

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos Departamento de Medicina Veterinária

ANÁLISE DAS INTERFACES ENTRE OS COMPÓSITOS CONSTITUÍDOS DE MATRIZES ÓSSEAS MINERALIZADAS HETERÓLOGAS TRABECULARES CANINA (MOMHTc) E DE BOVINA (MOMHTb) ASSOCIADAS AO POLIMETILMETACRILATO (PMMA) E AS FALHAS ÓSSEAS DE TÍBIAS DE COELHOS

Mestranda: Thaís Ribeiro Fadel

Orientador: Prof. Dr. Silvio Henrique de Freitas

Pirassununga 2021 THAÍS RIBEIRO FADEL

ANÁLISE DAS INTERFACES ENTRE OS COMPÓSITOS CONSTITUÍDOS DE MATRIZES ÓSSEAS MINERALIZADAS HETERÓLOGAS TRABECULARES CANINA (MOMHTc) E DE BOVINA (MOMHTb) ASSOCIADAS AO POLIMETILMETACRILATO (PMMA) 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 do programa de Mestrado Profissional em Biociência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Henrique de Freitas.

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

RIbeiro Fadel, Thaís R144a Análise das interfaces entre os compósitos constituídos de matrizes ósseas mineralizadas heterólogas trabeculares canina (MOMHTC) e de bovina (MOMHTb) / Thaís RIbeiro Fadel ; orientador Silvio Henrique de Freitas. -- Pirassununga, 2021. 79 f. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. 1. Ortopedia. 2. Biomateriais. 3. Osseointegração. I. de Freitas, Silvio Henrique, orient. II. Título. THAÍS RIBEIRO FADEL

ANÁLISE DAS INTERFACES ENTRE OS COMPÓSITOS CONSTITUÍDOS DE MATRIZES ÓSSEAS MINERALIZADAS HETERÓLOGAS TRABECULARES CANINA (MOMHTc) E DE BOVINA (MOMHTb) ASSOCIADAS AO POLIMETILMETACRILATO (PMMA) 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 do programa de Mestrado Profissional em Biociência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária

Orientador: Silvio Henrique de Freitas

Data de aprovação: ____/___/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Silvio Henrique de Freitas Instituição: Universidade de São Paulo (Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos)

Prof. Dr. Luís Gustavo Gosuen Gonçalves Dias Instituição: Universidade Estadual de São Paulo (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias)

Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo Instituição: Universidade de São Paulo (Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos)

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer meus pais, Ana Rosa Ribeiro e Paulo Alfredo Fadel, por possibilitarem sempre que meus sonhos aconteçam, me dando apoio em todos os sentidos da minha vida, proporcionando e participando de todas as minhas conquistas.

Gostaria de agradecer meu namorado Rafael Guimarães Vizoná, por não medir esforços para me auxiliar tanto emocionalmente quanto operacionalmente durante o mestrado, pela paciência, pelos estímulos e pelo carinho que me deram forças, toda a sua ajuda foi de grande valor para finalização deste projeto.

Gostaria de agradecer ao meu amigo e companheiro de pós-graduação e laboratório, Wellington Bessi, que esteve ao meu lado em praticamente todas as etapas deste projeto e foi muito parceiro e dedicado tanto nos cuidados com os coelhos como no apoio em todas as etapas ao longo do desenvolvimento da pesquisa.

Gostaria de agradecer meus amigos de pós-graduação André Mesquita e Andressa Parca, pela companhia nas aulas teóricas e apoio ao longo da minha caminhada na USP.

Gostaria de agradecer à Arina Lazaro Rochetti por todo o auxílio e aprendizado proporcionados no laboratório, possibilitando o cuidado e sucesso garantido nos meus testes citotóxicos

Gostaria de agradecer ao apoio dos seguintes setores: Laboratório de Biomaterial com Potencial aplicação Clínica (LABIPAC, FZEA, USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga/SP. Responsável: Prof. Dr. Silvio Henrique de Freitas), Unidade Didática Clínico Hospitalar de Medicina Veterinária (UDCH, FZEA, USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga/SP, Diretor: Prof. Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi), Núcleo de Anestesiologia Veterinária (NAVE, FZEA, USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga/SP. Responsável: Prof. Dr. Adriano Bonfim Carregro) Centro de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (CAEP, FMVZ, USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga/SP. Responsável: Prof. Dr. Rodrigo Romero Correa), Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA, FZEA, USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga/SP. Responsável: Prof. Dr. Paulo José de Amaral Sobral) e Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT, FZEA, USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga/SP. Responsável: Prof. Dr. Heidge Fukumasu), durante a execução dessa pesquisa.

E finalmente gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Silvio Henrique de Freitas por ter me acolhido na USP, por ter me agregado conhecimento, desenvolvimento profissional e pessoal e por ter sido presente durante o decorrer de todos os processos da pesquisa.

RESUMO

As afecções ortopédicas que necessitam de procedimentos cirúrgicos especializados para reposição de tecido ósseo são frequentes tanto na medicina veterinária quanto na humana. Por isso, não é raro ortopedistas se depararem com fraturas de ossos longos, neoplasias ósseas ou não-uniões de fraturas, que necessitam de tratamento cirúrgico reparador com o uso de enxerto ósseo ou implante natural e/ou sintético. Pretendeu-se com está pesquisa analisar as interfaces entre compósitos constituídos de matriz óssea mineralizada heteróloga trabecular canina (MOMHTc) e bovina (MOMHTb) associadas ao PMMA e as falhas ósseas de tíbias de coelhos, por meio de estudo radiográfico e pela microscopia eletrônica de varredura em diferentes tempos. Foram utilizados 12 coelhos adultos da raça Nova Zelândia para avaliar os comportamentos dos compósitos à base de MOMHTc e/ou MOMHTb associada ao PMMA. Os grupos foram dividido em quatro subgrupos (E1, n-3; E2, n-3; E3, n-3 e E4, n-3), que tiveram as falhas ósseas de tibiais direitas e esquerdas preenchidas com compósitos e avaliadas no pós-operatório imediato, aos 30, 60, 90 e 120 dias. Observou-se que os compósitos de MOMHT(c/b) e PMMA apresentaram potencial citotóxico, sendo este maior no de bovino. Morfologicamente, também foi observado que os compósitos se mantiveram preservados após autoclavagem, demonstrando que o processo de esterilização não alterou as estruturas dos constituintes dos compósitos. Houve incorporação, em relação ao tempo, dos compósitos de MOMHT(c/b) e PMMA aos leitos receptores em 100% dos casos, demostrando ser biologicamente biocompatível, pois promoveram a reparação de falhas ósseas, sem sinais de infecção, migração e/ou rejeição, podendo, dessa forma, ser mais uma opção como substitutos para preencher grandes defeitos ósseos.

Palavras chave: Falha óssea, osseointegração substituto ósseo.

ABSTRACT

Orthopedic conditions that require specialized surgical procedures for replacement of bone tissue are frequent in both veterinary and human medicine. Therefore, it is not uncommon for orthopedists to encounter long-bone fractures, bone neoplasms, or non-fracture joint, that need surgical repair treatment using bone graft or natural and / or synthetic implant. The aim of this study is to analyze the interfaces between composites composed of canine (MOMHTc) and bovine heterologous trabecular mineralized bone matrix (MOMHTb) associated with PMMA and the bone defects of rabbits, by radiographic study and scanning electron microscopy at different times. Twelve adult New Zealand rabbits were used to evaluate the behavior of composites based on MOMHTc and MOMHTb associated with PMMA, they were divided into four subgroups (E1, n=3; E2, n=3; E3, n=3 e E4, n=3), which had filled the right and left tibial bone failures with composites and evaluated at the immediate postoperative period at 30, 90, and 120 days. It was observed that MOMHT(c/b) and PMMA composites showed cytotoxic potential, which was higher in the bovine composite. Morphologically, it was also observed that the composites were preserved after autoclaving, this demonstrated that the sterilization process did not change the structures of the constituents of the composites. There was incorporation, in relation to time, of the MOMHT(c/b) and PMMA composites to the receiving beds in 100% of the cases, this demonstrated to be biologically biocompatible, as they promoted the repair of bone defects, with no signs of infection, migration or rejection, and may therefore be another option as a substitute to fill large bone defects.

Key words: Bone failure, bone substitute, osseointegration.

ÍNDICE

| 1. Introdução |
|--|
| 2. Revisão Bibliográfica |
| 2.1. Biologia óssea 17 |
| 2.2. Banco de ossos |
| 2.3. Enxertos e implantes ósseos |
| 2.4 Polimetilmetacrilato |
| 2.5. Biomateriais |
| 3. Hipótese |
| 4. Objetivos |
| 4.1. Objetivo geral |
| 4.2. Objetivos específicos |
| 5. Materiais e métodos |
| 5.1. Preparo das matrizes ósseas mineralizadas heterólogas trabeculares canina e bovina |
| MOMHT (c/b)27 |
| 5.2. Preparo dos compósitos constituídos de MOMHT(c/b) e PMMA 29 |
| 5.3. Ensaio de biocompatibilidade – Teste de citotoxicidade dos compósitos constituídos |
| |
| de MOMHT(c/b) e PMMA31 |
| de MOMHT(c/b) e PMMA |
| de MOMHT(c/b) e PMMA.315.4. Procedimento cirúrgico.375.5. Coleta e processamento das amostras.405.6. Análise pela MEV/EDS.456. Resultados.466.1. Avaliação da citotoxicidade.466.2. Avaliações radiográficas.50 |
| de MOMHT(c/b) e PMMA |
| de MOMHT(c/b) e PMMA.315.4. Procedimento cirúrgico.375.5. Coleta e processamento das amostras.405.6. Análise pela MEV/EDS.456. Resultados.466.1. Avaliação da citotoxicidade.466.2. Avaliações radiográficas.506.3. Avaliação macroscópica.556.4. Avaliação pela MEV e EDS.57 |
| de MOMHT(c/b) e PMMA.315.4. Procedimento cirúrgico.375.5. Coleta e processamento das amostras.405.6. Análise pela MEV/EDS.456. Resultados.466.1. Avaliação da citotoxicidade.466.2. Avaliações radiográficas.506.3. Avaliação macroscópica.556.4. Avaliação pela MEV e EDS.577. Discussão.68 |
| de MOMHT(c/b) e PMMA |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| Figura 1- MOMHT (c/b) acondicionadas em frascos plásticos contendo glicerina (glicerol) à 98% (A e B) |
|---|
| 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% (C), lixamento das MOMHT (c/b) até atingir espessura de 4mm (D e E) cuba ultrassônica contendo solução salina a 0,9% para lavagem das MOMHT (c/b) (F) |
| Figura 3- Incorporação de PMMA às MOMHT (c/b) (A-D)29 |
| Figura 4- Confecção de compósitos de MOMHT(c/b) associados ao PMMA. Bloco biomaterial com 2mm de espessura (A), obtenção dos discos com uso de broca trefina (B), compósitos prontos (C) e compósitos em cuba ultrassônica contendo solução salina a 0,9% em (D) |
| Figura 5- Compósitos embalados em grau cirúrgico, encaixados em suporte de aço inoxidável – seta preta (A) e autoclave vaccum utilizada para o processo de esterilização dos compósitos (B) |
| 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) |
| Figura 7- Aplicação de azul de trypan em câmara de Neubauer para contagem celular (A). Câmara de Neubauer ao microscópio para contagem celular (B) |
| Figura 8- Meio de cultivo celular em banho maria |
| Figura 9- Transferência do cultivo celular para as placas de cultura com fundo chato de 96 poços |
| Figura 10- Extrato pronto para ser incubado em estufa |
| Figura 11- Diluição dos compósitos de MOMHTb + PMMA: B1 -100%; B2-50%; B3-25%; B4-12,5% (A). MOMHTc + PMMA: C1 -100%; C2-50%; C3-25%; C4-12,5% (B) |
| Figura 12- Placa montada com os controles negativos, controle positivo e diluições dos compósitos de MOMHT(c/b) |
| Figura 13- Análise da viabilidade celular ao microscópio invertido de fluorescência Axiovert.A1 (Carl Zeiss) |
| Figura 14- Poços da placa com a solução de MTT antes do processo de incubação 36 |
| Figura 15- Leitura da placa em espectrofotômetro FLUOstar OPTIMA |
| Figura 16- Procedimento cirúrgico realizados nos animais experimentais. Proteção das áreas |

Figura 16- Procedimento cirúrgico realizados nos animais experimentais. Proteção das áreas operatórias com panos cirúrgicos descartáveis e de contato (Tegaderm – círculo pontilhado) (A), realização da incisão cutânea e exposição da cortical óssea (B), realização da falha óssea com broca trefina – seta branca (C), falha óssea na tíbia – seta amarela (D), implantação do

Figura 43- Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTc e PMMA) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E3 (90 dias) obtidas de corte sagital (n1-ABC e n2-ABC) e corte transversal (n3-ABC). Observe: tecido ósseo do leito receptor e da MOMHTc (cinza claro-asterísco amarelo),

| Tabela 2- Comportamento do compósito (MOMHTc/b e PMMA) em leitos receptore | s de tíbias |
|--|-------------|
| de coelhos através da MEV | 57 |

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, há aumento considerável de casos registrados de fraturas traumáticas decorrentes de acidentes automobilístico e de neoplasias ósseas ou não-uniões ósseas, se fazendo necessário a elaboração de estudos envolvendo diferentes tipos de tratamentos cirúrgicos ortopédicos reparadores que estimulem e acelerem a regeneração óssea. A substituição de um segmento ou o preenchimento de falha óssea com o uso de enxerto ósseo ou implante de origem natural e/ou sintético, é uma das principais opções para o tratamento dessas afecções (RANZANI et al., 1996; REZENDE et al., 1998; ALIEVI et al., 2007; BURGER et al., 2013; FREITAS et al., 2013a; SOUZA et al., 2020). A melhor opção para se tratar falhas ósseas recai sobre o enxerto ósseo autólogo, já que acelera a cicatrização óssea e permite o retorno do paciente às suas atividades normais. 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 poder não fornecer volume suficiente para reparar grandes falhas ósseas (FRIEDLAENDER, 1982; STEVENSON, 1996; MELO et al., 1998; STEVENSON, 1998; ALIEVI et al., 2007; FREITAS et al., 2007; FREITAS et al., 2012).

Atualmente, substitutos ósseos naturais têm sido pesquisados 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. Os implantes são considerados biologicamente inferiores aos auto-enxertos, porém a sua utilização é mais abrangente na ortopedia reparadora, com resultados satisfatórios (LANE e SANDHU, 1987; RANZANI et al., 1996; DASSO et al., 1998; MELO et al.; 1998; MORAES et al., 2004; ALIEVI et al., 2007; MILORI et al., 2013). Essa alternativa apresenta vantagens como: a constituição de banco de ossos apropriado para o fornecimento de implantes, suporte para formação de novo osso (osteoindução e condução), sustentação mecânica, além da possibilidade 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 completa e eficientemente preenchidas por implantes sintéticos, como, por exemplo, cimento de fosfato de cálcio, hidroxiapatita sintética, polimetilmetacrilato (PMMA), biovidros entre outros (KAWANO et al., 1998; RESENDE et al., 1998; WEINFELD et al., 1999; RAHAL et al., 2000; BRAZ et al., 2003; FERNANDES et al., 2004; MORAES et al., 2004; FREITAS et al., 2014; MOREIRA et al., 2014).

O PMMA é um biomaterial sintético que possui propriedades biotolerantes, osteocondutoras, facilmente moldado para obtenção de uma forma mais adequada ao leito

receptor. A sua utilização no reparo de falhas ósseas extensas, se abrange tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária (BAUER e MUSCHLER 2000, YACUBIAN-FERNANDES et al. 2004, RAPOSO-DO-AMARAL et al. 2010; MOREIRA et al. 2014, CATELLO et al., 2017; KUHL et al. 2017).

Os biomaterias, 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. 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 (ALEXANDER, 1987; AKAMOTO e TRENTO, 2002; FREITAS et al., 2013a; COSTA et al., 2015).

O método de diagnóstico por imagem, através de avaliação radiológica em procedimentos ortopédicos reconstrutivos, permite avaliar com precisão o comportamento do implante como substituo ósseo. Tornando possível localizar com precisão a posição exata de substituto ósseo em falha óssea, a remodelação óssea, bem como, quantificar reações locais. Se tornando imprescindível o seu uso em procedimentos cirúrgicos ortopédicos de rotina e experimentais, que necessitam de acompanhamento, tanto na medicina humana, como 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). O método consiste em, após a remoção das irregularidades e polimento do objeto de pesquisa, uma delgada camada de metal pesado, como ouro ou paládio, é depositada na sua superfície, tornando possível que um feixe de elétrons o percorra, varrendo a sua superfície, fazendo com que alguns elétrons se reflitam (elétrons de dispersão) e outros sejam ejetados (elétrons secundários). Esses elétrons em contato com a superfície da amostra são capturados por detectores, interpretados e apresentados em um monitor, na forma de imagem tridimensional (GARTNER e HIATT, 1999; TIMM, 2005).

Com o uso da MEV e da espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS), as superfícies dos biomateriais em contato com o leito-leito receptor podem ser analisadas em alta resolução, permitindo maior compreensão dos fenômenos ali presentes. 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 micro morfológicas que envolvem significativamente na osteointegração e estabilidade primária do implante com 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; ALIEVI et al., 2007; FREITAS et al., 2012; BURGER et al., 2013).

Os resultados esperados, no presente trabalho, incluem a incorporação e osteointegração dos compósitos, constituídos de matriz óssea mineralizada heteróloga trabecular canina (MOMHTc) e bovina (MOMHTb) associadas ao PMMA em falhas ósseas de tíbias de coelhos, que poderiam ser uma opção a mais como tratamento de afecções ortopédicas com grandes perdas ósseas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biologia óssea

A constituição óssea se baseia em dois componentes: orgânicos e inorgânicos, onde a porção orgânica é representada por células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos), fibras colágenas e substância base (proteoglicanos e glicoproteínas), sendo a secreção desta porção feita, em sua maioria, pelos osteoblastos. Se tratando da porção inorgânica, o principal componente ali presente é o fosfato de cálcio, responsável por dois terços do peso do tecido ósseo, além disso, realiza interação com o hidróxido de cálcio se transformando em cristais de hidroxiapatita. Após a formação desses cristais, outros materiais inorgânicos como, por exemplo, o carbonato de cálcio, sódio, magnésio e fluoreto são ali incorporados (CONSTANTINESCU, 2002).

Os ossos longos são compostos por duas porções, compacto ou cortical e a esponjosa. A diáfise formada majoritariamente pela porção óssea compacta com pequena quantidade de osso esponjoso delimitando a cavidade medular e as epífises são formadas por tecido ósseo esponjoso coberto por uma camada superficial de tecido ósseo compacto (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A matriz óssea é ocupada por lacunas, formada por osteócitos que se interligam através de canalículos formando um sistema de comunicação e nutrição celular, grande parte das lamelas se organizam concentricamente em torno dos canais longitudinais compostos por vasos e nervos formando o sistema Harvesiano. Estes canais se comunicam entre si e com a cavidade medular, periósteo e endósteo através de canais transversos denominados de canais de Volkman. (SISSON e GROSSMAN, 1986; JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004). O osso esponjoso é composto por lâminas e espículas que se cruzam e se organizam em diversas direções, de acordo com as pressões mecânicas, pode ser encontrado em ossos curtos e nas epífises de ossos longos e podem se estender variavelmente pela diáfise (SISSON e GROSSMAN, 1986; JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004).

O tecido ósseo é recoberto internamente pelo endósteo e externamente pelo periósteo, essas estruturas são importantes para proteção, nutrição e diferenciação de novos osteoblastos, os quais são essenciais durante a consolidação ou crescimento ósseo e possuem propriedades osteogênicas. Os vasos do periósteo nutrem o osso compacto da diáfise por meio de ramos conectados à canais de Volkman, os quais atingem os canais de Harvens e as cavidades do osso esponjoso (SISSON e GROSSMAN, 1986; JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004). A artéria medular atravessa o forame nutrício para percorrer o canal da diáfise onde se ramifica e atinge a cavidade medular. Os vasos metafisários e epifisários se originam nas artérias adjacentes às articulações e são responsáveis pela nutrição do osso esponjoso e da medula óssea. Os vasos linfáticos se encontram em canais perivasculares no periósteo e nos canais de Harvens, e em forma de pequenos canais linfáticos na periferia da medula acompanhando vasos venosos (SISSON e GROSSMAN, 1986).

As ações concomitantes dos osteoblastos, responsáveis pela formação e mineralização da matriz óssea, e dos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção e remodelamento ósseo causam frequente remodelação no osso, para que se obtenha função óssea ideal (KEALY et al., 2011). O periósteo exerce importante papel na reparação óssea, sua camada externa é capaz de ligar-se a músculos e ligamentos e sua camada interna fornece osteoblastos. O endósteo é a camada interna de tecido conjuntivo do osso, mais delgado e reveste cavidades medulares grandes. (DENNIS et al, 2010).

É descrito por Kealy et al. (2010) e por Isola e Moraes (2012), que a partir do momento em que o osso é acometido por uma fratura, primeiramente inicia-se um processo hemorrágico que evolui para formação de hematoma, desencadeando a liberação de mediadores inflamatórios

dando início a fase inflamatória da consolidação óssea. Em seguida, ocorre aumento da vascularização local, podendo surgir regiões de neovascularizações. O periósteo e o endósteo reagem por meio de intensa proliferação celular, gerando um anel de tecido repleto de células osteogênicas, contornando o foco de fratura, sendo assim, uma ponte de tecido mesenquimal não diferenciado se forma

Estão presentes no processo de consolidação de uma fratura as ossificações endocondrais e intramembranosas, com formação de calo ósseo, seguido da remodelação e incorporação à estrutura óssea adjacente. (KEALY et al; 2011; ISOLA; MORAES, 2012).

O ossificação intramembranosa ocorre quando as células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos para formar diretamente o osso. Esta formação óssea ocorre no neuro e viscerocrânio membranoso e em parte da clávicula. Já na ossificação endocondral, as células mesenquimais se diferenciam em condrócitos e formam modelos de cartilagem dos futuros ossos, há a substituição da cartilagem por osso mineralizado, esta ossificação ocorre na base e na parte posterior do crânio, no esqueleto axial e no esqueleto apendicular. (MAES et al., 2010).

A consolidação primária, onde pouco ou nenhum calo é evidenciado, é ocasionada quando se alcança por meio de técnicas cirúrgicas apropriadas a aposição e a estabilização adequada dos fragmentos ósseos. Fraturas metafisárias tem envolvimento de osso trabecular e consolidam diferentemente das fraturas de ossos corticais. O osso esponjoso é mais estável que o cortical e não há formação de calo ósseo, salvo os casos em que existe instabilidade. O novo osso deposita-se nas trabéculas existentes, essa ponte intertrabecular se forma antes da união cortical (ROUSH, 2005; JOHNSON, 2007; KEALY et al., 2011).

O tempo de consolidação médio, tanto do osso esponjoso quanto cortical, da fase reparadora se dá em torno de oito semanas. (ROUSH, 2005; DENNIS et al., 2010), havendo variações relacionadas ao tipo de fratura, ao método de fixação, à idade do paciente, à existência de doenças concomitantes, e aos cuidados pós-operatórios (DENNY,1991; PIERMATTEI et al., 2006).

É possível a observação em fraturas recentes via método radiográfico, a presença de linha aguda bem definida associada ou não ao aumento de tecidos moles. Não sendo possível a observação da mesma linha em fraturas mais antigas, radiografadas entre uma semana a dez dias. Isso se deve ao início da reabsorção óssea e da reação periosteal que ocorre nessa fase. Entre duas a três semanas, observa-se que a reação periosteal está bastante evidente e que o calo

já apresenta regiões de mineralização. Entre quatro a oito semanas a linha de fratura encontrase preenchida pelo calo ósseo. Entre oito a doze semanas o calo já sofre remodelamento e já é ocorre a constatação de que há incorporação ao osso e diminuição do calo ósseo (KEALY et al., 2011).

2.2 Banco de ossos

A partir da década de 70, utilização de ossos homógenos em procedimentos ortopédicos têm crescimento constante na medicina humana, justificando a criação de banco de ossos (BIAGINI et al., 1999). Porém, há riscos ao receptor desses fragmentos ósseos coletados, como a transmissão de doenças, reações imunológicas e infecções (MISCH; DIETSH, 1993), por conta disso, houve a necessidade de hospitais desenvolverem em conjunto ao banco de ossos, bancos de tecidos músculo-esqueléticos para que esses riscos sejam minimizados. O objetivo destes bancos são a obtenção, processamento, armazenamento e seleção para que os homoenxertos possam ser utilizados com maior segurança. (RONDINELLI et al., 1994; DEL VALLE et al., 2006).

O tratamento e armazenamento de tecidos foi descrito na década de 60 pelo pesquisador Imamanaeiv na Rússia e muitas pesquisas têm sido realizadas com o tema. Em 1982 foi criado em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, o primeiro Serviço de Banco de Ossos institucionalizado no Brasil. Desde então, o material estocado tem sido utilizado com sucesso em casos complexos de reconstrução óssea. (AMATUZZI et al. 2000; ROSS et al., 2000).

São amplas e rotineiras as discussões e modificações relacionadas às normas e rotinas da coleta, processamento, armazenamento e doação dos ossos. A remoção dos enxertos deve ocorrer em ambiente estéril, seguindo normas de biossegurança. O doador deve cumprir os critérios estabelecidos para doação (não ser acometido por doença crônica ou contagiosa, bem como não ter tido histórico de infecção e não estar por mais de 72 em respirador ou sob uso crônico de esteroides) (FEOFILOFF; JESUS-GARCIA, 1996; AMATUZZI et al., 2000).

A remoção dos fragmentos deve se iniciar pelos membros e por último pela porção do quadril. Então são retirados os tecidos moles e cartilagem. Em seguida, devem ser lavados em solução com antibiótico e retirados pequenos fragmentos, colocados em container com dupla proteção para realização de cultura (AMATUZZI et al, 2000; ROSS et al., 2000). A porção coletada é acondicionada em invólucros simples, sob solução antibiótica, seladas hermeticamente e encaminhados ao banco de tecidos à temperatura de -4°C, para o

processamento (AMATUZZI et al., 2000; ROSS et al., 2000). Os enxertos são armazenados à -70°C até que se constate nos resultados dos exames que não há nenhuma afecção ou infecção e, caso haja, o material deve ser descartado. Além disso, em todos as amostras coletadas, são realizadas radiografias para identificar lesões ou malformações ósseas que possam prejudicar o receptor (FEOFILOFF; JESUS-GARCIA, 1996; AMATUZZI et al., 2000; ROSS et al., 2000).

Para o processamento dos homoenxertos, podem-se utilizar ácidos, como o ácido clorídrico, associado a uma solução composta por cálcio a 5%, bombeamento em água por 12 horas, liofilização, e armazenamento a -80 °C. Tal etapa garante a esterilização e a preservação das propriedades osteocondutivas, osteoestimuladoras e osteoindutoras. Entretanto, a cuidadosa seleção do doador é fundamental na prevenção da transmissão de doenças infecto-contagiosas (VASTEL et al., 2004).

Dentre as diversas técnicas de conservação, a glicerina merece ser destacada, é uma substancia orgânica, triálcool, que se une aos ácidos graxos para formar gorduras, líquido incolor, higroscopico, espesso e xaroposo, se funde a 17°C e entra em ebulição a 290°C. (FERREIRA, 1999), é um bom meio de conservação dos fragmentos destinados à implantação óssea, pois, além de baixo custo, mantém os fragmentos ósseos livres de contaminação, reduzindo a antigenicidade e preservando as funções de osteoindução e osteocondução. (CAVASSANI et al., 2001, ZILIOTTO et al., 2003)

O uso da glicerina, além de se tratar de um método acessível economicamente, ainda não se faz necessário o congelamento ou autoclavagem, técnicas que podem causar danos ao tecido ósseo, não foi observado diferença considerável quanto ao crescimento de microorganismos na glicerina a 98% autoclavada e *in natura*, em um período igual ou menor a 24 meses (ROE et al., 1988) e sequer rejeição do organismo ao meio de conservação no pósoperatório.

2.3 Enxertos e implantes ósseos

Os enxertos ósseos, utilização de tecido vivo viável, podem ser classificados como autoenxertos (autólogo ou autógeno), que consiste na transferência de tecido ósseo de um local para outro em um mesmo indivíduo; em aloenxerto (homoenxerto) que consiste na transferência de tecido entre dois indivíduos geneticamente diferentes, porém da mesma espécie e em xenoenxerto (heteroenxerto) que é a transferência de tecido de um doador de uma espécie diferente (STEVENSON, 1999).

O autoenxerto de osso esponjoso, possui propriedade osteogênica devido a extensa área trabecular, na qual encontra-se coberta por células de revestimento do tecido ósseo e por osteoblastos ativos com elevada capacidade de neoformação de tecido ósseo transplantadas em associação com células da medula óssea (FRIEDLAENDER, 1987).

A incorporação do autoenxerto de osso esponjoso no leito receptor se subdivide em cinco etapas sucessivas: a aplicação do enxerto, na qual se inclui a formação de hematoma com liberação de citocinas e fatores de crescimento; a vascularização do enxerto, aonde ocorre a inflamação, migração e proliferação de células mesenquimais e formação de tecido conjuntivo fibrovascular no interior e ao redor do enxerto; o momento da osteoindução na qual ocorre a neovascularização no tecido ósseo enxertado; o momento da osteocondução, em que obtêm-se a substituição por reabsorsorção osteoclástica do enxerto com formação de tecido ósseo não lamelar sobre as trabéculas necrosadas, pelos osteoblastos do leito receptor; e o remodelamento, com a transformação do osso lamelar, por influências mecânicas (STEVENSON, 1999; BAUER e MUSCHLER, 2000). A incorporação de aloenxertos conservados, é similar à descrito anteriormente, todavia é mais delongada e discretamente inferior ao autoenxerto, isso se deve ao processo inflamatório mais expressivo e por se necessário que as células osteoblásticas sejam provenientes apenas do leito receptor. (FRIEDLAENDER, 1988; ARONSON E CORNELL, 1999; BAUER e MUSCHLER, 2000; FLEMING JR et. al, 2000).

Os substitutos hetero ou xenoimplantes comumente possuem apenas funções biológicas de osteocondução e eventualmente osteoindução, associadas a resistência mecânica necessária e para a execução das funções de suporte (FLEMING JR et al, 2000).

Foi possível observar em FREITAS et al. (2014), no qual foram realizadas implantações de heteroimplantes ósseo canino associados ao PMMA em falhas ósseas padronizadas em tíbias de coelhos, que este compósito teve boa integração e promoveu o reparo dos defeitos ósseos sem sinais de rejeição ou infecção, sendo biologicamente compatível e seguro.

Foram usados heteroimplantes ósseos bovinos, preservados em glicerina como um espaçador na técnica de avanço da tuberosidade da tíbia como tratamento para deficiência do ligamento cruzado cranial em Junior et al. (2018), sendo possível observar que estes heteroimplantes foram capazes de promover o avanço da tuberosidade tibial e possibilitaram consolidação óssea em todos os casos testados, sem sinais de infecção e contaminação. Mostrando ainda, em imagens radiográficas, sinais de reabsorção e remodelamento ósseo em torno do implante, com significativa união das faces ósseas osteotomizadas, indicando melhor

biocompatibilidade e osteoconductividade quando comparados ao *cage* de titânio usado na técnica convencional. (CASTILHO et al. 2014)

A incorporação ou integração de um heteroimplante ou xenoimplante se inicia com a formação de hematoma, com recrutamento de água e glicoproteínas aos tecidos orgânicos adjacentes ao implante durante a reação inflamatória, seguida de várias células, sobretudo leucócitos e macrófagos, devido a presença de corpo estranho, os macrófagos desempenham a fagocitose, estimulando a atividade dos linfócitos, fibroblastos, osteoblastos e demais células polimorfonucleares (GUTIERRES et al, 2006). Consequentemente, inicia-se a angiogênese com migração e proliferação de células endoteliais, possibilitando a neovascularização, e assim o fornecimento de oxigênio e nutrientes (DAVIES, 2000). Ao final, tem-se a ação das citocinas, IL-1 (interleucina 1) e IL-2 (interleucina 2), e múltiplos fatores de crescimento, então, ocorre a diferenciação de células mesenquimais na linha osteoblástica com formação de osteóide e matriz extra celular óssea, sendo o remodelamento e maturação as últimas fases, idêntico à biologia de formação do calo ósseo (ANDERSON, 2001).

2.4 Polimetilmetacrilato

O PMMA, com o nome IUPAC, nomenclatura química, de poli [1- (metoxi carbonil) -1-metil etileno] do ponto de vista de hidrocarbonetos e poli (2-metilpropenoato de metila) do ponto de vista do éster, é um polímero sintético do monômero de metacrilato de metila (MALCOM 1990). Ele foi descoberto no ínicio dos anos 30, pelos químicos britânicos Rowland Hill e John Crawford, e sua primeira aplicação foi realizada pelo químico alemão Otto Rohm em 1934 (HENRI, 2007).

As resinas acrílicas são compostos orgânicos da classe dos polímeros, os quais são produzidos sinteticamente e cuja química baseia-se no carbono, hidrogênio e em outros elementos não metálicos. Após serem moldadas e endurecidas, podem apresentar características fibrosas, borrachoides, resinosas e rígidas, sendo, por sua vez, determinadas por sua morfologia molecular (CAMACHO et al., 2014).

No âmbito de resistencia mecânica, o PMMA possui um alto módulo de Young e um baixo alongamento na ruptura. Dessa forma, ele não se quebra com a ruptura e dentre os termoplásticos, é um dos que apresenta maior rigidez, altamente resistente à arranhões. Possui também razoável resistência a produtos químicos, não sendo danificado pela solução aquosa da maioria dos produtos químicos laboratoriais. Entretanto, aponta baixa resistência a hidrocarbonetos clorados e aromáticos, ésteres ou cetonas. (CHARLES et al, 2003; VAN KREVELIN et al., 2003).

Este polímero é um material aloplástico de ampla utilização na medicina, que envolve a preparação de cimentos ósseos para liberação de medicamentos e cranioplastia. As qualidades que permitem que um polímero tenha potencial para essas aplicações, as quais o PMMA atende, incluem: não toxicidade, fácil processabilidade, reações inflamatórias mínimas com os tecidos, maior resistência à fratura, biocompatibilidade, não condutor térmico, nem magnético, deverá ser radiopaco, leve, rígido, simples de confeccionar, facilmente aplicável e economicamente viável. Uma grande vantagem da utilização de materiais aloplásticos, a possibilidade da préfabricação dos implantes, permitindo planejamento cirúrgico personalizado, proporcionando menor morbidade e maior possibilidade de sucesso no procedimento. (SOUZA, 2009).

Foi relatado em Thomson et al. (1992), a biocompatibilidade de quatro diferentes cimentos ósseos comerciais de PMMA in vitro e in vivo, foram estudadas a integridade e a inflamação celular. Baseado nos resultados obtidos, os estudos in vitro manifestaram o potencial inflamatório dos quatro cimentos ósseos, por causarem danos celulares. Ao passo que in vivo, todos os quatro cimentos ósseos mostraram compatibilidade, no joelho de ratos, quando avaliados durante o período de duas a 52 semanas.

Utilizado há cerca de 50 anos com o objetivo de acoplar implantes artroplásticos ao tecido ósseo adjacente, o PMMA é uma resina acrílica resultante da polimerização do metacrilato de metila (MMA), possui características vítreas, o que dificulta a difusão subsequente do monômero e a propagação da cadeia. (ROBERT et al., 2008).

O processo químico da polimerização se inicia pela mistura do monômero (líquido) ao pré-polimerizado (pó), momento em que a decomposição do peróxido de dibenzoil pela N,N dimetil paratoluidina produz radicais (benzoílos), que atacam a insaturação carbônica do metacrilato de metila, levando assim radicais livres na molécula do monômero. A ligação entre átomos de carbonos de moléculas adjacentes, por meio dos radicais livres, desencadeia a formação de longas cadeias cujos pesos moleculares variam entre 250 mil a 800.000 daltons, (GOMES, 2010).

2.5 Biomateriais

Desde a antiguidade, a utilização de biomateriais tem aproveitamento para saúde humana. Existem relatos do uso de sutura de linho e ouro no Antigo Egito (2000 AC), de intestino de felinos na Europa na idade média e utilização de substitutos de dentes feitos de conchas pelos Maias (600AC), e de ferro pelos Franceses (200AC) e de ouro e/ou madeira pelos romanos, astecas e chineses. Observou-se também eficiente integração de substitutos ósseos provenientes de madeira no antigo Egito e na Europa, na idade média (IRREL BIERHALZ e MORAES, 2015).

A definição de biomaterial é, um material sintético o qual é tolerado de forma permanente ou transitória pelo organismo dos seres vivos, possuindo a finalidade de restaurar tecidos, órgãos ou funcionalidade de organismos vivos (SANTOS, 2008). É definido também como quaisquer dispositivos que entram em contato com o sistema biológico, com aplicações diagnósticas, cirúrgicas, terapêuticas, vacinais, podendo possuir constituição natural ou sintética, assim como materiais naturais modificados quimicamente (BIERHALZ e MORAES, 2015). Dentre alguns exemplos de biomateriais estão: biossensores, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise, suturas, placas, substitutos ósseos, malhas, válvulas cardíacas, lentes e dentes, implantes subdérmicos e até órgãos artificiais (BIERHALZ e MORAES, 2015).

O emprego dos biomateriais biopoliméricos na medicina englobam o tratamento de feridas, liberação de fármacos, devido a suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, parecida com a matriz extracelular e por induzir o processo de cicatrização tecidual (GOMES, 2010; GUO et al., 2013). As propriedades biológicas que são priorizadas, no momento de se decidir por um biomaterial são biocompatibilidade, hemocompatibilidade, citotoxicidade, alergenicidade, estimulação de adesão e proliferação celular. E as propriedades físicas seriam: morfologia, energia superficial, encaixe anatômico, rugosidade, porosidade, transparência, cor, permeabilidade, e capacidade mecânica, tensão à ruptura, flexibilidade; já as químicas se baseiam em densidade, resistência à esterilização, degradação in vivo e estabilidade (GOMES, 2010).

Um biomaterial é considerado tóxico quando há morte celular adjacente ao implante e não tóxicos quando há formação de fibrose em torno do implante, possibilitando crescimento celular, ademais ainda há a possibilidade de substituição da matriz do próprio biomaterial (BIERHALZ e MORAES, 2015).

Compósitos ou materiais compostos são materiais de engenharia que consistem em dois ou mais materiais constituintes com grandes discrepâncias em suas propriedades físicas, químicas e mecânicas. As propriedades características desses compostos são o resultado das propriedades individuais de suas partes constituintes e suas respectivas frações de volume e arranjos no sistema de material. Dependendo da aplicação pretendida, os compostos podem ser projetados para satisfazer requisitos geométricos, estruturais, mecânicos, químicos e às vezes estéticos específicos. Materiais metalicos, poliméricos e cerâmicos tem sido bastante utilizados para tratamentos médicos reconstrutivos (EGBO, 2020).

O uso de compósitos tem se mostrado eficiente para o reparo de fraturas ósseas, devido ao fato de mimetizarem a estrutura e propriedades do tecido ósseo. Desse modo, se tornam altamente compatíveis e onteocondutores, proporcionando suporte para a consolidação óssea. Ademais, são biodegradáveis, não precisam ser removidos após cumprir seu propósito, e é possível seu uso para confecção de dispositivos de fixação interna. Também é possível usar uma matrix biodegradavel em conjunto de fármacos, desenvolvida para dissolver ao longo do tempo, liberando a droga enquanto o tecido ósseo se consolida, funcionando como um auxiliar neste processo (EGBO, 2020).

O diagnóstico por imagem, através da radiologia, possibilita a avaliação do comportamento de biomateriais em procedimentos ortopédicos. Por meio deste método, é possível localizar a posição do biomaterial no leito receptor, o remodelamento ósseo e quantificar as reações locais. O seu uso no acompanhamento pós-operatório dos procedimentos cirúrgicos ortopédicos de rotina e experimentais tanto na medicina humana, como na medicina veterinária se torna imprescindível (FREITAS et al., 2013b; MOREIRA et al., 2014).

Utilizando-se da microscopia eletrônica de varredura (MEV), as estruturas presentes na interface entre o biomaterial e o leito receptor podem ser analisadas em alta resolução, proporcionando maior compreensão dos fenômenos locais. Assim, é possível estabelecer a distinção entre o seu contato físico e a adesão química com o leito receptor. A MEV mostrouse um método auxiliar importante no estudo das estruturas presentes na interface entre o biomaterial e o leito receptor em tíbia de coelho (MAYER et al., 1998; GARTNER e HIATT, 1999; SABOIA et al. 2000; TIMM, 2005; COSTA et al. 2015).

3 HIPÓTESE

Espera-se que os compósitos constituídos de MOMHTc e MOMHTb associados ao PMMA sejam incorporados e integrados aos leitos receptores de tíbias de coelhos, tornando-se fontes de substitutos ósseos para o tratamento de afecções ortopédicas que culminem com grandes perdas ósseas ou não união ósseas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Analisar as interfaces entre compósitos constituídos de MOMHTc e MOMHTb associados ao PMMA e as falhas ósseas de tíbias de coelhos.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito citotóxico dos compósitos constituídos de MOMHTc e MOMHTb associados ao PMMA;
- Analisar por meio de técnica radiológica (ou radiográfica) digital o comportamento de compósitos constituídos de MOMHTc e MOMHTb associada ao PMMA em falhas ósseas de tíbias de coelho, em diferentes tempos;
- Analisar macroscopicamente o comportamento de compósitos constituídos de MOMHTc e MOMHTb associados ao PMMA em falhas ósseas de tíbias de coelhos, em diferentes tempos;
- Analisar por meio de técnica de MEV as superfícies externas (periósteo) e interna (endósteo) e as interfaces de compósitos constituídos de MOMHTc e MOMHTb associados ao PMMA em falhas ósseas de tíbias de coelhos, em diferentes tempos;
- Analisar por meio de técnica EDS três pontos de integração das interfaces dos compósitos constituídos de MOMHTc e MOMHTb associados ao PMMA em falhas ósseas de tíbias de coelhos, em diferentes tempos;
- Comparar os resultados obtidos por meio das técnicas radiológicas, de MEV e de EDS de compósitos constituídos de MOMHTc e MOMHTb associados ao PMMA em falhas ósseas de tíbias de coelhos, em diferentes tempos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

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.

5.1 Preparo das matrizes ósseas mineralizadas heterólogas trabeculares canina e bovina MOMHT(c/b)

A MOMHTc foi coletada assepticamente da metáfise distal de fêmur de caninos adultos sadios, 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 serra manual, segmentos transversais de 5mm de comprimento da metáfise proximal foram coletados, e o tecido medular mole foi 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 não inferior a 30 dias, em temperatura ambiente, até o momento do uso.



Figura 1. MOMHT (c/b) acondicionadas em frascos plásticos contendo glicerina (glicerol) à 98% (A e B). 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 à 98% foram hidratadas/lavadas com solução salina a 0,9% por 10 minutos (3 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% (C), lixamento das MOMHT (c/b) até atingir espessura de 4mm (D e E) cuba ultrassônica contendo solução salina a 0,9% para lavagem das MOMHT (c/b) (F).

5.2 Preparo dos compósitos constituídos de MOMHT (c/b) e PMMA

Com uso de gazes estéreis, as MOMHT (c/b) foram desidratadas e incorporadas à resina acrílica (VIPI flash), ainda na fase líquida, preparado com polímero de PMMA (pó) e monômero de PMMA (líquido), na proporção de 1/1, em molde de silicone (Figura 3).

Após a polimerização, ou seja, a cura, os blocos das MOMHT (c/b) foram desgastados com o uso de lixa d'agua (n°400) acoplada em politriz/lixadeira metalográfica, sob irrigação, até atingir espessura de 2 mm (Figura 4A).



Figura 3. Incorporação de PMMA às MOMHT (c/b) (A-D).

Os blocos preparados de (MOMHTc/b) foram fixados num suporte (morsa) móvel com garras em aço inoxidável e poliamida (Figura 4B). Com uso de broca trefina com diâmetro interno de 6 mm acoplado à caneta de baixa rotação foram removidos discos de 6mm de diâmetro, compósitos, que foram acondicionados em cuba ultrassônica (10 minutos) contendo solução salina a 0,9% para remoção de micro fragmentos presentes durante o processamento (Figura 4).



Figura 4. Confecção de compósitos de MOMHT(c/b) associados ao PMMA. Bloco de biomaterial com 2 mm de espessura (A), obtenção dos discos com uso de broca trefina (B), compósitos prontos (C) e compósitos em cuba ultrassônica contendo solução salina a 0,9% em (D).

Após esse período, os compósitos foram removidos da cuba do ultrassom, desidratados sobre gazes estéril, encaixado em molde de aço inoxidável, acondicionados em grau cirúrgico e esterilizados em autoclave à 121°C, por 15minutos de esterilização e 15 minutos de secagem (SPIN-NETO et al., 2008), no Laboratório de Biomaterial com Potencial Aplicação Clínica - LABIPAC, Departamento de Medicina Veterinária-ZMV, da FZEA da USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga/SP) (Figura 5).



Figura 5. Compósitos embalados em grau cirúrgico, encaixados em suporte de aço inoxidável – seta preta (A) e autoclave super vaccum utilizada para o processo de esterilização dos compósitos (B).

5.2 Ensaio de biocompatibilidade - Teste de citotoxicidade dos compósitos constituídos de MOMHT (c/b) e PMMA

5.2.1 Cultivo Celular

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 (Figura 6). Em seguida a solução foi filtrada. As células foram descongeladas e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi homogeneizado e ressuspendido 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. 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).

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 foi realizado a homogeneização e o descarte do 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 o meio completo para inativar a tripsina, o homogeneizou e com auxílio da pipeta foi transferido todo o conteúdo para um tubo Falcon estéril. Em seguida a solução passou por homogeneização e foi coletado 10µL em um microtubo. Acrescentou-se 10µl de azul tripano, foi homogeneizada novamente e colocada na câmara de Neubauer (Figura 7). Os quatro 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).

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.





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



Figura 9. Transferência do cultivo celular para as placas de cultura com fundo chato de 96 poços.

5.2.2 Ensaio de citotoxicidade por contato indireto.

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 0,6g de MOMHT (c/b) e PMMA em 6 mL de meio ausente de células. Em continuidade, o extrato foi mantido em estufa durante o período de 24h (Figura 10).



Figura 10. Extrato pronto para ser incubado em estufa.

Após o intervalo de tempo estipulado, realizou-se a diluição do extrato totalizando 6mL de solução, sendo 3 mL de meio sem a presença de células e 3 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 3mL da concentração e acrescentou mais 3 mL de meio, determinando a diluição em 50%. Posteriormente, recolheu-se 3 mL dessa mesma solução e adicionou mais 3 mL de meio, formando a diluição de 25%. O procedimento foi repetido mais uma vez para a formação da diluição de 12,5 %.

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 11).



Figura 11. Diluições dos compósitos de MOMHTb + PMMA: B1 -100%; B2-50%; B3- 25% B4- 12,5% (A). Diluições dos compósitos de MOMHTc + PMMA: C1 -100%; C2-50%; C3- 25% C4- 12,5% (B).

Foram preparadas três placas de 96 poços com fundo chato no total (Figura 12). A disposição dos componentes nos poços foi a seguinte: na 1ª 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. 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 2ª fileira da placa. O controle negativo foi definido com a utilização de meio junto ao cultivo celular na 3ª e 4ª fileira da placa. Da 5ª a 8ª fileira, foram incorporados os extratos relacionados aos compósitos de MOMHTc + PMMA, sendo respectivamente, 12,5% (C4); 25% (C3); 50% (C2) e 100% (C1). Nas demais fileiras da placa (9ª até a 12ª) foram adicionados os extratos referentes aos compósitos de MOMHTb + PMMA, sendo respectivamente: 12,5% (B4); 25% (B3); 50% (B2) e 100% (B1). A placa foi mantida novamente em estufa por 24 horas, à 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO2. Após esse período em estufa umidificada, foi avaliada a viabilidade celular em microscópio invertido de fluorescência Axiovert.A1 (Carl Zeiss) (Figura 13).



Figura 12. Placa montada com os controles negativos, controle positivo e diluições dos compósitos de MOMHT (c/b).



Figura 13. Análise da viabilidade celular ao microscópio invertido de fluorescência Axiovert.A1 (Carl Zeiss).

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 5 mg/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 (Figura 14).



Figura 14. Poços da placa com a solução de MTT antes do processo de incubação.

Após o período, o meio foi retirado das placas e foi acrescentado 100 µL 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 da placa em espectrofotômetro FLUOstar OPTIMA

Para avaliação da comparação entre o nível de citotoxicidade e as diluições de cada amostra foi realizada a análise de variância Kruskal-Wallis test (ANOVA) não paramétrico com auxílio software GraphPad Prism 5®, considerando significativos os valores de p ≤0,05.

5.4 Procedimento cirúrgico

Foram utilizados doze coelhos, da ordem *Lagomorpha*, gênero *Oryctolagus*, espécie *Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia, variedade branco, machos e 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 tíbias 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 dexmedetomidina, 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 propofol 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 lidocaína 2%. Decorridos 5 minutos da realização do bloqueio locorregional, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre 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 5 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 determina por meio da visualização do gradil costal do animal e a temperatura foi monitorada de forma contínua, por meio do posicionamento de termômetro no orifício anal.

Após serem posicionados em decúbito dorsal em calha cirúrgica, realizada antissepsia com iodo-álcool-iodo, as áreas cirúrgicas foram protegidas com panos de campos esterilizados descaráveis e de contato (Tegaderm). Com uso de lâmina de bisturi n°23, criou-se incisão cutânea (aproximadamente 3 cm de comprimento), dissecção do tecido subcutâneo, incisão sobre o periósteo e exposição do córtex da metáfise medial proximal de tíbia. Com uso de broca trefina de 6 mm de diâmetro acoplada ao motor elétrico odontológico de baixa rotação (Omega III), criaram-se falhas ósseas nas tíbias. 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 MOMHT (c) e MOMHT (b) previamente esterilizados (Figura 5), o periósteo e o tecido subcutâneo aproximados com poliglactina 910 (4-0) e a pele aposicionada com poliamida (4-0) (Figura 16).



Figura 16. Procedimento cirúrgico realizados nos animais experimentais. Proteção das áreas operatórias com panos cirúrgicos descartáveis e de contato (Tegaderm – círculo pontilhado) (A), realização da incisão cutânea e exposição da cortical óssea (B), realização da falha óssea com broca trefina – seta branca (C), falha óssea na tíbia – seta amarela (D), implantação do compósito constituído de MOMHT (c/b) na falha óssea (E) e aposição dos tecidos moles (F).

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

Os animais foram alojados em células individuais de Racks Ventiladas para coelhos (Rabbitat – Alesko), 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 (Figura 17).



Figura 17. Rack ventilada alocada no biotério da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) (A) e coelho em célula de rack ventilada (B).

As regiões implantadas das tíbias dos coelhos, com uso de equipamento digital (PXP 20HF Plus e PIXX1717) foram radiografadas (50mA, 0,04s e 40KV), nas projeções mediolateral, no pós-operatório imediato, e aos 30, 60, 90 e 120 dias de pós-operatório.

5.5 Coleta e processamentos das amostras

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%, até o processamento (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 oscilatório (C) e remoção de tecidos moles do tecido ósseo coletado (D).

Após período de fixação, de cada tíbia coletada, foi removido um segmento ósseo de aproximadamente (10 mm 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 19).



Figura 19. Tecido ósseo de tíbia de coelho preservado em álcool 70% (A), leito receptor de tíbia contendo o compósito - círculo pontilhado (B), tecido ósseo fixado em cortadora de precisão – seta amarela (C) e segmento ósseo do leito receptor de tíbia de coelho contendo o compósito – círculo pontilhado (D).

As amostras fixadas em álcool 70% e padronizadas foram desidratadas em solução crescente de álcoois: 24 horas em álcool 70%, seguido de agitação por uma hora em agitador linear (LGI-SK-L330, Laborglas, São Paulo/SP) (Figura 20A), 24 horas em álcool 80%, agitação por uma hora, 24 horas em álcool 96%, agitação por uma hora e, para concluir o processo de desidratação, a última etapa do processo foi repetida. Em seguida as amostras foram acomodadas em tubos falcon de 15 mL identificados contendo resina acrílica (LR White Hard Grade, London, UK) agitação por uma hora, acondicionadas em refrigerador a 4°C por 24 horas (Figura 20B). Após esse período, os frascos contendo a resina e amostras foram acomodadas em estufa a vácuo a -500 mmHg (SL 1004/30, SOLAB, Piracicaba, SP), por uma hora (Figura20C) e mantidas pelo mesmo período em agitação. Esse processo foi repetido 14 dias, trocando a resina a cada 24 horas. No décimo quinto dia, as amostras foram acomodadas em recipientes cilíndricos de polipropileno (formas) contendo resina acrílica LR pura (Figura 20 D) e após polimerização em estufa a vácuo à 60°C por 12 a 18 horas (Figura 21).



Figura 20. Processamento das amostras. Agitador linear utilizado nas etapas de desidratação e infiltração da resina da resina LR (A). Amostras acondicionadas em resina LR em tubos falcon (B). Estufa a vácuo utilizada na infiltração das amostras e polimerização da resina LR (C) e amostras acomodadas em recipientes (formas) cilíndricos de polipropileno contendo resina acrílica LR pura prontas para polimerização (D).



Figura 21. Amostra contendo leito receptor e compósito infiltrada e emblocada com resina acrílica LR.

Duas mostras emblocadas de cada grupo experimental (E1, E2, E3 e E4) tiveram as irregularidades das faces externas (corte sagital), região periosteal, que compreendem o leito receptor e o compósito, aplainadas/lixadas, com o uso de lixas d'agua (nº 400 a 2000) acopladas à politriz/lixadeira metalográfica, sob irrigação, até atingir uma superfície plana e regular. Para concluir, as superfícies das amostras previamente preparadas foram polidas em pano de polimento (20 mm) acoplado à politriz, irrigada com solução de alumina (0,3 μ) (Figura 22).



Figura 22. Aplainamento/lixamento da amostra em lixadeira metalográfica sob irrigação (A) e polimento das superfícies das amostras previamente lixadas com pano de polimento e solução de alumina (B).

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 cortadora de precisão sob irrigação e re-emblocada em resina acrílica (Figura 23). Para remover as irregularidades dos segmentos previamente seccionados (corte transversal), as suas superfícies, leito receptor-compósito-leito receptor, foram utilizados os mesmos procedimentos acima citados.



Figura 23. Corte transversal da amosta re-emblocada. Observe leito receptor (setas vermelhas) e compósito (seta amarela).

Após o polimento as amostras tiveram suas superfícies previamente avaliadas com uso de esteriomicroscópio (Ez4 – Leica) para, na sequência, serem avaliadas pela MEV e EDS (Figura 24).



Figura 24. Avaliação da superfície dos compósitos constituídos de MOMHT (c/b) associadas ao PMMA. (Estereomiscrocopio Ez4 – Leica) (8 a 35X).

5.6 Análise pela MEV/EDS

As amostras processadas foram analisadas no laboratório (Plano de Gestão de Uso – Microscopia eletrônica de varredura-MEV, equipamento multiusuário-MEU, Departamento de Zootecnia-ZAB, da FZEA da USP, Campus Fernando Costa, Pirassununga/SP), para análise pela MEV e pelo 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 25).



Figura 25. Microscópio eletrônico de varredura (MEV) utilizado para análise das amostras. (Modelo TM3000, HITACHI – Japão).

Como controle, foi utilizado o PMMA presente no compósito, que mesmo sendo biocompatível e biotolerável, não se integra ao tecido ósseo do leito receptor de tíbias de coelhos (MOREIRA et al., 2014).

6 RESULTADOS

6.1 Avaliações de citotoxicidades

Após adição de solução de MTT nos poços das placas e incubação em estufa por 2 horas observou-se mudança de coloração dos substratos, de amarelo pálido para azul/violeta (Figura 26).



Figura 26. Placas após a reação ao MTT. Observe poços com coloração azul/violeta.

Ao microscópio invertido de fluorêscia (Axiovert.A1) *observou-se no* grupo controle negativo (CT) que houve intensa formação dos cristais, demonstrando significativa atividade celular (Figura 27).



Figura 27. Fotomicrografia do grupo controle negativo (CT). Observe presença de cristais do MTT. (Objetiva 10x).

Observou-se ao microscópio que o controle positivo, ou seja, o DMSO, o qual possuiu características citotóxicas, ausência de cristais de MTT. Além disso, também houve redução considerável da celularidade, indicando que ocorreu morte celular (Figura 28).



Figura 28. Fotomicrografia do grupo controle positivo (DMSO). Observe presença de poucas células (Objetiva 10x).

Análise dos resultados referentes a viabilidade celular das diluições obtidas das MOMHT (c/b) e PMMA, através do espectrofotômetro (*FLUOstar OPTIMA*), pode-se notar que houve diferença significativa entre o grupo controle negativo (CT) e o controle positivo (DMSO). Tal resultado já era esperado, pois o DMSO possui maior reação citotóxica dentre todas as outras amostras apresentadas, consequentemente, o metabolismo celular estava diminuído, não ocorrendo a transformação colorimétrica do teste. Já o grupo CT, por não possuir nenhuma substância que lesionassem as células, apresentou-se com maior atividade celular, sendo a amostra com maior intensidade colorimétrica, devido a reação do teste. Assim, ambas as porções contêm uma relação inversamente proporcional (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão obtidos a partir dos testes de citotoxicidade de extratos de amostras de biomateriais de diferentes diluições. CT – meio com células viáveis, DMSO- meio com DMSO e células inviáveis, C4 – Biomaterial canino 12,5%, C3- biomaterial canino 25%; C2- Biomaterial canino 25%, C1- Biomaterial canino 50%, B4 – Biomaterial bovino 12,5%, B3- biomaterial bovino 25%; B2- Biomaterial bovino 25%, B1- Biomaterial bovino 50%,

| Amostras | Controle | Controle | Diluição | Diluição | Diluição | Diluição |
|----------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| | negativo | positivo | 12,5% | 25% | 50% | 100% |
| | СТ | DMSO | C4 | C3 | C2 | C1 |
| MOMHTc e | 100 | -9,785183 | 93,78548 | 93,192416 | 75,401414 | 64,461594 |
| PMMA. | <u>+</u> 22,48033 | <u>+</u> 16,44302 | <u>+</u> 20,7449 | <u>+</u> 15,35417 | <u>+</u> 16,8817 | <u>+</u> 24,192352 |
| | СТ | DMSO | B4 | B3 | B2 | B1 |

| MOMHTb e | 100 | -9,785183 | 62,865272 | 57,866992 | 50,494799 | 35,58355 |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| PMMA. | <u>+</u> 22,48033 | <u>+</u> 16,44302 | <u>+</u> 17,27031 | <u>+</u> 13,96091 | <u>+</u> 18,97141 | <u>+</u> 28,55803 |

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

Comparando-se o grupo DMSO com os grupos de diluições de origem dos compósitos constituídos de MOMHTc e PMMA (C4, C3, C2 e C1), observou-se que houve contraste, principalmente entre o DMSO e o C4 que é a amostra mais diluída, com a concentração de 12,5%. Percebeu-se que a porcentagem de citotoxicidade é gradual entre os compósitos caninos, de forma que quanto maior for a diluição, menor será o efeito citotóxico. Desse modo, na ordem crescente do grau de citotoxicidade, temos: C4, C3, C2 e C1 respectivamente (Figura 29).



Figura 29. Viabilidade celular (Média <u>+</u> Desvio Padrão) das diferentes diluições dos compósitos constituídos de MOMHTc e PMMA. CT, DMSO, C4 (diluição de 12,5%), C3 (diluição de 25%), C2 (diluição de 50%) e C1 (diluição de 100%).

O mesmo evento ocorreu com as diluições (B4, B3, B2, B1) obtidas dos compósitos constituídos de MOMHTb e PMMA, porém de forma mais intensa. Nota-se que o nível de citotoxicidade também ocorreu de forma progressiva desde B4 até B1, sendo este último possuindo características mais agressivos de todas, mesmo comparando-se com os extratos obtidos da MOMHTc e PMMA (Figura 30).



Figura 30. Viabilidade celular (Média <u>+</u> Desvio Padrão) das diferentes diluições dos compósitos constituídos de MOMHTb e PMMA. CT, DMSO, B4 (diluição de 12,5%), B3 (diluição de 25%), B2 (diluição de 50%) e B1 (diluição de 100%).

Correlacionando as amostras do Controle Negativo com as diluições caninas, não foi possível diagnosticar diferença significativa, porém, como dito anteriormente, o efeito mais citotóxico foi observado na amostra C1, a qual apresentava-se na diluição 100%, ou seja, a solução mais pura dentre as demais.

6.2 Avaliações radiográficas

As avaliações radiográficas digitais realizadas nas tíbias dos coelhos no pós-operatório imediato demonstraram que todos os compósitos constituídos de MOMHT(c/b) e PMMA implantados permaneceram acomodados em seus leitos receptores (Figuras 31-38).

Aos 30 dias de pós-operatório os compósitos constituídos de MOMHTc e PMMA 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 (Figura 31, E1, n: 1, 2 e 3).



Figura 31. Imagem radiográfica mediolateral do terço proximal de tíbias direitas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTc e PMMA no pós-operatório imediato (setas amarelas) e aos 30 dias (setas brancas). Observe áreas radiopacas (MOMHTc), radioluscentes (PMMA) e circulares radiopacas bem definidas envolvendo os compósitos aos 30 (E1, n:1, 2 e 3) dias. Observar diferença de densidade entre os compósito e tecido ósseo adjacente.

Já aos 60 dias (Figura 32, E2, n: 1, 2 e 3), observou-se aumento da radiopacidade nas interfaces entre os compósitos de MOMHTc e PMMA com os leitos receptores, provavelmente devido a osteocondução e formação óssea nessas regiões, sendo este evento observado com maior intensidade aos 90 dias (Figura 33, E3, n: 1, 2 e 3).



Figura 32. Imagem radiográfica mediolateral do terço proximal de tíbias direitas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTc e PMMA no pós-operatório imediato (setas amarelas) e aos 60 dias (setas brancas). Observe áreas radiopacas (MOMHTc), radioluscentes (PMMA) e circulares radiopacas bem definidas envolvendo os compósitos aos 60 (E2, n:1, 2 e 3) dias. Observar diferença de densidade entre os compósito e tecido ósseo adjacente.



Figura 33. Imagem radiográfica mediolateral do terço proximal de tíbias direitas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTc e PMMA no pós-operatório imediato (setas amarelas) e aos 90 dias (setas brancas). Observe áreas radiopacas (MOMHTc), radioluscentes (PMMA) e circulares radiopacas bem definidas envolvendo os compósitos aos 90 (E3, n:1, 2 e 3) dias. Observar diferença de densidade entre os compósito e tecido ósseo adjacente.

Aos 120 dias notou-se incorporação e osseointegração dos compósitos constituídos de MOMHTc e PMMA ao leito receptor, com aumento da radiopacidade nas interfaces, (Figura 34, E4, n: 1, 2 e 3).



Figura 34. Imagem radiográfica mediolateral do terço proximal de tíbias direitas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTc e PMMA no pós-operatório imediato (setas amarelas) e aos 120 dias (setas brancas). Observe áreas radiopacas (MOMHTc), radioluscentes (PMMA) e circulares radiopacas bem definidas envolvendo os compósitos aos 120 (E4, n:1, 2 e 3) dias. Observar diferença de densidade entre os compósito e tecido ósseo adjacente.

Os eventos radiográficos observados nas tíbias dos coelhos que foram implantados com os compósitos constituídos de MOMHTc e PMMA foram muito semelhantes aos observados nas interfaces entre os compósitos constituídos de MOMHTb e PMMA com os leitos receptores (Figuras 35-38).

No 30° dia de pós-operatório os compósitos constituídos de MOMHTb e PMMA 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 (Figura 35, E1, n: 1, 2 e 3).



Figura 35. Imagem radiográfica mediolateral do terço proximal de tíbias esquerdas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTb e PMMA no pós-operatório imediato (setas amarelas) e aos 30 dias (setas brancas). Observe áreas radiopacas (MOMHTb), radioluscentes (PMMA) e circulares radiopacas bem definidas envolvendo os compósitos aos 30 (E1, n:1, 2 e 3) dias. Observar diferença de densidade entre compósito e tecido ósseo adjacente.

No 60° dia (Figura 36, E2, n: 1, 2 e 3), notou-se aumento da radiopacidade nas interfaces entre os compósitos de MOMHTb e PMMA com os leitos receptores.



Figura 36. Imagem radiográfica mediolateral do terço proximal de tíbias esquerdas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTb e PMMA no pós-operatório imediato (setas amarelas) e aos 60 dias (setas brancas). Observe áreas radiopacas (MOMHTb), radioluscentes (PMMA) e circulares radiopacas bem definidas envolvendo os compósitos aos 60 (E2, n:1, 2 e 3) dias. Observar diferença de densidade entre compósito e tecido ósseo adjacente.

No 90° dia (Figura 37, E3, n: 1, 2 e 3), observou-se aumento da radiopacidade nas interfaces entre os compósitos de MOMHTb e PMMA com os leitos receptores.



Figura 37. Imagem radiográfica mediolateral do terço proximal de tíbias esquerdas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTb e PMMA no pós-operatório imediato (setas amarelas) e aos 90 (setas brancas). Observe áreas radiopacas (MOMHTb), radioluscentes (PMMA) e circulares radiopacas bem definidas envolvendo os compósitos aos 90 (E3, n:1, 2 e 3) dias. Observar diferença de densidade entre compósito e tecido ósseo adjacente.

No 120° dia notou-se incorporação e osseointegração dos compósitos constituídos de MOMHTb e PMMA ao leito receptor, com aumento da radiopacidade nas interfaces (Figura 38, E4, n: 1, 2 e 3).



Figura 38. Imagem radiográfica mediolateral do terço proximal de tíbias esquerdas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTb e PMMA no pós-operatório imediato (setas amarelas) e aos 120 dias (setas brancas). Observar áreas radiopacas (MOMHTb), radioluscentes (PMMA) e circulares radiopacas bem definidas envolvendo os compósitos aos 120 (E4, n:1, 2 e 3) dias. Observar diferença de densidade entre compósito e tecido ósseo adjacente.

6.3 Avaliação macroscópica

Durante a avaliação macroscópica das regiões das tíbias dos coelhos dos grupos E1, E2, E3 e E4, observou-se que os compósitos de MOMHT (c/b) e PMMA permaneceram em seus leitos receptores e sem sinais de reações teciduais (Figuras 39 e 40).



Figura 39. Imagem macroscópica mediolateral do terço proximal de tíbias direitas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTc e PMMA aos 30, 60, 90 e 120 dias (círculos vermelhos). Notar compósitos nos seus respectivos leitos receptores sem sinais de proliferação que caracterizassem reação de corpo estranho e/ou infecção.



Figura 40. Imagem macroscópica mediolateral do terço proximal de tíbias esquerdas de coelhos implantadas com compósitos constituídos por MOMHTb e PMMA aos 30, 60, 90 e 120 dias (círculos vermelhos). Notar compósitos nos seus respectivos leitos receptores sem sinais de proliferação que caracterizassem reação de corpo estranho e/ou infecção.

6.4 Avaliação pela MEV e EDS

Por meio de análise pela MEV, modo composicional, observou-se que dos 12 compósitos (100%) constituídos de MOMHT(c/b) e PMMA implantados em tíbias de coelhos dos grupos E1, E2, E3 e E4 encontravam-se incorporados em seus respectivos leitos receptores, com 100% de osseointegração nos cortes sagitais (8 tíbias/67%) e transversais (4 tíbias implantadas/33%) e 100% de osseocondução nos cortes transversais (8 tíbias implantadas/33%) (Tabela 2). Notou-se também, que o tecido ósseo do leito receptor (cinza claro), a MOMHT(c/b) (cinza claro) e o PMMA (cor preta) mativeram-se preservados.

| Grupos | Sub-grupos | | Incorporação | Osseointegração | Osseocondução |
|----------------|---------------------|-----------------------|--------------|-----------------|---------------|
| | | D – corte sagital | + | + (10 pontos) | - |
| E1 30 dias | n.1 ₍₁₎ | E – corte sagital | + | + (18 pontos) | - |
| | | D – corte sagital | + | + (15 pontos) | - |
| | n.2(2) | E – corte sagital | + | +(12 pontos) | - |
| | | D – corte transversal | + | + (2 pontos) | + |
| | n.3 ₍₃₎ | E – corte transversal | + | + (6 pontos) | + |
| | | D-corte sagital | + | + (10 pontos) | - |
| E2 60 dias | n.1 ₍₄₎ | E – corte sagital | + | +(12 pontos) | - |
| | | D – corte sagital | + | + (6 pontos) | - |
| | n.2(5) | E-corte sagital | + | + (8 pontos) | |
| | | D – corte transversal | + | +(1 ponto) | + |
| | n.3(6) | E – corte transversal | + | + (2 pontos) | + |
| | | D – corte sagital | + | + (15 pontos) | - |
| E3 90 dias | n.1 ₍₇₎ | E – corte sagital | + | + (16 pontos) | - |
| | | D – corte sagital | + | + (16 pontos) | - |
| | n.2 ₍₈₎ | E – corte sagital | + | +(12 pontos) | - |
| | | D – corte transversal | + | + (2 pontos) | + |
| | n.3 ₍₉₎ | E – corte transversal | + | + (4 pontos) | + |
| | | D – corte sagital | + | + (7 pontos) | - |
| E4 120 dias | n.1 ₍₁₀₎ | E – corte sagital | + | +(13 pontos) | - |
| | | D – corte sagital | + | + (8 pontos) | - |
| | n.2 ₍₁₁₎ | E – corte sagital | + | + (10 pontos) | - |
| | | D – corte transversal | + | + (5 pontos) | + |
| | n.3(12) | E – corte transversal | + | + (4 pontos) | + |

Tabela 2. Comportamento dos compósitos constituídos de MOMHT(c/b) e PMMA em leitosreceptores de tíbias de coelhos por meio da MEV.

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

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 leitos receptores, interfaces e MOMHF (c/b).

Aos 30 dias (E1) de pós-operatório, pela MEV, observou-se na interface da amostra do coelho remodelação das bordas dos tecidos ósseos dos leitos receptores, com neoformação óssea/osseointegração e osteocondução da MOMHTc do compósito com o leito receptor (Figura 41, n1-ABC, n2-ABC, n3-ABC). Já pelo mapeamento pela espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS) *"line scan"* da superfície do leito receptor, da interface e do compósito (MOMHTc e PMMA), observou-se que a concentração dos elementos químicos Ca (cálcio) e P (fósforo) mantiveram-se constantes. Na ocasião da análise, pontos de declínio dos elementos químicos foram detectados, devido a presença de forames e/ou fissuras na ocasião da análise (Figura 41, n1-DEF, n2-DEF, n3-DEF).

Aos 60 dias (E2) de pós-operatório, também com uso da MEV, notou-se nas interfaces, que a borda do tecido ósseo cortical do leito receptor apresentava-se remodelada com áreas de tecido ósseo cortical (osteocondução); osseointegração das regiões de contato do leito receptor com a MOMHTc do compósito (Figura 42, n1-ABC, n2-ABC, n3-ABC). Pelo mapeamento por EDS "line scan", do leito receptor integrado com a MOMHTc do compósito, notou-se que os elementos químicos Ca e P mantiveram-se constantes, sendo observado um declínio na região da fissura, com restabelecimento (Figura 42, n1-DEF, n2-DEF, n3-DEF).

Aos 90 dias (E3) de pós-operatório, observou-se nas interfaces que as bordas dos tecidos ósseos cortical dos leitos receptores apresentavam-se remodeladas com áreas de osseointegração da MOMHTc do compósito com o leito receptor (Figura 43, n1-ABC, n2-ABC, n3-ABC). Com uso do EDS "line scan" do leito receptor e da MOMHTc do compósito, notouse que os elementos químicos Ca e P mantiveram-se constantes, porém alguns pontos de declínios como nas amostras dos grupos E1 e E2 foram observados (Figura 43, n1-DEF, n2-DEF, n3-DEF).

Aos 120 dias (E4) de pós-operatório, também foi observado nas interfaces de todas amostras, remodelação das bordas dos leitos receptores com presença de áreas de osteointegração com a MOMHTc do compósito (Figura 44, n1-ABC, n2-ABC, n3-ABC). Já pelo mapeamento por meio do EDS "line scan", partindo do leito receptor em direção a MOMHTc, observou-se que os elementos químicos Ca e P mantiveram-se constantes durante a análise (Figura 44, n1-DEF, n2-DEF, n3-DEF).



Figura 41. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTc e PMMA) 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-ABC). Observe: tecido ósseo do leito receptor e da MOMHTc (cinza claro-asterísco amarelo), osseointegração (asterisco vermelho) e PMMA (cinza escuro). 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 vermelho) e MOMHTc. Observar que as concentrações dos elementos químicos Ca e P (n1-DEF, n2-DEF e n3-DEF) mantiveram-se constantes, com pontos de declínio dos elementos químicos Ca e P.



Figura 42. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTc e PMMA) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E2 (60 dias) obtidas de corte sagital (n1-ABC e n2-ABC) e corte transversal (n3-ABC). Observe: tecido ósseo do leito receptor e da MOMHTc (cinza claro-asterísco amarelo), osseointegração (asterisco vermelho) e PMMA (cinza escuro). 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 vermelho) e MOMHTc. Observar que as concentrações dos elementos químicos Ca e P (n1-DEF, n2-DEF e n3-DEF) mantiveram-se constantes, com pontos de declínio dos elementos químicos Ca e P.



Figura 43. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTc e PMMA) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E3 (90 dias) obtidas de corte sagital (n1-ABC e n2-ABC) e corte transversal (n3-ABC). Observe: tecido ósseo do leito receptor e da MOMHTc (cinza claro-asterísco amarelo), osseointegração (asterisco vermelho) e PMMA (cinza escuro). 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 vermelho) e MOMHTc. Observar que as concentrações dos elementos químicos Ca e P (n1-DEF, n2-DEF e n3-DEF) mantiveram-se constantes, com pontos de declínio dos elementos químicos Ca e P.



Figura 44. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTc e PMMA) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E4 (120 dias) obtidas de corte sagital (n1-ABC e n2-ABC) e corte transversal (n3-ABC). Observe: tecido ósseo do leito receptor e da MOMHTc (cinza claro-asterísco amarelo), osseointegração (asterisco vermelho) e PMMA (cinza escuro). 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 vermelho) e MOMHTc. Observar que as concentrações dos elementos químicos Ca e P (n1-DEF, n2-DEF) mantiveram-se constantes, com pontos de declínio dos elementos químicos Ca e P.

Os eventos observados nas tíbias dos coelhos implantadas com os compósitos constituídos de MOMHTb e PMMA pela MEV e EDS foram bastantes semelhantes aos observados nas tíbias implantadas com compósitos constituídos de MOMHTc e PMMA.

No 30° dia (E1) de pós-operatório, pela MEV, notou-se nas interfaces das amostras dos coelhos remodelação das bordas dos tecidos ósseos dos leitos receptores, com neoformação óssea/osseointegração e osteocondução da MOMHTb do compósito com o leito receptor (Figura 45, n1-ABC, n2-ABC, n3-ABC). Já pelo mapeamento pela espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS) *"line scan"* da superfície do leito receptor, da interface e do compósito (MOMHTc e PMMA), notou-se que a concentração dos elementos químicos Ca (cálcio) e P (fósforo) se mantiveram constantes, com pontos de declínios (Figura 45, n1-DEF, n2-DEF, n3-DEF).

No 60° dia (E2) de pós-operatório, notou-se por meio da avaliação da MEV que a borda do tecido ósseo cortical do leito receptor apresentava-se remodelada e presentes áreas de tecido ósseo cortical (osteocondução) e osseointegração das regiões de contato do leito receptor com a MOMHTb do compósito (Figura 46, n1-ABC, n2-ABC, n3-ABC). Já pela EDS "line scan", do leito receptor integrado com a MOMHTb do compósito, observou-se que as concentrações dos elementos químicos Ca e P apresentavam-se constantes, com pontos de declínios (Figura 46, n1-DEF, n2-DEF, n3-DEF).

No 90° dia (E3) de pós-operatório, notou-se nas interfaces que as bordas dos tecidos ósseos corticais dos leitos receptores apresentavam-se remodeladas com áreas de osseointegração da MOMHTb do compósito com o leito receptor (Figura 47, n1-ABC, n2-ABC, n3-ABC). Análise de EDS "line scan" partindo do leito receptor, área de integração e MOMHTb do compósito, observou-se que os elementos químicos Ca e P mantiveram-se constantes, porém alguns pontos de declínios também foram observados (Figura 47, n1-DEF, n2-DEF, n3-DEF).

No 120° dia (E4) de pós-operatório, também foi observado nas interfaces de todas amostras, remodelação das bordas dos leitos receptores com presença de áreas de osteointegração com a MOMHTb do compósito (Figura 48, n1-ABC, n2-ABC, n3-ABC). Pela análise por meio do EDS "line scan", partindo do leito receptor em direção a MOMHTb, observou-se que os elementos químicos Ca e P mantiveram-se constantes durante a análise (Figura 48, n1-DEF, n2-DEF, n3-DEF).



Figura 45. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTc e PMMA) 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-ABC). Observe: tecido ósseo do leito receptor e da MOMHTc (cinza claro-asterísco amarelo), osseointegração (asterisco vermelho) e PMMA (cinza escuro). 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 vermelho) e MOMHTc. Observar que as concentrações dos elementos químicos Ca e P (n1-DEF, n2-DEF e n3-DEF) mantiveram-se constantes, com pontos de declínio dos elementos químicos Ca e P.



Figura 46. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTb e PMMA) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E2 (60 dias) obtidas de corte sagital (n1-ABC e n2-ABC) e corte transversal (n3-ABC). Observe: tecido ósseo do leito receptor e da MOMHTb (cinza claro-asterísco amarelo), osseointegração (asterisco vermelho) e PMMA (cinza escuro). 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 vermelho) e MOMHTb. Observar que as concentrações dos elementos químicos Ca e P (n1-DEF, n2-DEF e n3-DEF) mantiveram-se constantes, com pontos de declínio dos elementos químicos Ca e P.

E3 (90 dias) n1 <u>n2</u> ećg n3 怡

Figura 47. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTb e PMMA) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E3 (90 dias) obtidas de corte sagital (n1-ABC e n2-ABC) e corte transversal (n3-ABC). Observar: tecido ósseo do leito receptor e da MOMHTb (cinza claro-asterísco amarelo), osseointegração (asterisco vermelho) e PMMA (cinza escuro). Análise pela espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS), *line scan* (linha azul) dos elementos químicos Ca e P do leito receptor, osseointegração (asterisco vermelho) e MOMHTb. Notar que as concentrações dos elementos químicos Ca e P (n1-DEF, n2-DEF e n3-DEF) mantiveram-se constantes, com pontos de declínio dos elementos químicos Ca e P.



Figura 48. Eletromicrografias obtidas de análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos compósitos (MOMHTb e PMMA) em leitos receptores de tíbias de coelhos do grupo E4 (120 dias) obtidas de corte sagital (n1-ABC e n2-ABC) e corte transversal (n3-ABC). Observe: tecido ósseo do leito receptor e da MOMHTb (cinza claro-asterísco amarelo), osseointegração (asterisco vermelho) e PMMA (cinza escuro). 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 vermelho) e MOMHTb. Observar que as concentrações dos elementos químicos Ca e P (n1-DEF, n2-DEF) mantiveram-se constantes, com pontos de declínio dos elementos químicos Ca e P.

7. DISCUSSÃO

Caso fosse utilizado a metodologia por contato direto, não seria possível obter resultados tão fidedignos, pois as amostras não estariam em perfeito contato com as células, o que poderia haver alteração nos dados apresentados. Baseando-se nessa teoria e 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, respeitando as normas estabelecidas pela ISO 109930-5 (ROGERO et al. 2003). O ensaio colorimétrico, com o uso de MTT foi escolhido devido ao fato de que a produção de coloração azul (violeta), no teste, demonstra que a cadeia respiratória da célula se mantém preservada, ou seja, permite avaliar a viabilidade celular, corroborando com os estudos de Mosmann (1983).

Correlacionando as amostras do grupo CT com as diluições caninas (C4, C3, C2 e C1), não foi possível observar diferença significativa, porém, o efeito mais citotóxico foi observado na amostra C1, a qual apresentava-se na diluição 100%, ou seja, a solução mais pura dentre as demais, por isso explica-se que no gráfico apresenta-se como a amostra dentre os compósitos caninos, com menor viabilidade celular. Já comparando o CT com as diluições obtidas das MOMHTb e PMMA, notou-se os mesmos eventos observados nas diluições obtidas das MOMHTc e PMMA, porém de forma mais agressiva, sendo a maior citotoxicidade observada na diluição B1, que apresentou viabilidade celular em torno de 35%, de acordo com a ISO 109930- 5.

De acordo com os resultados obtidos pelo teste de citotoxicidade, observou-se que tanto o compósito de origem canina (MOMHTc) quanto o de bovina (MOMHTb) apresentaram potencial citotóxico, sendo este maior no de bovino. Logo, para aplicação em um sistema biológico, como no estudo onde foi utilizado para preencher falhas ósseas, o compósito de origem canina (MOMHTc) seria o mais recomendado.

O glicerol a 98% em temperatura ambiente, de acordo com nossos resultados, continua sendo excelente meio de preservação de material biológico, podendo ser empregado para conservação de tecidos ósseos, além de apresentar vantagens de baixo custo, fácil aquisição e manuseio (SILVA et al., 2003; FREITAS et al., 2014). Sendo assim, a implantação de um banco de tecido ósseo em centros cirúrgicos veterinários, para aplicação em procedimentos cirúrgicos ortopédicos seria possível utilizando o glicerol 98%, já que os tecidos ósseos liofilizados e crio

preservados, além de onerosos, não fazem parte do arsenal ortopédico na medicina veterinária (FREITAS et al., 2012; MOREIRA et al. 2014).

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, afim de prevenir contaminação dos leitos receptores por possíveis patógenos.

A manipulação das MOMHT(c/b) em cabine de segurança, seguido do processo de esterilização dos compósitos em autoclave, foram fundamentais, pois preveniram infecção que poderiam causar osteólise local e, consequentemente, instabilidade e/ou migração do biomaterial do leito receptor, corroborando com os estudos de Vilela et al. (2010) e Moreira et al. (2014).

A região proximal medial da tíbia de coelhos foi definida para albergar 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 exequível (PIERMATTEI e GREELEY, 1988; REZENDE et al., 1998; FREITAS et al., 2013). Além disso, essa região também é sede de reabsorção e de propriedades osteogênicas, sendo, inclusive, metabolicamente, a mais ativa desse osso. Essas características são almejadas e favorecem uma resposta celular mais eficiente entre os compósitos em estudo e o sítio receptor (SUOMINEN et al., 1995; REZENDE et al., 1998; TURRER e FERREIRA., 2008).

No pós-operatório imediato, todos os animais apoiaram os membros operados, mostrando que a estrutura da tíbia não foi comprometida pela confecção da falha óssea, corroborando com os mesmos resultados encontrados por Melo et al. (1998) e Freitas et al. (2014). Todos os animais tiveram as feridas cirúrgicas seladas dentro de um período de 10 dias, com ausência de infecção e/ou reação tecidual local que caracterizasse rejeição dos compósitos ao leito receptor, demostrando que a técnica asséptica, a antibioticoterapia e o manejo das feridas foram adequados (IAMAGUTI et al., 1995; COSTA, 1996).

O PMMA por ser biocompatível e biotolerável é um biomaterial sintético largamente utilizado em procedimentos ortopédicos para corrigir defeitos ósseos (RAPOSO-DO-AMARAL et al. 2010, MOREIRA et al. 2014; CATELLO et al. 2017), que pode ser utilizado associado à outros biomateriais (KUHL et al, 2017), para agregar propriedades individuais desejáveis e superiores quando comparado aos biomateriais isolados, aumentando a rigidez de um biomaterial, como neste estudo.

As reações entre os compósitos e o sítio 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 Freitas et al. (2013) e Kuhl et al (2017) são fatores fundamentais para ocorrer incorporação e/ou integração dos compósitos aos leitos receptores.

Os resultados promissores quanto ao uso dos compósitos na reparação de falhas ósseas podem ser esperados já que, em todos os animais estudados, permaneceram no leito receptor, que para Silva, et al. (2003), Gutierres et al. (2006) e Moreira et al. (2008) é um evento indicativo de ausência de rejeição, que pode estar relacionado com fibrointegração, mediada pelo polimetilmetacrilato, e pela osseointegração, promovida pela MOMHT, e também pela osteocondução, caracterizada pela neoformação vascular e invasão tissular de fibroblastos com deposição gradativa de tecido fibrocartilaginoso e de ósseo, o que caracteriza a sua integração.

O emprego da técnica radiológica digital neste estudo foi decisivo, pois permitiu acompanhar com exatidão o comportamento dos compósitos nos leitos receptores de tíbias de coelhos, demostrando ser um recurso seguro e eficiente para avaliar biomateriais em defeitos ósseos em tempos distintos (SILVA et al., 2003; FREITAS et al., 2013; MOREIRA et al., 2014; KUHL et al., 2017).

As diferenças de densidades observadas pelas imagens radiográficas digitais dos compósitos, demonstrados por áreas radiolucentes, correspondentes ao PMMA, e áreas radiopacas, referentes à MOMHT(c/b), permaneceram desde sua implantação até aos 120 dias (Figuras 32-40), com variações discretas. Como um dos componentes dos compósitos em estudo é o PMMA, as atividades celulares que atuam na absorção, incorporação e remodelação ósseo, não irão promover mudanças significativas na estrutura do biomaterial (GUTIERRES et al., 2006, TURRER e FERREIRA, 2008; FREITAS et al., 2014; CATELLO et al., 2017).

Provavelmente a osseointegração esteja relacionada com a neoformação vascular e invasão tissular de fibroblastos seguida por deposição de tecido fibrocartilaginoso e ósseo novo, caracterizando a osseocondução do compósito (GUTIERRES et al., 2006; TURRER et al., 2008, FREITAS et al. 2014; MOREIRA et al., 2014, COSTA et al., 2015).

À avaliação macroscópica, pós-eutanásia dos coelhos dos grupos E1, E2, E3 e E4, observou-se que as regiões das tíbias onde foram implantadas com os compósitos de MOMHT (c/b) e PMMA não apresentavam sinais de proliferação que caracterizassem reação de corpo estranho e/ou infecção, demonstrando que os biomateriais mesmo apresentando leve grau de citotoxicidade demonstrado nos ensaios, foram incorporados aos leitos receptores (Figuras 41 e 42). Além disso, espera-se também que o biomaterial seja osseointegrado ao leito receptor para que, em etapas seguintes, possa ser aplicado em procedimentos cirúrgicos ortopédicos reparadores (MOREIRA et al. 2014; COSTA et al. 2015; KUHL et al. 2017).

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 imperativos e estão sendo realizados (LEGEROS e CRAIG, 1993; MOREIRA et al. 2014; FREITAS et al. 2014). 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 (LEGEROS e CRAIG, 1993; KANG et al. 2015).

Por meio de técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a interface entre biomaterial e leito receptor terá suas estruturas analisadas em alta resolução, uma vez que análises histológicas e histomorfométricas convencional não são métodos adequado para se observar a adaptação, propriedades mecânica e tecido com diferentes tipos de 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 isso, foi possível estabelecer não só o limite entre o contato físico do compósito com o leito receptor, mas também análise da superfície de seus componentes, demonstrando que a MEV poderá ser um método valioso para estudo das estruturas presentes na interface entre o compósito e o leito receptor de tíbias de coelhos.

Controle Negativo correlacionado com as diluições caninas, não demonstrou diferença significativa, o efeito mais citotóxico foi observado na amostra C1, a qual apresentava-se na diluição 100%, como dito anteriormento. Assim, explica-se que no gráfico apresenta-se como a amostra dentre os compósitos caninos, com menor viabilidade celular. Já em comparação do controle negativo com os modelos bovinos, pode-se dizer que ocorre o mesmo, porém de forma mais expressiva e ainda mais intensamente na diluição B1, o qual apresentou-se apenas com, aproximadamente, 36% da viabilidade celular.

Foi observado aumento de radiopacidade gradativo, nos exames radiológicos, desde os 30 até os 120 dias, provavelmente devido a osteocondução e formação óssea nessas regiões.

Pesquisas realizadas por Weinfeld et al. (1999), Gutierres et al. (2006) e Freitas et al. (2014), utilizando biomateriais biológicos, demostraram que o heteroimplante ósseo cortical conservado, ou seja, preservado, em glicerina a 98% podem ser utilizados na reparação de falha óssea. Somando-se a esses, Raposo-Do-Amaral et al. (2010) e Moreira et al. (2014), divulgaram em seus estudos que os biomateriais sintéticos, como o PMMA, também são opções que podem ser empregados com sucesso na correção de defeitos ósseos. Já Turrer e Ferreira (2008) preconizam que a associação de dois ou mais materiais de classes diferentes, denominado compósito, confere melhor performance, pois há adição das propriedades individuais desejáveis de cada um, tornando-o mais biocompatíveis, com menor possibilidade de falha e com propriedades superiores às dos componentes isolados.

Os pontos de declínios observados nos gráficos obtidos na ocasião do mapeamento pela espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS - *line scan*) dos elementos químicos Ca e P iniciando no leito receptor, região de osseointegração e MOMHTc/b provavelmente ocorreram devido a presença de forames ou fissuras na ocasião da análise.

8. CONCLUSÕES

Todos os compósitos constituídos de MOMHT(c/b) e PMMA apresentaram potencial citotóxico, sendo este maior no de bovino. Logo, neste estudo, o compósito de origem canina é o mais indicado para uso clínico.

Houve incorporação e osseointegração, em relação ao tempo, dos compósitos de MOMHT(c/b) e PMMA aos leitos receptores em 100% dos casos, demostrando ser biologicamente biocompatíveis, pois promoveram a reparação de falhas ósseas, sem sinais de infecção, migração e/ou rejeição, podendo, dessa forma, ser mais uma opção como substitutos para preencher grandes defeitos ósseos.

9. BIBLIOGRAFIA

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

ALEXANDER, J.W. Bone grafting. Veterinary Clinincs 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.

AMATUZZI, M. M.; CROCI, A. T.; GIOVANI, Q. M. M.; SANTOS, L. A. U. Banco de tecidos: estruturação e normatização. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 35, n. 5, p. 165-172, 2000

ANDERSON J.M. Biological responses to materials. **Annual Review of Materials Research**, v.31, p.81-110, 2001.

ARONSON, J.; CORNELL C.N. Bone healing and grafting. Beaty J.H. Orthopaedic Knowledge Update. **American Academy of Orthopaedic Surgeons**, p.2535, 1999.

BAUER, T.W.; MUSCHLER, G.F. Bone Graft Materials. Clinical Orthopaedics e Related Research, v.37, p.10-27, 2000.

BIAGINI, S; MELENDE, S., WENDEL, R. F.; WENDEL, S.; RUDELLI, A. S., AMATUZZI, M.. Padronização da rotina operacional em banco de ossos realizada por um serviço hemoterápico: proposta de elaboração de normas**. Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 34, n.6, p. 381-384, 1999

BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomaterials: Types, Applications, and Market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

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.

CAMACHO, D. P. SVIDZINSKI, T. I. E.; FURLANETO, M. C.; CORRÊA, G. D. O. Acrylic resins for dental use based on polymethylmethacrylate. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 6, n.3, p. 63-72, 2014.

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.

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

CHARLES, A.H.; EDWARD, M.P. Plastics Materials and Processes. **Concise Encyclopedia**; Wiley, p. 42–44, 2003.

CONSTANTINEUSCU, G. M. Clinical Anatomy for Small Animal Practitioners. Iowa: Blackwell Publishing, v.1, p.381,2002.

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.

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

DAVIES J.E. Histodynamics and endosseous wound healing. Davies J.E. **Bone Engineering**. EM2, Canada, p.1-11, 2000.

DEL VALLE, R. A.; CARVALHO, M.L.; GONZALEZ, M.R. Estudo do comportamento de enxerto ósseo com material doador obtido dos bancos de tecidos músculo - esqueléticos. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 18, n. 2, p. 189-194, 2006.

DENNIS, R.; KIRBERGER, R. M.; BARR, F.; WRIGLEY R. H. Handbook of small animal radiology and ultrasound. St. Louis: Elsevier. v.2, p-370. 2010.

DENNY, H. Fracture fixation in small animal practice. In practice, v.13, p.137-143, 1991.

EGBO, M. K. A fundamental review on composite materials and some of their applications in biomedical engineering. Journal of King Saud University. **Engineering Sciences**. 2020.

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.

FEOFILOFF, E. T.; JESUS-GARCIA, R. Técnicas de obtenção, processamento, armazenamento e utilização de homoenxertos ósseos. **Revista Brasileira de Ortopedia** v. 31, n. 11, p.895-903, 1996

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

FERREIRA, A. B. H. Novo Aurélio século XXI: o dicionário da língua portuguesa. Rio de janeiro: Nova fronteira. v.3 p.2128. 1999

FLEMING JR J.E., CORNELL C. N., MUSCHLER G. F. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. **Orthopedic Clinics of North America**, v.31, p.357-374, 2000.

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.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 Cirurgica Brasileira, v.29, n.12, p.794-800, 2014.

FRIEDLAENDER, G.E. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.69, n.5, p.786-790. Jun. 1987.

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. - Atlas de Histologia, Guanabara Koogan, 1999.

GOMES, L. S. M. Biomateriais em artroplastia de quadril: Propriedades, estrutura e composição. **O Quadril.** São Paulo: Atheneu, p. 121-143, 2010.

GORER, P. A., LOUTIT, J. F. MICKLEM, H. S. Proposed Revisions of 'Transplantese'. Nature, v.187, p.1024, 1961.

GUO, C.; ZHOU, L.; LV J. Effects of expandable graphite and modified ammonium polyphosphate on the flame-retardant and mechanical properties of wood flourpolypropylene composites. **Polymers and Polymer Composites**, v. 21, n. 7, p. 449–456, 2013.

GUTIERRES M.; LOPES M.A.; HUSSAIN N.S.; CABRAL A.T.; ALMEIDA L.; SANTOS J.D. Substitutos ósseos: Conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de Medicina**, v.19, p.153-162, 2006.

HENRI, L. Thermohygroelastic Properties of Polymethylmethacrylate. Netherlands. p.11–13, 2007

ISOLA, J. G. M. P.; MORAES, P. C. Estrutura e regeneração óssea – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.18, p.1679-7353, 2012.

JOHNSON, A. L. Fundamentals of orthopedic surgery and fracture management. In: **FOSSUM, T.W. Small Animal Surgery**, St. Louis: Mosby, v.3, p.930-1014. 2007.

JUNIOR, D. C. G.; ORIÁ, A. P.; VIEIRA, J. V. R.; BARBOSA, S. F.; ESTRELA-LIMA, A., NETO, F. A. D. Using allogenic cortical graft preserved in glycerin as spacer in the advancement of tibial tuberosity in 34 dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v.38 n.12, p.2246-2253. 2018.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogans, S.A. v.10, 2004.

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.

KEALY, J. K.; MCALLISTER, H.; GRAHAM, J. P. Bones and Joints. Diagnostic radiology and ultrasonography of the dog and cat, St. Louis: Saunders, v.5, p.351-446. 2011.

KUHL, G.S.; RIGO, E.C.S.; VERCIK, 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 tíbia de coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.12, p.1491-1498, 2017.

LANE, J.M.; SANDHU, H.S. Current approaches to experimental bone grafting. **Orthopedic Clinics North America**. v.18, p.213-225, 1987.

LINCOLN, J. D. Treatment of open, delayed union, and nonunion fractures with external skeletal fixation. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.22, n.1, p.195-207, 1992.

MAES C., KOBAYASHI T., SELIG M. K., TORREKENS S., ROTH S. I., MACKEM S., CARMELIET G., KRONENBERG H. M. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. **Developmental Cell**. v.19, p.329–344, 2010.

MALCOM, P.S. **Polymer Chemistry: An Introduction.** Oxford University Press: NY.,v.3 p.167–176, 256–276, 1990.

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 tíbia de cão. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e. Zootecnia, v.50, n.4, p.385-394, 1998.

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.

MISCH, C. E.; DIETSH, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dentistry.** v.2, n.3, p.158-167, 1993.

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 tíbia de coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.2, p.173-78, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.6, n.1-2, p.55-63, 1983.

OWENS, J. M. **Radiographic interpretation for the small animal clinician**, Ralston: Purina Co edition, p-207. 1982.

PIERMATTEI, D.; FLO, G.; DECAMP, C. Brinker, Piermattei and Flo's handbook of small animal orthopedics and fracture repair, St. Louis: Elsevier, v.4, p.818, 2006.

RAHAL, S.C.; BERGAMO, F.M.M.; ISHIY, H.M. Prótese intra-ocular de resina acrílica em cães e gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.52, n.4, p.319-324, 2000.

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.

RAPOSO-DO-AMARAL, C.A.A.; RAPOSO-DO-AMARAL, C.E.; ROLAND, F.G.; SILVA, J.V.L.; PASCHOAL, G.H.L.; SILVA, A.M. Implantes pré-fabricados customizados nas grandes perdas ósseas do esqueleto craniofacial. **Revista Brasileira de Cirurgia Craniomaxilofacial**, v.3, p.175-179, 2010.

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.

ROBERT, R.; KOWALSKI, E. L.; GOMES, D. de M. Corrente de absorção e reabsorção em dielétricos. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v.30, n. 3, p.3307, 2008.

ROE, S. C.; PIJANOWSKI, G. J.; JOHNSON, A. L. Biomechanical properties of canine cortical bone allografts: effects of preparation and storage. **American Journal of Veterinary**

Research. v.49, n.6, p. 873-877, 1988.

RONDINELLI, P. C.; CABRAL, F. P.; FREITAS, E. H.; PENEDO, J. L., LEITE, J. E. R.; SILVEIRA, L. C. Rotina do banco de ossos do hospital de traumato-ortopedia (HTO-RJ). **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 29, n. 6, p. 385-389, 1994

ROOS, M. V.; CAMISA JR., A.; MICHELIN, A. F. Procedimentos de um banco de ossos e a aplicabilidade dos enxertos por ele proporcionados. **Acta Ortopédica Brasileira**. 'v.8, n.3, p.122-127, 2000.

ROUSH, J. K. Management of fractures in small animals. **Veterinary Clinics of Small Animal Practice**, v. 35, p. 1137-1154, 2005.

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, L. A. DOS. Cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras. v.1, 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.

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

SISSON, S.; GROSSMAN, J. M. Anatomia dos Animais Domésticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. v.1, n.5, 1986.

SOUZA, A.C.R.; TEDESCO, B.A.N.; LOURENÇÃO, P.L.T.A; TERRA, S.A.; ARAÚJO, C.R.P.; SPADELLA, C.T.; ORTOLAN, E.V.P. Ultrastructural analysis of bone formation around dental implants in nondiabetic rats, severe diabetics not controlled and controlled with insulin. Acta Cirúrgica Brasileira, v.35, n.11, 2020: e351101.doi.org/10.1590/acb351101

SOUZA, T. H. S. Projeto conceitual de implante bioativo com gradiente de estrutura funcional em poli (metacrilato de metila) e hidroxiapatita. Análises in vivo e in vitro. 2009.

STEVENSON, S. Biology of bone grafts. **Orthopedic Clinics of North America**., v.30, p.543-552, 1999.

STEVENSON, S. Enxertamento ósseo. In: BOJRAB, M. J. Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais. São Paulo: Roca. v.3, p. 786-793.1996.

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

SUMNER-SMITH G. Bone plating for radial fractures in small dogs. **Modern Veterinary Practice.** v.3, p.30-33, 1970.

THOMSON, L.A.; LAW, F.C.; JAMES, K.H.; MATTHEW, C.A.; RUSHTON, N. "Biocompatibility of particulate poly (methyl methacrylate) bone cements: A comparative study in vitro and in vivo", **Biomaterials**, v.13, n.12, p.811-818, 1992

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.

VAN KREVELEN, D.W.; NIJENHUIS, K.T. **Properties of Polymers**; Elsevier: Amsterdam, p. 106, 322; 2000.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G.J.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods Molecular Biology**, v.731, p.237-245, 2011.

VASTEL, L.; MEUNIER, A.; SINEY, H.; SEDEL, L.; COURPIED J-P.. Effect of different sterilization processing methods on the mechanical properties of human cancellous bone allografts. **Biomaterials.**, v. 25, p. 2105–2110, 2004.

VOLPON, J. B. A marcação do osso com substâncias fluorescentes. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.20, n.5, p.207-210, 1985.

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.

WONG, M.; EULENBERGER, J.; SCHENK, R.; HUNZIKER, E. Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. Journal of Biomedical Materials Research, v.29, n.12, p.1567-75, 1995.

YACUBIAN-FERNANDES, A.; LARONG, P.R.; COELHO, R.A.; DUCATI, L.G.; SILVA, M.V. Prototipagem como forma alternativa para realização de cranioplastia com metilmetacrilato: nota técnica. **Arquivo de Neuropatologia e Psiquiatria**, v.62, p.865-868, 2004.

ZILIOTTO, L. DALECK, C. R.; FILHO, J. G. P.; SOUZA, A. P.; FANTINATTI, A. P.; DINIZ, P. P. V. P. Utilização de implante ósseo cortical alógeno conservado em glicerina para preservação de membro torácico: estudo experimental em cães. Acta Cirurgia Brasileira, v.18, n.2, p.107-115, 2003.