântero-posterior e perfil direito e esquerdo. O filme foi revelado no processador RPX-OMAT³.

¹ Modelo DL 42-marca Philips

² KodaK – Min-R TM 200, Tam. 18 x 24 cm

³ KodaK

Concluídas as radiografias, os animais foram levados ao Laboratório de Cirurgia Experimental e Técnica Cirúrgica do Departamento de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, onde permaneciam alojados até a data do sacrifício.

As radiografias foram avaliadas por radiologista do Centro de Ciências de Imagem e Física Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os parâmetros utilizados para a realização do estudo radiológico nas falhas ósseas produzidas consistiram em analisar a presença de formação óssea na falha, sendo que esse parâmetro foi graduado em 25%, 50% e 75% de formação óssea na falha e completo preenchimento da falha com tecido ósseo.

Outro parâmetro analisado neste estudo foi verificar a presença de remodelamento ósseo na falha, sendo esse parâmetro graduado em ausência de remodelamento na falha, remodelamento do canal medular, remodelamento parcial do córtex e presença de reação periosteal. (Anexo A)

Com auxílio de um paquímetro digital¹ (Figura 3), as falhas ósseas foram mensuradas nas radiografias de pós operatório imediato, 30, 90 e 180 dias de pós operatório, respectivamente, nas posições ântero-posterior e perfil direito e esquerdo, nos seus maiores eixos transversais (crânio-caudal e látero-lateral). Os valores obtidos através das medidas realizadas foram transcritas no quadro 3. (Anexo B).

¹ Mitutoyo corporation - mod

Figura 3. Fotografia ilustrando o paquímetro digital utilizado para realizar as mensurações das falhas ósseas.

3.2.5.2 Estudo Histológico

A avaliação histológica foi realizada nos quatros grupos experimentais, de acordo com o período das datas do sacrifício: 30, 90 e 180 dias de período pós-operatório, respectivamente. Os fêmures do grupo controle foram submetidos à avaliação histológica somente no período de 180 dias.

O material colhido foi preparado para o estudo por meio de microscopia de luz. Os fêmures foram seccionados transversalmente sobre as áreas de aplicação da hidroxiapatita e sobre a diáfise normal. As peças sofreram processo de descalcificação, após a aplicação de solução ácida diluída de ácido nítrico 5%, por

12 horas. A desidratação das peças foi obtida com aplicações sucessivas de álcool etílico de concentrações crescentes, de 70 a 100%. A próxima etapa consistiu na diafanização com xilol. Em seguida, as peças foram emblocadas em parafina e submetidas a cortes de 6 μ , que foram coradas pelas técnicas da hematoxilina-eosina e do tricômico de Gomori.

As lâminas foram avaliadas por um patologista do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os parâmetros utilizados nesse estudo consistiram em analisar a presença de união óssea na falha, sendo essa graduada em: ausência ou presença de união óssea, presença de união fibrosa, presença de união osteocondral e completa reorganização da falha óssea. Outros parâmetros analisados se referiram ao estudo do osso cortical e ao osso esponjoso, onde a análise do osso esponjoso visou presenciar ausência de atividade celular óssea, início de formação óssea, presença ativa de osso novo, início de reorganização esponjosa e completa de reorganização esponjosa. A análise do osso cortical visou verificar ausência ou presença inicial de osso cortical, formação do osso cortical em andamento e organização parcial ou completa de osso cortical. (Anexo C)

3.3 Análise Estatística

As medidas obtidas com a mensuração das falhas ósseas com o uso do paquímetro digital foram submetidas à análise estatística, onde foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon, para comparar mais de dois tratamentos, usando níveis de significância de 5% (WILCOXON & WILCOX, 1964).

4. RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1 Considerações Gerais

A técnica operatória empregada foi bem tolerada pela grande maioria dos animais, sendo que dos 74 animais submetidos à cirurgia, 2 foram a óbito durante o procedimento cirúrgico, 6 no período pós-operatório por causa ignorada, 9 sofreram fraturas no fêmur e 2 animais apresentaram fraturas consolidadas do fêmur com desvio, tendo sido utilizados 55 animais para o nosso estudo.

4.2 Avaliação Radiológica

4.2.1 Período Pós-operatório imediato

Nas radiografias realizadas nesse período, foi observado que as falhas ósseas estavam totalmente preenchidas com a hidroxiapatita, e era possível identificar os diferentes tipos de hidroxiapatita por meio do aspecto radiológico dos grânulos utilizados (Figuras 4a, b e c). Alguns grânulos dispersos podiam ser vistos nos tecidos subcutâneos adjacentes à falha óssea em todos os grupos. No grupo controle foi observada somente a falha óssea, que apresentava limites bem precisos. (Figura 4d)

4.2.2 Período Pós-operatório de 30 dias

Nas radiografias realizadas neste período, os diferentes grupos experimentais ainda podiam ser identificados de acordo com o tamanho de seus grânulos (Figuras 4e, f, e g). A falha óssea já apresentava 75% de formação óssea nos grupos do tipo I e II, enquanto que o grupo preenchido com o tipo III apresentava 50% de formação óssea na falha (Figura 6a). O remodelamento do canal medular foi observado em 60% das falhas ósseas dos fêmures preenchidos com a hidroxiapatita do tipo I, e em 30% e 20% nas falhas ósseas preenchidas com a hidroxiapatita dos tipos II e III, respectivamente. O remodelamento completo da cortical foi observado em 20% dos fêmures preenchidos com a hidroxiapatita tipo I, enquanto que o tipo II apresentou remodelamento parcial da cortical em 50% dos fêmures e o tipo III em 40% dos casos. O grupo controle apresentou remodelamento completo da cortical em 60% dos animais (Figura 7a). A reação periostal foi observada em todos grupos experimentais (Figura 8).

4.2.3 Período Pós-operatório de 90 dias

Nesse período, os grupos experimentais ainda podiam ser diferenciados comparando entre si o tamanho de seus grânulos (Figuras 5 a, b, e c). A reação periostal ainda estava presente em todos grupos experimentais. Observou-se completo preenchimento da falha com tecido ósseo em 60% dos casos preenchidos com a hidroxiapatita do tipo I e em 30% dos casos onde foram utilizados

os tipos I e II. Contudo, 50% dos fêmures preenchidos com a hidroxiapatita tipo III, tiveram somente 75% de suas falhas preenchidas com tecido ósseo (Figura 6 b). A cortical estava completamente remodelada em 70% das falhas preenchidas com a hidroxiapatita do tipo I, e parcialmente remodelada em 80% das falhas preenchidas com o tipo II, e em 60% das falhas preenchidas com tipo III. O grupo controle apresentou preenchimento total das falhas ósseas e remodelamento completo da cortical e do canal medular em 100% dos casos (Figura 7 b).

4.2.4 Período Pós-operatório de 180 dias

Nesse período, era difícil identificar os grânulos de menor tamanho dentro das falhas ósseas, os quais tinham aspecto borrado, porém os grupos ainda podiam ser diferenciados entre si, por meio de exclusão (Figuras 5e, f e g). A reação periosteal ainda estava presente, porém em menor quantidade em relação ao período anterior (Figura 8). Todos os grupos experimentais, incluindo o grupo controle, apresentaram preenchimento total das falhas ósseas com tecido ósseo (Figura 6 c) e remodelamento completo do canal medular e da cortical em 100% dos casos, perante à leitura das radiografias (Figura 7 c).

4.3 Análise com Paquímetro

O resultado estatístico obtido através das mensurações das falhas ósseas com o uso do paquímetro digital nos animais do grupo III e do grupo controle mostrou que houve redução do tamanho das falhas ósseas em todos os casos. Porém,

a diminuição do tamanho dessas falhas ósseas, foi considerada significativa no período de 180 dias de pós-operatório em relação ao pós-operatório imediato, para o valor de $p = 5\%$ de significância. Já no estudo estatístico entre os períodos anteriores (pós-operatório imediato, 30 e 90 dias de pós operatório), não foram verificadas diferenças significativas na diminuição do tamanho das falhas ósseas. (Quadro 5)

Quadro 5. Relação do valor de significância da diminuição das dimensões das falhas produzidas com o tempo de pós-operatório.

	211 μ				500 μ				1.000 μ			
	Antero Posterior		Perfil		Antero Posterior		Perfil		Antero Posterior		Perfil	
	Crânio Caudal	Latero Lateral	Crânio Caudal	Antero Post.	Crânio Caudal	Latero Lateral	Crânio Caudal	Antero Post.	Crânio Caudal	Latero Lateral	Crânio Caudal	Antero Post.
T1 – T2	*		*		*							
T1 – T3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T2 – T3		*					*	*	*			

T1 = Pós-operatório imediato

T2 = 30 dias de pós-operatório

T3 = 90 dias de pós-operatório

*= Diferença significativa ao nível de significância escolhido de $p = 5\%$

4.4 Avaliação Histológica

4.4.1 Período Pós-operatório de 30 dias

Nesse período o estudo histológico evidenciou união osteocondral em 80% das falhas preenchidas com a hidroxiapatita tipo I e em 90% das falhas preenchidas com a hidroxiapatita tipo II (figura 13 a). Observou-se reorganização do osso esponjoso com presença de osteoclastos em 30% das falhas preenchidas com a hidroxiapatita tipo I e em 10% nas falhas onde utilizou-se a hidroxiapatita tipo II (Figura 14a). O osso cortical estava sendo formado em 90% dos fêmures preenchidos com a hidroxiapatita tipo I e em 70% dos casos que utilizou-se o tipo II (Figura 15a). Já nos fêmures preenchidos com a hidroxiapatita tipo III, foi observada união fibrosa na falha com início de formação de osso esponjoso e cortical em 50% dos casos, sendo que o restante não apresentava indícios de união óssea, bem como presença de atividade celular ou início de formação de osso esponjoso ou cortical (Figuras 13a, 14a e 15a).

A análise microscópica permitiu notar a presença dos grânulos de hidroxiapatita na falha, sendo que os grânulos maiores (1.000μ), apresentavam-se mais dispersos (figuras 9a 10a e 11a).

4.4.2 Período Pós-operatório de 90 dias

Nesse período, o estudo histológico mostrou união óssea na falha em 90% dos casos, que foram preenchidas com grânulos de hidroxiapatita do tipo I e II e união osteocondral em 100% das falhas que foram preenchidas com hidroxiapatita do tipo III (Figura 13b). O osso esponjoso estava completamente organizado em 70% das falhas preenchidas com a hidroxiapatita tipo I, II e III (Figura 14b).

O osso cortical estava parcialmente organizado em 90% dos casos, onde se utilizou o grânulo do tipo I e em 50% dos casos onde se utilizou grânulos dos tipos II e III (Figura 15b).

Foi observada mínima reação periosteal e presença de grânulos de hidroxiapatita nas falhas ósseas.

4.4.3 Período Pós-operatório de 180 dias

Nesse período, o achado microscópico mostrou completa reorganização da falha óssea em 100% dos casos onde foi utilizada a hidroxiapatita tipo I, tipo II e controle e em 80% dos casos onde utilizou-se a hidroxiapatita tipo III (Figura 13c). Observou-se completa reorganização do osso esponjoso para todas falhas estudadas (Figura 14c). A parte cortical estava completamente reorganizada em 70% dos casos preenchidos com os grânulos do tipo I e tipo II e em 60% dos casos preenchidos com o tipo III (Figura 15c). Os diferentes tipos de grânulos de hidroxiapatita utilizados ainda podiam ser vistos, porém notou-se uma diminuição na

quantidade de grânulos de hidroxiapatita do tipo I (212 μ) em relação aos períodos anteriores para o mesmo tipo de hidroxiapatita utilizada (Figura 9c).

Figura 4. Radiografias em perfis de diferentes animais demonstrando a localização das falhas ósseas produzidas e o preenchimento destas com os grânulos de H.A. Tipo I, Tipo II e Tipo III e o controle (sem preenchimento). A, B, C e D: Radiografias do pós operatório imediato das falhas preenchidas com a H.A. Tipo I, Tipo II e Tipo III e controle, respectivamente. Observar imagem radiopaca da H.A. E, F, G e H: Radiografias com 30 dias de pós-operatório das falhas preenchidas com a H.A. Tipo I, Tipo II e Tipo III e controle, respectivamente, ilustrando a presença de reação periosteal nas falhas e início do remodelamento do canal medular. Observar início de formação do osso cortical (H).

Figura 5. A, B, C e D: Radiografias das falhas ósseas produzidas após 90 dias de cirurgia de diferentes animais, preenchidas com os grânulos de hidroxiapatita Tipo I, Tipo II e Tipo III e controle, respectivamente, demonstrando aumento da reação periosteal nas falhas em relação ao período anterior. Observar completa reorganização da falha do grupo controle (D). E, F, G e H: Radiografias das falhas após 180 dias de evolução, realizadas em diferentes animais, preenchidas com os grânulos de H.A. Tipo I, Tipo II, Tipo III e controle, respectivamente demonstrando diminuição da reação periosteal nas falhas em relação ao período de 90 dias de pós-operatório. Observar reorganização óssea nas falhas.

Figura 6. Gráficos ilustrando os resultados radiológicos em relação à formação óssea nas falhas preenchidas com os grânulos de H.A. Tipo I (212 μ), Tipo II (500 μ), Tipo III (1.000 μ) e controle. A: 30 dias de pós-operatório. B: 90 dias de pós-operatório. C: 180 dias de pós-operatório.

Figura 7. Gráficos demonstrando os resultados radiológicos envolvendo o remodelamento do canal medular e do osso cortical nas falhas preenchidas com os grânulos de H.A. Tipo I (212 μ), Tipo II (500 μ) e Tipo III (1.000 μ). A: 30 dias de pós-operatório. B: 90 dias de pós-operatório. C: 180 dias de pós-operatório.

Figura 8. Gráfico ilustrando a presença da reação periosteal nas falhas ósseas dos grupos experimentais I, II, III e controle, com 30, 90 e 180 dias de pós-operatório. Observar maior aumento da reação periosteal no período com 90 dias de pós-operatório.

Figura 9. A, B e C: Fotografias de lâminas histológicas coradas pela técnica hematoxilina-eosina, de falhas ósseas de fêmures de ratos, preenchidas com grânulos de hidroxiapatita do tipo I (212μ) respectivamente após 30, 90 e 180 dias de evolução, evidenciando união óssea (1), osso trabecular (2) e presença de osso cortical (3) (20x). Observar presença de grânulos de H.A. na falha (A) e completa reorganização esponjosa e cortical da falha (C).

Figura 10. A, B, e C:. Fotografias de lâminas histológicas coradas pela técnica hematoxilina-eosina, de falhas ósseas de fêmures de ratos, preenchidas com grânulos de hidroxiapatita do tipo II (500 μ), nos períodos de 30, 90 e 180 dias de pós operatório, respectivamente demonstrando o tipo de união óssea na falha (1), formação de osso esponjoso (2) e reorganização de osso cortical (3) (20x). Observar completa reorganização da falha óssea (C).

Figura 11. A, B, e C: Fotografias de lâminas histológicas de falhas ósseas coradas pela técnica hematoxilina-eosina, de fêmures de ratos, preenchidas com grânulos de hidroxiapatita do tipo III (1000 μ), após 30, 90 e 180 dias do ato cirúrgico, respectivamente, evidenciando a presença de união óssea (1), reorganização esponjosa (2) e formação de osso cortical (3) (20x). Observar união fibrosa (1A), união osteocondral (1B) e completa reorganização da falha (C).

Figura 12. Fotografia de lâmina histológica corada pela técnica hematoxilina-eosina, de falha óssea de fêmur de rato do grupo controle após 180 dias de pós operatório, demonstrando completa reorganização da falha (1), completa reorganização esponjosa (2) e osso cortical completamente formado (3). (20x).

Figura 13. Gráficos demonstrando os resultados histológicos em relação ao tipo de união óssea nas falhas preenchidas com os grânulos de H.A. do Tipo I (212 μ), tipo II (500 μ) e Tipo III (1.000 μ) e o controle, após 30, 90 e 180 dias de cirurgia. A: 30 dias de pós-operatório. B: 90 dias de pós-operatório. C: 180 dias de pós-operatório.

Figura 14. Gráficos demonstrando os resultados histológicos em relação à reorganização esponjosa nas fálhas preenchidas com os grânulos de H.A. do Tipo I (212 μ), tipo II (500 μ) e Tipo III (1.000 μ) e o controle, após 30, 90 e 180 dias de cirurgia. A: 30 dias de pós-operatório. B: 90 dias de pós-operatório. C: 180 dias de pós-operatório.

Figura 15. Gráficos demonstrando os resultados histológicos em relação à reorganização do osso cortical nas falhas preenchidas com os grânulos de H.A. do Tipo I (212 μ), tipo II (500 μ) e Tipo III (1.000 μ) e o controle, com 30, 90 e 180 dias de pós cirúrgico. A: 30 dias de pós-operatório. B: 90 dias de pós-operatório. C: 180 dias de pós-operatório.

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A literatura apresenta um amplo campo para a pesquisa de materiais aloplásticos, como polímeros, cerâmicas de aluminato de cálcio entre outros materiais que são utilizados como substitutos de osso autógeno em diferentes procedimentos cirúrgicos. Porém esses materiais não vêm apresentando resultados clinicamente satisfatórios, pois têm apresentado problemas como a deiscência, a extrusão e ou a mobilidade e reabsorção do osso subjacente. (CHANG et al., 1993) (IBBOTT 1984).

Por outro lado, os materiais derivados de fosfato de cálcio, especialmente a hidroxiapatita apresenta propriedades favoráveis, destacando-se a sua biocompatibilidade (RABALAIS et al., 1981) (OLIVEIRA et al., 1993) e uma possível atividade biológica em função da liberação de cálcio e fosfato, que são importantes mediadores celulares que estimulariam a síntese protéica (HAMMER & KLAWITTER, 1976).

Podemos, contudo, constatar que a H.A. ainda não é o material mais eficaz para a substituição óssea, pois apresenta resultados extremamente controversos, principalmente em relação aos fenômenos de osteocondução, osteoindução e degradação (IGNÁCIO, 1999).

Segundo HENTRICH, et al. (1971), a cerâmica de fosfato de cálcio, quando aplicada dentro de tecidos ósseos, não apenas apresenta a propriedade

osteocondutora, mas a superfície do implante pode também atuar como um centro de nucleação para a mineralização.

No entanto, ALPER et al. (1989), ao utilizarem a proteína morfogenética óssea, H.A. e a combinação de ambas para preenchimento de falhas ósseas produzidas em raios de ratos, concluíram que a osteogênese foi estimulada somente nas falhas preenchidas com proteína morfogenética, enquanto que o crescimento de tecido ósseo neoformado nas falhas com presença de H.A. aparentemente se apresentou inibido.

REDONDO et al. (1995), após preencherem defeitos ósseos produzidos em mandíbulas de ratos com enxerto ósseo autólogo isolado e associado com H.A., concluíram que esta parecia diminuir o efeito da osteoindução das proteínas morfogenéticas ósseas, o que não ocorria naquelas falhas preenchidas somente com enxerto ósseo autólogo.

HOLMES et al. (1986) estudaram as propriedades mecânicas das cerâmicas de tricálcio-fosfato, concluindo que as mesmas apresentam diminuição na resistência às forças de compressão e tração em relação ao osso esponjoso, resultando numa baixa resistência ao impacto, além de serem quebradiças, limitando seu uso em situações de esforço.

Devido às controvérsias em torno do uso da H.A., vários trabalhos têm dirigido a sua atenção ao estudo da hidroxiapatita em relação a sua configuração, forma, processo de síntese, porosidade e propriedades mecânicas. Porém, poucos trabalhos demonstraram atenção em estudar o tamanho ideal da partícula de hidroxiapatita em uma aplicação específica e sua relação nos processos de reparação óssea.

Entretanto, ZANDER & YUKNARA (1984) e MISIEK et al. (1984) chamaram a atenção para a importância da escolha do tamanho e do tipo dos biomateriais para o uso clínico e ou experimental, especialmente para as partículas de cerâmicas de fosfato de cálcio que têm uma influência significativa na resposta inflamatória e na reparação de formação óssea.

Por essa razão decidimos realizar esse trabalho, com a finalidade de estudar três diferentes tamanhos de partículas de hidroxiapatita, e determinar a melhor dimensão desse biomaterial para o preenchimento das lesões ósseas.

Entre os poucos trabalhos encontrados na literatura abordando esse tópico, encontramos KURADA (1995), que investigou experimentalmente em coelhos as correlações dos tamanhos dos grânulos de hidroxiapatita com a quantidade de tecido ósseo neoformado no local do defeito ósseo preenchido com hidroxiapatita, variando a sua granulometria de 300 a 2.000 μ , por um período de 8 semanas. Esse autor concluiu que a melhor quantidade de osso neoformado foi observado com os grânulos de menor tamanho, concordando com os nossos achados em relação ao mesmo período. Embora com um período mais longo (24 semanas), o nosso estudo apresentou resultados semelhantes entre os diferentes tamanhos de grânulos utilizados.

Nos estudos de SHAPOFF et al. (1980), os autores referiram que as partículas de 100 a 300 μ de tamanho apresentam reabsorção mais rápida, maior área de superfície e atuam como um material osteocondutor. Referiram, também, que tamanhos pequenos eram indesejáveis, pois o espaço entre as partículas não eram suficientemente largo para permitir a migração e o crescimento intrínseco das células ou vasos sanguíneos e conseqüente formação óssea. Em concordância com os

trabalhos de HIGASHI & OKAMOTO (1996), que utilizaram dois diferentes tipos e tamanhos de hidroxiapatita, constituídos de hidroxiapatita densas e porosas de 40 e 300 μ para avaliar a influência do tamanho dessas partículas nas reações e proliferações celulares. Concluíram que as partículas densas de 300 μ foram consideradas as mais apropriadas, pois as partículas pequenas foram consideradas pelo tecido ósseo como um corpo estranho e portanto rejeitadas. As grandes partículas (300 μ) foram cobertas por fibroblastos, enquanto que as pequenas (40 μ) ficaram presas ao longo dos prolongamentos dos corpos celulares.

Semelhantes aos relatos anteriores, os estudos de EVANS (1991), OLIVEIRA et al. (1993) e WANG et al. (1994) concordam que as partículas de hidroxiapatita, cujas dimensões variam em torno de 10 a 50 μ por serem muito pequenas, podem favorecer a fagocitose por células como macrófagos e fibroblastos.

Em nossos estudos, as dimensões dos grânulos utilizados variaram em 212 μ , 500 μ e 1.000 μ . Foi verificado que todas as granulometrias utilizadas foram satisfatórias para que ocorresse o preenchimento ósseo total na falha no final do período de 6 meses, porém notou-se que nas falhas preenchidas com os grânulos menores, o processo de reparação óssea ocorria mais precocemente, enquanto que nas falhas preenchidas com os grânulos maiores, o processo de neoformação óssea ocorria mais lentamente. Durante o estudo histológico não foi verificado nenhum processo de fagocitose nas falhas preenchidas com os grânulos menores (212 μ), concordando com os trabalhos anteriores que preconizam que o tamanho de partículas que podem favorecer a fagocitose seja menor.

A hidroxiapatita utilizada em nosso estudo é uma biocerâmica sintética, a mesma utilizada nos trabalhos de DEFINO et al. (1998) e OLIVEIRA et

al. (1993), sinterizada a uma temperatura de 1.100°C, em torno de um período de 3 a 4 horas. Seus poros variam em torno de 1 a 10µ; distinguindo-se de outros experimentos clássicos que utilizam a hidroxiapatita natural, derivada a partir de corais, que são submetidos à uma conversão química por meio de trocas hidrotermais.

O animal escolhido para o nosso estudo experimental foi também o utilizado por OLIVEIRA et al. (1993); XINGDONG e CROSS (1994); ALPER et al. (1989) e REDONDO et al. (1995). Em nosso trabalho, optamos pelo rato devido à disponibilidade da aquisição desses animais em nosso serviço e pela sua resistência aos procedimentos cirúrgicos e radiológicos aos quais foram submetidos.

A opção pela face ântero-lateral do fêmur foi devido à facilidade do acesso cirúrgico a que estes animais foram submetidos. O modelo experimental utilizado mostrou-se adequado para atender às necessidades do estudo, porém não foi esquecido o fato de que a medula óssea do animal utilizado difere do osso esponjoso humano, conforme os relatos de DEFINO et al (1998), assim como ocorre nos coelhos, os quais foram utilizados por outros autores como KURADA (1995) e WANG (1994). A diferença encontrada na medula óssea do rato pode ter influenciado as análises finais dos resultados desse estudo. Portanto, achamos que o cão seria o modelo experimental adequado, por apresentar maiores semelhanças ao osso esponjoso humano.

No estudo radiológico, observamos que as falhas ósseas estavam preenchidas com os grânulos de acordo com o grupo experimental a que pertenciam, e o material implantado mostrou-se intacto durante os primeiros três meses de controle radiológico, demonstrando bem definida a diferença entre as dimensões dos

grânulos utilizados. À medida que o período de seguimento aumentou (6 meses), esta definição tornou-se mais discreta e evidente nos grânulos de menor tamanho (212μ) estando, provavelmente, relacionada com o crescimento intrínseco ósseo e atividade osteoclástica associada à incorporação normal do implante, como foi também observado por SARTORIS et al. (1986). Verificou-se, também, neste estudo que as falhas ósseas preenchidas com os grânulos menores (212μ e 500μ) apresentaram formação óssea mais rapidamente do que as falhas preenchidas com os grânulos maiores (1.000μ), para a maioria dos casos. O remodelamento ósseo ocorreu inicialmente no canal medular seguido pelo remodelamento do osso cortical, este fato também ocorreu primeiramente nas falhas preenchidas com os grânulos menores e, posteriormente, nas falhas preenchidas com os grânulos maiores. No final do seguimento radiológico foi observada uma diminuição não significativa na quantidade de grânulos de menor tamanho (212μ) no interior das falhas, porém nos demais grânulos não foi verificado reabsorção do implante, como substituição total por tecido ósseo neoformado, concordando com os achados de CROCI et al. (1994).

A reação periostal não foi observada no período do pós operatório imediato, sendo somente observada nas radiografias a partir de 30 dias, tornando-se mais intensa no período de 90 dias e menos evidente nas radiografias realizadas com 180 dias, em relação ao período anterior. Este fato contrasta com outros estudos, especialmente com o trabalho de DEFINO et al. (1998), que observaram reação periostal somente no primeiro mês de pós operatório e atribuíram-na ao trauma cirúrgico. As observações de nosso trabalho em relação à reação periostal, não permitem associá-lo com o trauma cirúrgico, contudo esse fato não compromete o perfil de biocompatibilidade desta biocerâmica, pois a reação periostal tende a

diminuir nos períodos de maior seguimento, além de estar presente também no estudo do grupo controle. Esse achado necessita de maiores estudos para melhorar a sua compreensão.

O grupo controle apresentou completo preenchimento da falha óssea com tecido ósseo e completo remodelamento do osso cortical em todos casos operados durante o seguimento radiológico de 90 dias, superando os outros grupos experimentais que não apresentaram tais achados radiológicos para o mesmo período. Podemos ainda constatar que, nas falhas preenchidas com H.A., houve um retardamento no crescimento do tecido ósseo neoformado em relação àquelas falhas sem preenchimento com H.A. Atribuímos este achado ao tamanho da falha óssea escolhida (5mm), que pode ter sido suficientemente pequena para a realização do estudo do grupo controle, podendo ainda ter sido utilizado outro tipo de cerâmica como método de comparação, ao invés de uma falha óssea sem preenchimento com hidroxiapatita.

Durante a observação microscópica da reparação óssea na falha, não foram observadas reações inflamatórias provenientes da presença de corpos estranhos, concordando com os trabalhos relatados pela literatura e reforçando o conceito de biocompatibilidade da hidroxiapatita. Inicialmente foi observada união osteocondral nas falhas ósseas preenchidas com os grânulos menores (212 μ e 500 μ), seguida por reorganização do osso esponjoso e cortical. A presença de união óssea e formação ativa de osso esponjoso e cortical foi mais evidente após o período de 90 dias. Já as falhas preenchidas com os grânulos maiores (1.000 μ), apresentaram inicialmente união fibrosa, seguida por união osteocondral e reorganização do osso esponjoso e cortical aos 90 dias. No final do período de estudo (180 dias), as análises

microscópicas revelaram que houve reparação óssea nas falhas para todos os tamanhos de grânulos utilizados, inclusive para o grupo controle.

Embora o material implantado permanecesse presente nas falhas até o final do estudo, verificou-se, através da análise histológica, uma diminuição na quantidade de grânulos de menor tamanho (212μ), estando este achado provavelmente relacionado com a atividade osteoclástica no interior da falha, concordando com os relatos de SARTÓRIS et al. (1986).

A grande dificuldade encontrada em nosso estudo foi em relação à metodologia utilizada para a avaliação radiológica, visto que os resultados obtidos partiram de análises subjetivas por parte do radiologista. Outra dificuldade encontrada foi em relação à técnica empregada que, embora os parâmetros utilizados tenham sido os mesmos durante todo o estudo, este método não foi totalmente fidedigno para evitar possíveis distorções de imagens que, por ventura, pudessem influenciar os resultados radiológicos.

Crê-se que a metodologia radiológica empregada não foi efetiva para permitir total confiabilidade dos resultados, sugerindo o emprego de outras técnicas mais apuradas.

6. CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- 1) Todas as dimensões de grânulos de hidroxiapatita (212 μ , 500 μ e 1.000 μ) utilizadas neste experimento mostraram-se biocompatíveis;
- 2) A hidroxiapatita atrasou o processo de reparação da falha óssea ;
- 3) O grupo controle apresentou os melhores resultados com completa reorganização da falha óssea, com apenas 90 dias de pós-operatório.

ANEXOS

ANEXOS

Nas próximas páginas serão mostrados os quadros utilizados pelas avaliações histológica e radiológica e o quadro com os valores das medidas realizadas com o uso do paquímetro digital.

Quadro 2 (anexo a) – Avaliação Radiológica

Quadro 3 (anexo b) – Avaliação Histológica

Quadro 4 (anexo c) – Valores das medidas realizadas com o uso do paquímetro digital.

Quadro 2. Avaliação radiológica.

PARÂMETROS	animal nº		animal nº		animal nº		animal nº		animal nº		animal nº		animal nº		animal nº		animal nº	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
FORMAÇÃO																		
ÓSSEA																		
SEM																		
FORMAÇÃO																		
ÓSSEA																		
25% FORM.																		
ÓSSEA																		
NA FALHA																		
50% FORM.																		
ÓSSEA																		
NA FALHA																		
75% FORM.																		
ÓSSEA																		
NA FALHA																		
PREENCHIMENTO																		
TOTAL DA																		
FALHA																		
REMODELAMENTO																		
SEM																		
EVIDÊNCIA																		
REMODELAMENTO																		
DO CANAL																		
MEDULAR																		
REMODELAMENTO																		
PARCIAL DA																		
CORTICAL																		
REMODELAMENTO																		
COMPLETO																		
DA CORTICAL																		
REAÇÃO																		
PERIOSTAL																		

Quadro 3. Medidas realizadas com paquímetro digital (D = direito e E = esquerdo)

Animal	Pós Operatório Imediato								30 dias de Pós Op.								90 dias de Pós Op.								180 dias de Pós Op.								
	Anterior				Perfil				Anterior				Perfil				Anterior				Perfil				Anterior				Perfil				
	Posterior								Posterior								Posterior								Posterior								
	Crânio Caudal	Latero Lateral	Crânio Caudal	Antero Post.	Crânio Caudal	Latero Lateral	Crânio Caudal	Antero Post.	Crânio Caudal	Latero Lateral	Crânio Caudal	Antero Post.	Crânio Caudal	Latero Lateral	Crânio Caudal	Antero Post.	Crânio Caudal	Latero Lateral	Crânio Caudal	Antero Post.	Crânio Caudal	Latero Lateral	Crânio Caudal	Antero Post.	Crânio Caudal	Latero Lateral	Crânio Caudal	Antero Post.	Crânio Caudal	Latero Lateral	Crânio Caudal	Antero Post.	
D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
n = 1	5,82	6,25	3,44	3,40	6,02	6,04	2,99	2,21	5,43	5,52	2,97	2,93	5,88	6,03	2,43	2,16	4,78	4,56	2,44	2,75	4,99	5,64	2,02	2,05									
n = 2	5,99	6,06	3,42	3,71	5,89	6,63	2,80	2,06	5,55	5,02	3,42	3,06	5,75	6,42	2,51	2,00	4,98	5,10	3,40	2,15	5,41	5,26	2,00	1,98									
n = 3	6,16	6,07	6,63	3,18	6,08	6,40	2,87	2,33	5,87	5,85	2,60	2,52	6,00	6,00	2,58	2,13	4,68	5,78	2,29	2,25	5,38	5,89	2,06	2,01									
n = 4	6,01	6,07	2,93	3,11	6,07	6,20	2,75	2,30	5,10	5,10	2,75	2,51	6,21	5,88	2,25	2,25	4,22	5,00	2,34	2,29	5,00	5,51	2,05	2,15									
n = 5	5,90	5,75	3,07	3,41	6,06	5,93	2,25	2,39	5,55	5,68	2,40	2,56	5,36	5,63	2,01	2,23	5,12	5,48	2,36	2,51	5,05	5,28	1,98	1,77									
n = 6	6,06	5,77	3,44	3,67	5,92	6,03	2,55	2,31	5,26	5,65	3,25	3,45	5,85	5,98	2,38	2,31	5,55	5,42	2,58	2,71	5,76	5,79	2,08	2,03									
n = 7	5,64	5,83	2,73	3,44	6,04	6,63	2,26	2,15	5,16	5,75	2,46	3,36	5,89	5,89	2,18	1,98	5,08	5,21	2,24	2,57	5,47	5,50	2,14	1,78									
n = 8	6,10	5,95	3,32	2,99	5,99	6,00	2,52	2,48	5,06	5,88	3,13	3,79	5,81	5,72	2,21	1,90	5,03	5,28	2,90	3,30	5,34	5,04	1,91	1,93									
n = 9	6,08	5,63	6,75	2,83	5,85	6,81	2,65	2,00	5,14	5,52	2,61	2,68	5,68	5,79	2,31	2,10	5,07	5,34	2,32	2,56	5,45	5,49	2,15	2,01									
n = 10	5,80	5,37	2,34	2,49	5,47	6,63	2,36	2,01	5,47	5,18	2,25	2,39	5,38	5,59	2,19	2,97	5,36	5,04	2,09	2,21	5,18	5,47	1,99	1,88									
n = 11	5,99	5,74	2,63	2,62	5,92	6,08	1,93	2,05	5,80	5,65	2,43	3,33	5,66	5,40	1,78	1,90	5,31	5,07	2,16	2,27	5,58	5,37	1,23	1,72									
n = 12	6,05	6,64	2,68	2,41	6,04	6,05	2,04	2,30	5,87	5,68	2,68	3,11	5,90	5,27	2,10	2,17	5,47	5,06	2,04	2,68	5,22	5,15	2,22	2,01									
n = 13	6,06	6,01	1,93	2,39	6,06	6,05	2,31	2,40	5,75	5,09	1,36	2,54	5,92	5,90	2,00	2,11	5,31	4,05	1,27	2,59	5,63	4,53	1,66	2,07									
n = 14	5,22	6,01	2,72	2,43	5,68	6,02	2,11	2,39	5,44	4,98	2,62	2,83	5,48	5,34	2,09	2,27	5,07	4,00	2,03	1,90	5,14	4,01	1,91	1,71									
n = 15	6,04	5,96	2,82	3,75	5,47	6,03	2,06	2,84	5,89	5,10	2,58	3,20	4,99	5,71	2,04	2,18	5,39	5,04	2,42	2,42	4,43	5,30	1,93	2,02									
n = 16	6,02		2,21		6,45		1,58		4,93		2,18		5,23		1,24																		
n = 17	6,02		3,64		6,65		1,52		4,56		1,29		4,86		1,10																		
n = 18	6,64		2,85		5,96		2,25		4,59		2,35		5,30		2,19																		
n = 19	5,42		1,65		5,53		1,42		4,43		1,48		4,70		1,28																		
n = 20	5,50		2,30		5,12		1,65		5,09		2,17		5,09		1,28																		
n = 21		5,73		1,92		5,70		1,71		4,08		1,26		4,28		1,64																	
n = 22		5,82		1,93		5,73		2,03		4,82		1,81		4,73		1,82																	
n = 23		5,92		1,92		6,04		1,65		5,38		1,78		5,67		1,36																	
n = 24		5,71		1,77		5,55		1,59		4,30		1,56		4,38		1,26																	
n = 25		5,90		1,65		5,82		1,70		5,71		1,45		5,34		1,53																	

Quadro 4. Avaliação histológica.

PARÂMETROS	animal nº		animal nº		animal nº		animal nº		animal nº		animal nº		animal nº		animal nº		animal nº	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
UNIÃO ÓSSEA																		
SEM EVIDÊNCIA																		
UNIÃO FIBROSA																		
UNIÃO OSTEO CONDRAL																		
UNIÃO ÓSSEA																		
COMPLETA REORGANIZAÇÃO DA FALHA																		
OSSO ESPONJOSO																		
SEM ATIVIDADE CELULAR ÓSSEA																		
A POSIÇÃO INICIAL DE OSSO NOVO																		
A POSIÇÃO ATIVA DE OSSO NOVO																		
REORG. ESPONJOSA (PRESENÇA OSTEOCLASTO)																		
COMPLETA REORG. ESPONJOSA																		
OSSO CORTICAL																		
NENHUMA																		
APARENTE INICIAL																		
FORMAÇÃO EM ANDAMENTO																		
MEDIALMENTE ORGANIZADA																		
COMPLETAMENTE ORGANIZADA																		

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBREKTSSON, T.; ALBREKTSSON, B. (1987). Osseointegration of bone implants: A review of an alternative mode of fixation. *Acta Orthop. Scand.*, v.58, p.567-77.
- ✧ ALPER, G.; BERNICK, S.; YAZDI, M.; NIMNI, M.E. (1989). Osteogenesis in bone defects in rats: the effects of hydroxyapatite and demineralized bone matrix. *Am. J. Med. Sci.*, v.298, n.6, p.371-72.
- BUCHOLZ, R. W.; CARLTON, A.; HOLMES, R. E. (1987). Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Orthop. Clin. North Am.*, v.18, n.2, p.323-24.
- ✧ CHANG, C. S.; MATUKAS, V. J.; LEMONS, J. E. (1993). Histologic study of hydroxyapatite as an implant material for mandibular augmentation. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 41, p. 729-37.
- CHIROFF, R.; WHITE, E.; WEBER, J. (1975). Tissue in growth of replamineform implants. *J. Biomed. Mater.Res.*, v.6, p. 29-35.
- CROCI, A.T.; CAMARGO, O.P.; CAMPOS, R. F.; OLIVEIRA, N. R. (1992). Emprego do compósito trifosfato de cálcio e hidroxiapatita na cirurgia de lesões ósseas cavitárias benígnas não agressivas. *Rev. Bras. Ortop.*, v.27, n.11/12, p. 849-52.

- CROCI, A.T.; CAMARGO, O.P.; OLIVEIRA, N.; OKONE, S.Y.; CAMPOS, R. F. (1994). O emprego da hidroxiapatita no tratamento cirúrgico das lesões ósseas benignas não agressivas. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo*, v.49, n.3, p. 116-24, maio-jun.
- DEFINO, H. L. A.; CONTI, O.; VELLUDO, M. A. S. (1998). Estudo experimental da integração óssea da hidroxiapatita. *Rev. Bras. Ortop.*, v.33, n.9, p.713-18.
- ✱ EVANS, E.J. (1991). Toxicity of hydroxyapatite in vitro: the effect of particle size. *Biomaterials*, v.12, n.8, p.574 -76.
- FIGUEIREDO, A.S.; TAKITA, L.C.; GOLDENBERG, S. (1997). Comparação entre a H.A. porosa de coral e o enxerto ósseo autógeno em coelhos. *Acta Cir. Bras.*, v. 12, n.2, p. 84-8, abril-junho.
- FLATLEY, T.J.; LYNCH, K.L.; BENSON, M. (1983). Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in the rabbit spine. *Clin. Orthop.*, v.179, p.246-52.
- HAMMER, R. L.; KLAWITTER, J. (1976). Porous aluminum oxide and high density polyethylene sponge for augmentation of the edentulous mandible. *J. Dent. Res.*, v.55, n.2, p.243.
- ✱ HENTRICH, R. L.; GRAVES, G. A.; STEIN, H. G.; BAJPAI, P. K. (1971). An evolution of inert and resorbable ceramics for future clinical orthopedic applications. *J. Biomed. Mater. Res.*; v.5, p.25-51.
- HIGASHI, T.; OKAMOTO, H. (1996). Influence of particle size of hydroxyapatite as a coping agent on cell proliferation of cultured fibroblasts. *Journal of Endodontics.*; v.22, n.5, p.236-39.
- HOLMES, R. E. (1979). Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant *Plastic & Reconstructive Surgery.*; v.63, n.5, p.626-33.

- HOLMES, R. E.; TENCER, A.F.; CARMICHAEL, T.W.; MOONEY, V.; (1983). Mechanical properties of synthetic hydroxyapatite for cancellous bone grafting. *Trans Orthop. Res. Soc.*; v.8, p. 67.
- HOLMES, R. E.; BULCHOLZ, R. W.; MOONEY, V.; TENCER, A. (1984). A coralline hydroxyapatite bone graft substitute: preliminary report. *Clin. Orthop.*; v.188, p. 252-62.
- * HOLMES, R. E.; BUCHOLZ, R. W; MOONEY, V. (1986). Porous hydroxyapatite as a bone-graft substitute in metaphyseal defects. A histometric study. *J. Bone Joint Surg. (Am.)*, v. 68, n.6, p. 904-11.
- * IBBOTT, C.G. (1984). Root resorption associated with placement of a ceramic implant. Report of a case. *J. Periodontol.*; v.56, p.419-21.
- * IGNÁCIO, I.(1999). *Avaliação da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea: estudo experimental em cães*. Ribeirão Preto. 93p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- JARCHO, M. (1981). Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin. Orthop.* v.157, p. 259.
- JIANCHO, Z.; XINGDONG, Z.; GROSS, V. (1994). The early host and material response of hydroxyapatite / β - tricalciumphosphate porous ceramics after implantation into the femur of rats. *J. Materials Science.*, v.5, p. 243-51.
- KENNEY, E. B.; LEKOVIC, V.; CARRANZA, F. A.; DIMITRIJEVIC, B. & HAN. T. (1984). Porous hydroxyapatite as a structural implant for human periodontal defects. *J. Dent. Res.*, v. 63, p. 221.

- * KLAWITTER, J. ; HULBERT, S. (1971). Application of porous ceramics for the attachment of load bearing orthopedic applications. *J. Biomed. Mater. Res.* , v.2, p.161.
- * KURADA, T. (1995). Bone formation and mechanical properties of the cancellous bone defect site filled with hydroxyapatite granules. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi.* , v. 69, n.10, p.1.037- 49.
- LANGE, G. L.; DONATH, K. (1989). Interface between bone tissue and implants of solid hydroxyapatite-coated titanium implants. *Biomaterials*, v.10, p.121-25.
- LE GEROS, R. Z. (1993). Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clinical Materials*, v.14, p. 64-88.
- LEMONS, J. E. (1996). Ceramics: past, present and future. *Bone*, v.19, n.1, p.121-28.
- MARIOLANI, J. R. L.; ARRUDA, A. C. F.(1991). *Metodologia para avaliação da interface biomaterial-tecido ósseo: estudo teórico e experimental*. Campinas. 105 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas.
- MISIEK, D. J.; KENT, J. M.; CARR, R. F. (1984). Soft tissue responses to hydroxyapatite particles of different shapes. *J. Oral Maxillo of Surg.*, v. 42, p.150-60.
- * OLIVEIRA, A. T.; GRANJEIRO, J. M.; MAEDA, L.; CHACON, M.; FONSECA, M. A.; TAGA, E. M. & TAGA, M. J. L. (1993). Hidroxiapatita microgranular: Comportamento biológico em tecido subcutâneo de ratos. *Revisão Odontológica UNESP*, São Paulo, v.22, n.2, p.197-202.

- OONISH, H. (1991). Orthopaedic Applications of hidroxyapatite. *Biomaterials*, v.12, n.3, p.171-8.
- RABALAIS, M. J.; YOKNA, R. A.; MEYER E.T. (1981). Evolution of durapatite ceramics as an alloplastic implant in periodontal osseous defects: initial six-month results. *J. Periodontol*, v.52, p.680-89.
- RADIN, S. R.; DUCHEYNE, P. (1994). Effect of bioactive ceramic composition and structure on in vitro behavior III. Porous versus dense ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 28, p.1303-4.
- REDONDO, L. M.; GARCIA, C. J. M.; VERRIER, H.A.; VAQUERO, P. C. (1995). Effect of particulate porous H. A. on osteoinduction of demineralized bone autografts in experimental reconstruction of the rat mandible. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.24, n.6, p.445-48.
- ROY, D.M.; LINNCHAN, S. N. (1974). Hydroxyapatite formed from coral skeleton carbonate by hydrothermal exchange. *Nature*, v.247, n.1, p. 220-2.
- SARTORIS, D. J.; GERSHUNI, D. H.; AKESON, W. H.; HOLMES, R. E., RESNICK, D. (1986). Coralline hydroxyapatite bone graft substitute: preliminary report of radiographic evaluation. *Radiology*, v.159, n.1, p.133-7.
- ✧ SHAPOFF, C. A.; BOWERS, G. M.; LEVY, B. ; MELLONIG, J. T.; YUKNA, R. A. (1980). The effects of particle size on the osteogenic activity of composite grafts of allogenic freeze-dried bone and sutogenous marrow. *J. Periodontol.*, v.51, p. 625-30, 1980.
- TAGA, E. M.. *Aplicação e conceitos de biocerâmicas*. Local: Departamento de ciências biológicas da Faculdade de Odontologia de Baurú da Universidade de São Paulo, 1998 / mimeografado.

- TENCER, A. F.; MOONEY, V.; BROWN, K. ; SILVA, P.A. (1984). Mechanical properties of polymer coated porous coralline hydroxyapatite. *Trans. Soc. Biomater.*, V.7, p.219.
- TORGALKAR, A. M. (1979). A resonance frequency technique to determine elastic modulus of hydroxyapatite. *J. Biomd. Mater Res.*, v.13, p. 907-20.
- ✕ TUREK, L. S. (1991). *Ortopedia – princípios e sua aplicação*. 4 ed. São Paulo: Manole.
- USCHIDA, A.; ARAKI, N.; SHINTO, Y.; YOSHIKAWA, H.; KURISAKI, E.; ONO, K. (1990). The use of calcium hidroxyapatite ceramic in bone human surgery. *J.Bone Joint Surg.*, v.72 (B2), p.298-302.
- ✕ WANG, J. S.; GOODMAN, S.; ASPENBERG. (1994). Bone formation in the presence of phagacytosable hydroxyapatite particles. *Clinical Orthopaedics and Related Research.*, v.304, n. 7, p. 272-9.
- WEBER, J. ; WHITE, E. W. (1973). Carbonate materials as precursors to new ceramic metal and polymer materials for biomedical applications. *Miner. Sci. Eng.*, v.5, p. 151-65.
- WILCOXON, F. ; WILCOX, R. A. (1964). *Some rapid approximate statistical procedures*. New York: Lederle Laboratories.
- WILLIAMS, D. F.; ROAF, R. (1973). *Implants in Surgery*. London: W.B. Saunders, Ltd.
- ✕ WILLIAMS, D. F. (1982). Biodegradation of surgical polymers. *J. Mater. Sci.*, v.17, p. 1233.

ZANDER, D. J.; YUKNARA, R. A. (1984). Particle size of periodontal bone grafting materials. *J. Periodontol.*, v.55, p.446-9.