

OMAR LEONARDO ARISTIZABAL PAEZ.

**BIOCERÂMICA DE FOSFATOS DE CÁLCIO NANO-ESTRUTURADO MICRO-
MACRO POROSA EM GRÂNULOS EM DEFEITO CRÍTICO EM RÁDIO DE
COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*).**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em ciência animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia
Orientadora: Prof^a Cleuza Maria de Faria
Rezende.

BELO HORIZONTE

ESCOLA DE VETERINARIA DA UFMG

2013

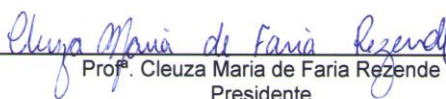
Aristizabal Paez, Omar Leonardo, 1978-
A715b Biocerâmica de fosfatos de cálcio nano-estruturado micro macro porosa em grânulos em defeito crítico em rádio de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) / Omar Leonardo Aristizabal Paez. – 2013.
54 p. : il.

Orientador: Cleuza Maria de Faria Rezende
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Coelho – Cirurgia – Teses. 2. Materiais biomédicos – Teses. 3. Ossos – Regeneração – Teses. 4. Fosfato de cálcio – Teses. 5. Ortopedia veterinária – Teses. I. Rezende, Cleuza Maria de Faria. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
III. Título.

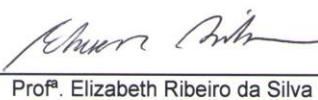
CDD – 636.089 79

Tese defendida e aprovada em 10 de maio de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof.^a. Cleuza Maria de Faria Rezende
Presidente


Prof.^a. Marlene Isabel Vargas Vitoria


Prof. Mario Jefferson Quirino Louzada


Prof.^a. Elizabeth Ribeiro da Silva


Prof.^a. Eliane Gonçalves de Melo

AGRADECIMENTOS.

À UNIVERSIDADE DO TOLIMA, pela oportunidade e o apoio.

A CAPES, pela bolsa de estudo.

A COLFUTURO pelo apoio.

A meus pais e irmã, pelo apoio, compreensão e carinho mesmo na distancia, estavam junto de mi.

À Professora. Cleuza, pela sua orientação, ensinamentos, paciência e ajuda.

Aos Professores Anilton e Renato, pela ajuda e co-orientação durante o meu doutorado.

Ao Laboratório EINCO Biomaterial Ltda. Pelo apoio e fornecimento das biocerâmicas e demais materiais por eles fornecidos, assim como o apoio econômico para a realização do experimento.

Aos meus colegas de pós-graduação: Endrigo, Fabiola, Isabel, Felipe, Jessica, Raul. Por ser parte da ótima equipe cirúrgica e anestésica, o que permitiu a correta, rápida e boa execução de todas e cada uma das cirurgias. Ao aluno de iniciação científica o Bruno, pelo apoio e ajuda durante todo o experimento.

Ao Centro de microscopia eletrônica em cabeça da Professora Elizabeth, pela colaboração nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao laboratório de Biofísica da UNESP Araçatuba em cabeça do Professor Mario Jefferson, pelo apoio e ajuda nas avaliações densitométricas.

Ao Laboratório de Histopatologia da escola de veterinária da UFV em cabeça da professora Marlene, por todo o apoio, ajuda e colaboração no processamento e análises histológicos das amostras.

Aos Professores Joaquim Patarroyo e Marlene Vargas, pela amizade, apoio, carinho, conselhos e demais durante toda a minha estadia no Brasil, já são quase 10 anos de compartilhar muitas situações “MEUS PAIS NO BRASIL”. Muito obrigado!!!!

A todo o pessoal de escola de veterinária da UFMG, por toda a ajuda, colaboração, apoio em todos os momentos, bons e não tão bons.

A todos os meus amigos colombianos, Jéssica, Irma, Raul, Ramon, Natalia, Ana Maria, Sebastian. Pela amizade e momentos de descontração lembrando a nossa Colômbia.

A Jessica por toda tua paciência, ajuda, conselhos, carinho, sem teu apoio este trabalho não teria sido possível.

A todos os que de uma ou outra maneira me ajudaram durante estes 4 anos um **MUITO OBRIGADO!!!**

VIVA COLOMBIA!!!

SUMÁRIO.

LISTA DE ABREVIACÕES	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE GRÁFICOS	13
RESUMO	14
SUMARY	15
1 – INTRODUÇÃO	16
2 - REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 – Tecido ósseo	17
2.2 - Enxertos ósseos	22
2.3 – Biocerâmicas	23
2.4 – Estudo radiográfico	28
2.5 - Densitometria óssea	28
3. OBJETIVOS	28
3.1- Objetivo geral	28
3.2 - Objetivos específicos	28
4. HIPÓTESES	28
5. MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1 – Animais	29
5.2 – Biocerâmicas	29
5.3 - Caracterização das biocerâmicas por microscopia eletrônica de varredura	29
5.4 - Implantação das biocerâmicas	29
5.5 - Avaliação radiográfica	30
5.6 - Densitometria óssea	32
5.7 - Microscopia eletrônica do osso	33
5.8 - Análises histológicas	34
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÕES	50
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	50
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE ABREVIACÕES.

α -TCP:	Alfa tri-cálcio fosfato.
β -TCP:	Beta-tri cálcio fosfato.
BCO:	Fosfato de cálcio bifásico.
BMP's:	Proteína morfogenética óssea.
CETEA:	Comitê de experimentação animal.
CO ₃ :	Carbonatos.
CGAL:	Cerâmica em grânulos de absorção lenta.
CGAM:	Cerâmica em grânulos de absorção média.
CMO:	Conteúdo mineral ósseo.
CM-UFGM:	Centro de microscopia da universidade federal de minas gerais.
DBM's:	Matriz óssea desmineralizadas.
DMO:	Densidade mineral óssea.
DXA:	Densitômetro de dupla emissão de raios- X.
EBSD:	Difração de elétrons retroespalhados.
EDS:	Espectometro de raios -X de energia dispersa.
FCO:	Formação de calo ósseo.
FPO:	Formação de ponte óssea.
HÁ:	Hidroxiapatita.
HÁ- β TCP:	Hidroxiapatita beta trifosfato de calcio.
MEV:	Microscopia eletrônica de varredura.
Mg:	Magnésio.
Na:	Sódio.
PVPI:	Iodopolivinilpirrolidona.
RO:	Remodelação óssea.
RP:	Reação periosteal.
UNESP:	Universidade estadual paulista "Júlio de mesquita filho".

UFMG: Universidade federal de minas gerais.

UFV: Universidade federal de viçosa.

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1	Representação gráfica da estrutura microscópica do osso cortical. (a) esquema 3D do osso cortical, (b) corte do sistema de Havers, (c) fotomicrografia de um sistema de Havers. (Fonte: Doblare <i>et al.</i> , 2004)	18
Figura 2	Esquema do suprimento sanguíneo em um osso longo maduro. (Fonte: Denny e Butterworth, 2000).....	19
Figura 3	Ilustração esquemática da consolidação óssea secundária. (a) formação do hematoma no local da fratura. (b) substituição do hematoma pelo calo ósseo. (c) processo de remodelação óssea. (Fonte: Denny e Butterworth, 2000).....	20
Figura 4	Esquema da ossificação primária presente nas fixações rígidas (Fonte: Kaderly, 1991)	21
Figura 5	Representação gráfica da consolidação óssea secundária. Calo ósseo após nove dias da fratura mostrando osso maduro sob o periosteio (ossificação intramembranosa) e abundância de tecido cartilaginoso adjacente à fratura (condrogênese) (Fonte: Doblare <i>et al.</i> , 2004)	22
Figura 6	Representação fotográfica dos momentos cirúrgicos. (A) exposição do rádio, (B) mensuração do comprimento do defeito crítico, (C) defeito crítico, (D) mini placa óssea posicionada e implantada, (E) implantação da biocerâmica e (F) material já posicionado no defeito sob a mini placa óssea.....	31
Figura 7	Densitômetro de dupla emissão de raios X (DXA) modelo DPX-ALPHA LUNAR.....	32
Figura 8	(A) Fotografia da graticula empregada no posicionamento dos ossos na mesa do densitômetro ósseo, (B) fotografia dos ossos posicionados sobre a	

	gratícula prontos para serem escaneados no densitômetro ósseo.....	33
Figura 9	Fotografias da tela do computador durante o processamento das análises densitométricas. (A) fotografia com os dados obtidos depois das análises feitas pelo software. (B) imagem da densitometria, observa-se a área delimitada (quadro vermelho) no osso representando a área objeto do estudo.	33
Figura 10	Microscopia eletrônica de varredura mostrando os grânulos das biocerâmicas de absorção lenta e de absorção moderada. Na linha A observa-se a macroestrutura das partículas de 40-60 mesh; Na linha B observa-se a macro porosidade das partículas das biocerâmicas. Na linha C observam-se os microporos presentes nos grânulos das biocerâmicas.....	35
Figura 11	Imagem fotográfica das radiografias do pós-cirúrgico imediato (dia 0). Observa-se a ostectomia do rádio e o defeito crítico, além da mini placa óssea e os seus parafusos, assim como o material implantado e o defeito crítico vazio (controle negativo). (A) vista craniocaudal de ambos os radio operados, (B) vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica implantada, (C) vista mediolateral do rádio esquerdo com o defeito crítico vazio, controle negativo.....	36
Figura 12	Imagem fotográfica das radiografias dos rádios após 8 dias: Observa-se (A) vista mediolateral do rádio direito implantado com a biocerâmica de absorção lenta, note-se a presença do material ultrapassando os limites do defeito ósseo (seta vermelha). (B) vista mediolateral do rádio direito implantado com a biocerâmica de absorção moderada, a seta vermelha indica a presença do material fora do local do implante (C) vista mediolateral do rádio esquerdo com o defeito crítico vazio (controle negativo) (quadrado amarelo)	37
Figura 13	Fotografia de microscopia ótica aos oito dias observa-se tecido de granulação (quadrado azul) assim como presença de matriz orgânica não mineralizada nas bordas do defeito crítico (círculo preto). Aprecia-se também formação de	

- tecido ósseo de aspecto trabécular, sobre o qual havia proliferação endósteal com células osteoblásticas (quadrado preto). Lamina com coloração de Hematoxilina-Eosina; 4x..... 37
- Figura 14 Imagem fotográfica das radiografias dos raios dos coelhos após 15 dias. Observa-se (A) vista mediolateral do rádio direito implantado com a biocerâmica de absorção lenta, observou-se a presença de reação periosteal avaliada como discreta (score 1) (seta amarela), nota-se como o parafuso ultrapassa o limite da segunda cortical do rádio (seta laranja). (B) vista mediolateral do rádio direito implantado com a biocerâmica de absorção moderada, note-se a presença de reação periosteal avaliada como discreta (score 1) (seta amarela), (C) vista mediolateral do rádio esquerdo com o defeito crítico vazio (controle negativo): observe-se a presença de material radiopaco sugerindo a formação de uma ponte óssea..... 38
- Figura 15 Fotografia de microscopia ótica aos 15 dias, animal pertencente ao grupo GII. Observa-se evidente formação de tecido ósseo (quadrado roxo) assim como a osteointegração desse novo tecido ósseo com as bordas do defeito (círculos azuis). Igualmente, havia presença de túneis vasculares no interior do implante (quadrados pretos), assim como pequenos focos cartilaginosos no centro do defeito (círculo preto), Lamina corada com Hematoxilina-Eosina, 10X..... 39
- Figura 16 Imagem fotográfica das radiografias dos raios dos coelhos aos 30 dias observa-se: (A) vista mediolateral do rádio direito implantado com a biocerâmica de absorção lenta, aprecia-se a presença de reação periosteal discreta (score 1) (seta amarela), (B e C) vista mediolateral do rádio direito implantado com a biocerâmica de absorção lenta, observe-se a formação de uma ponte óssea discreta (score 1) (retângulo verde), (D) vista mediolateral do rádio direito com presença de calo ósseo discreto (score 1) animal pertencente ao GI..... 40
- Figura 17 Fotografia de microscopia ótica aos 30 dias, animal pertencente ao grupo GII. Observa-se presença significativa de tecido ósseo imaturo (quadrado roxo), com numerosas células osteoblásticas. Também foi evidente a presença da

- cerâmica no local do implante (círculos azuis) assim como a presença de vasos sanguíneos de grande calibre (retângulo preto). Lamina corada com Hematoxilina-Eosina, 10X..... 41
- Figura 18 Imagem fotográfica das radiografias dos raios de coelhos aos 45 dias. Observa-se: (A) vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica de absorção moderada; observa-se ponte óssea discreta (escore 1) (retângulo vermelho), (B) vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica de absorção moderada; observa-se ponte óssea moderada (escore 2) (retângulo azul). (C) vista mediolateral do rádio direito com o defeito crítico vazio (controle negativo). Nota-se a presença de material radiopaco preenchendo o defeito, reação avaliada como moderada (escore 2) (retângulo verde) 42
- Figura 19 Fotografia de microscopia ótica aos 45 dias. Observa-se evolução normal no preenchimento da falha, ainda com presença de pequenos focos do material cerâmico no defeito (quadrado verde). Numerosas células osteoblásticas sobre a superfície do tecido osteóide adjacente às bordas, indicando osteointegração (quadrados pretos). Estas observações foram semelhantes para os GI e GII. Lamina corada com Hematoxilina-Eosina, 10X..... 43
- Figura 20 Imagem fotográfica das radiografias dos raios de coelhos aos 60 dias. A e B vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica moderada. Observa-se a formação de ponte óssea escore 1 (retângulo amarelo), e escore 3 (retângulo laranja). (C) vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica de absorção lenta. Nota-se a presença de remodelação óssea (escore 3) (seta laranja). (D) preenchimento do defeito vazio, avaliado como exuberante (escore de avaliação três) (círculo vermelho). (E) vista mediolateral do rádio direito implantado com a biocerâmica de absorção lenta, reação periosteal exuberante (escore 3) (seta verde) nos extremos da placa..... 43
- Figura 21 Fotografia de microscopia ótica aos 60 dias, grupo GII. Observou-se maior formação e crescimento de tecido ósseo (quadrado preto) do que no grupo GI, presença de pequenos focos cartilagosos (quadrado azul) assim como

	da cerâmica (círculos verdes) e tecido conjuntivo ao redor dos grânulos do implante. Lamina corada com Hematoxilina-Eosina, 10X.....	44
Figura 22	Fotomicrográfas de microscopia eletrônica de varredura aos 60 dias após a implantação da biocerâmica macro-micro porosa em defeito crítico do rádio de coelho, evidenciando o crescimento do tecido ósseo. (A) grânulos de biocerâmica de absorção lenta: observa-se o tecido ósseo neoformado ao redor (quadrado verde) dos grânulos e formação de ósteon primário (seta vermelha); (B) grânulos de biocerâmica de absorção moderada evidenciando também o crescimento de tecido ósseo ao redor dos grânulos de biocerâmica (quadrado verde); (C) grupo controle negativo, observam-se as lacunas dentro do tecido ósseo neoformado (círculos laranja)	45
Figura 23	Imagem fotográfica das radiografias dos rádios dos coelhos após 90 dias. Observa-se (A) vista mediolateral do rádio direito com o biocerâmica de absorção moderada. Nota-se a presença de formação de ponte óssea, exuberante (escore 3) (retângulo vermelho). (B) vista mediolateral do rádio direito com o grupo controle. Nota-se a presença de formação de ponte óssea, exuberante (escore 3) (retângulo vermelho). (C) pode-se observar a remodelação óssea no controle negativo classificada como moderada (escore 2) após 90 dias (círculo azul)	46
Figura 24	Fotografia de microscopia ótica aos 90 dias, grupo GII. Observa-se maior presença de tecido ósseo maduro em relação ao GI, caracterizado por presença ósteons secundários (quadrado preto) e grandes vasos sanguíneos (quadrado verde), ainda com presença de grânulos da cerâmica (círculos azuis). Lamina corada com Hematoxilina-Eosina, 10X.....	47
Figura 25	Fotomicrográfas de microscopia eletrônica de varredura aos 90 dias após a implantação da biocerâmica macro micro porosa no defeito crítico do rádio de coelho. (A, B) biocerâmica de absorção lenta e moderada: observa-se o tecido ósseo neoformado maduro, com presença de ósteons secundários (círculo azul)	47

Figura 26	Fotografias de microscopia ótica aos 120 dias. (A) Observa-se tecido ósseo compacto bem diferenciado preenchendo a totalidade do defeito (quadrados pretos), com presença de ósteons secundários (círculos azuis), sendo evidentes os sistemas de Havers. 10X. (B) observou-se regeneração óssea, porém, menos desenvolvida quando comparada aos grupos (quadrado preto) GI e GII. 4X. Lamina corada com Hematoxilina-Eosina.....	48
Figura 27	Fotomicrográfas de microscopia eletrônica de varredura aos 120 dias após a implantação da biocerâmica macro micro porosa no defeito crítico do rádio de coelho. (A, B) biocerâmica de absorção lenta e moderada: observa-se a presença de tecido ósseo maduro, com presença de ósteons secundários (quadrado verde)	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Fosfatos de cálcio em sistemas biológicos (Fonte: Lobo, 2011)	24
Quadro 2	Classificação dos biomateriais de acordo com o tipo de ligação com o tecido ósseo (biodinâmica). O= tecido ósseo; B= biomaterial (Fonte: Lobo, 2011)	26
Quadro 3	Escore de avaliação radiográfica para consolidação de osteotomia experimental (Sanchez, 2010)	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores das médias da DMO (g/cm^2) observados nos diferentes grupos avaliados ao longo do tempo. Observam-se diferenças significativas ao ser comparadas as médias do GIII e as médias dos GI e G II, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)	49
----------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE GRAFICOS

Grafico 1 Comparação das médias das DMO obtidas durante todos os tempos experimentais nos três tratamentos. No eixo Y valores das médias das DMO obtidas; no eixo X os dias de avaliação dos tratamentos ao longo do tempo.....

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram determinar as características e propriedades estruturais da biocerâmica de fosfato de cálcio nano estruturado micro macro porosa em grânulos, de absorção lenta e moderada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e avaliar seu efeito em defeitos críticos experimentais em rádio de coelhos, mediante avaliações clínica, radiográfica, histológica e densitométrica (DMO). A análise na MEV mostrou microporos de até 10 μ m de diâmetro e macroporos acima de 100 μ m. Utilizaram-se 70 coelhos, Nova Zelândia, adultos jovens, machos nos quais foi realizado um defeito crítico em ambos os rádios. Os membros constituíram os grupos: GI, biocerâmica lenta; GII, biocerâmica moderada e GIII, controle negativo. Avaliações radiográficas foram feitas antes da cirurgia, imediatamente após, aos oito, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias, seguindo-se a eutanásia por sobre dose anestésica no final de cada tempo. Os rádios foram colhidos para avaliações de densitometria, histológica e microscopia eletrônica de varredura. A MEV foi feita aos 60, 90 e 120 dias. Observou-se radiograficamente aumento da densidade do implante aos oito e 15 dias, com diminuição gradativa até alcançar uma radiopacidade semelhante à do tecido ósseo adjacente. Na histologia verificou-se formação de rede vascular entre os poros de ambas biocerâmicas desde os 8 dias, formação de tecido ósseo primário e trabéculas aos 30 dias, osteons primários e osso compacto aos 120 dias, preenchendo a totalidade do defeito, com presença de osteons secundários e sistemas de Havers evidentes. A DMO aumentou até aos 45 dias nos grupos I e II, com diferença significativa entre os grupos tratados e o controle ao longo do tempo do estudo. Ambas as biocerâmicas permitem a invasão e crescimento celular e propicia a regeneração óssea, constituindo-se em implantes apropriados para o preenchimento de defeitos ósseos críticos.

Palavras chaves: biocerâmica, defeito crítico, fosfatos de cálcio, radio, coelho.

SUMMARY

The objectives of this study were to determine the characteristics and structural properties of bioceramic calcium phosphate nano-structured micro macro porous granules of slow absorption and moderated by scanning electron microscopy (SEM) and evaluate its effect on critical defects in experimental rabbits radio by clinical, radiographic, histologic and densitometric (DMO). The analysis on the SEM showed up to 10 um micropores and macropores of diameter greater than 100 micrometers. We used 70 New Zealand rabbits, young adults, males in which we performed a critical defect in both radios. The members formed groups:GI, bioceramic slow, GII, GIII and bioceramic moderate, negative control. Radiological assessments were made before surgery, immediately after the eighth, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 days followed by euthanasia by anesthetic overdose at the end of each time. The radios were harvested for evaluation of densitometry, histological and scanning electron microscopy. The SEM was taken at 60, 90 and 120 days. It was observed radiographically increased density of the implant at eight and 15 days with a gradual decrease until reaching a radiopacity similar to the adjacent bone tissue. Histologically there was formation of vascular network between the pores of both bioceramics from 8 days training of primary and trabecular bone at 30 days, primary osteons and compact bone at 120 days, filling the entire defect, the presence of osteons Secondary and Haversian systems evident. The BMD increased up to 45 days in groups I and II, with a significant difference between the treated and control groups throughout the study period. Both bioceramics allow invasion and cell growth and promotes regeneration of bone, constituting a suitable implant for filling critical defects.

Keywords: bioceramic, critical defect, calcium phosphates, radio, rabbit

INTRODUÇÃO

A perda ou alteração funcional de um órgão ou tecido é um dos problemas de saúde mais frequentes, complexos e de alto custo (Langer e Vacanti, 1993). Tais perdas ou defeitos orgânicos e teciduais são geralmente abordados por meio da substituição protética da parte acometida ou por transplantes teciduais (autólogos ou homólogos) ou ainda por órgãos completos (Vacanti e Langer, 1999). Entretanto, o índice de insucesso dessas técnicas, além das desvantagens por elas apresentadas, demandam uma busca contínua por soluções mais eficazes, seguras e previsíveis.

Dentre todos os órgãos e tecidos transplantados, o tecido ósseo assume o segundo lugar, perdendo apenas as transfusões sanguíneas (Betz, 2002). Embora os enxertos ósseos autólogos e homólogos correspondam à 90% dos enxertos, o índice de insucesso varia da 13 a 30% para os autólogos e de 20 a 40 % para os homólogos (Mackay *et al.*, 1998). Há, portanto, a necessidade de continuidade de pesquisas por alternativas terapêuticas que proporcionem maior índice de sucesso nos procedimentos cirúrgicos com mínimo risco para os pacientes.

O osso é um compósito mineralizado que apresenta diversos tipos celulares associados a uma fração mineral e uma biopolimérica. A fração mineral é composta basicamente por cristais de apatita que se assemelham à hidroxiapatita (HA) e que contém, em menores proporções, outros minerais como carbonato (CO₃), magnésio (Mg) e sódio (Na). A fração biopolimérica é composta por proteínas da matriz extracelular, onde se observa predominância de colágeno tipo I, além de outras proteínas não colagenosas como osteopontina, fibronectina, sialoproteína óssea e proteínas ósseas morfogenéticas (LeGeros, 2008).

A pesquisa por substitutos ósseos data da pré-história e grandes esforços ainda são

direcionados para a elaboração de substitutos sintéticos que possam proporcionar resultados semelhantes ou superiores aos enxertos autólogos (Caplan e Goldberg, 1999; Betz, 2002). A bioengenharia de tecidos, que aplica princípios de biologia, química, matemática, física e engenharia, tenta reproduzir processos biológicos básicos que ocorrem durante a regeneração tecidual, para que se possa obter uma recuperação funcional do esqueleto humano (Caplan e Goldberg, 1999).

Dentre os biomateriais sintéticos que apresentam potencial para serem utilizados como matrizes carreadoras de células tronco, estão as biocerâmicas bifásicas de fosfatos de cálcio (BCP), devido à sua semelhança química com o osso, bioatividade, biocompatibilidade. Algumas biocerâmicas têm sido consideradas também osteoindutoras e não apenas osteocondutoras, como a maioria dos biomateriais sintéticos (Wykrota *et al.*, 2000; LeGeros, 2008). Além disso, a diversidade e versatilidade de formas de apresentação assim como, a possibilidade de se obter biomateriais com distintas composições químicas e estruturas físicas fazem das biocerâmicas bifásicas uma vantajosa alternativa para cirurgias ortopédicas, de crânio e bucomaxilofaciais (De Oliveira *et al.*, 2007; LeGeros, 2008).

Algumas biocerâmicas bifásicas de fosfatos de cálcio são capazes de promover a regeneração óssea com sucesso, de pacientes portadores de defeitos ortopédicos cavitários de diversas magnitudes e em distintas localizações assim como, de defeitos ósseos (Wykrota *et al.*, 2000). Sabe-se que a evolução clínica de cada paciente é dependente não apenas do tipo de substituto ósseo utilizado, mas também de suas condições gerais como idade e doenças associadas e da técnica cirúrgica utilizada. No que diz respeito aos biomateriais, as respostas teciduais são diretamente

dependentes de sua composição química e de suas características físicas. Biomateriais que diferem em um ou mais desses quesitos, levarão inevitavelmente à distintas respostas locais e logo, à diferentes evoluções clínicas (Wykrota *et al.*, 2000; Lobo, 2011). A biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturada micro macro porosa em grânulos (HA/ β TCP), possui microporos com até 10 μ de diâmetro, apresentam capilaridade e tensão superficial, propriedades para armazenar, transportar e liberar substâncias proteicas (quimiotaxia), como fatores morfogenéticos sinalizadores do próprio indivíduo para a formação de tecidos, ou substâncias extrínsecas, como fatores de crescimento (BMP's), medicamentos e quimioterápicos. Sua geometria apresenta vantagens em relação a outros materiais sem essas características, já que a osteogênese é geometricamente dependente. Da mesma forma, os macro poros de até 500 μ permitem a deposição das células e a condução do processo por haptotaxia (movimentações das células na superfície do material), permitindo a formação óssea dentro dos poros e na superfície do material, resultando em uma ótima aderência devido à liberação de substância cimentante amorfa produzida pelo osteoblasto que confere estrutura e resistência mecânica ao sistema (Biocerâmica, 2011).

Encontram-se disponíveis diferentes apresentações de cerâmicas, inclusive com diferentes tempos de absorção que poderá ser um fator decisivo diante de situações clínico-cirúrgicas específicas.

Assim o objetivo deste estudo foi avaliar por exames clínicos, radiográficos, histológicos, de densitometria, e de microscopia eletrônica de varredura, o efeito da HA/ β TCP de absorção, lenta e moderada, após seu emprego em defeito crítico em rádio de coelhos.

REVISÃO DA LITERATURA

A bioengenharia de tecidos é conhecida como a ciência interdisciplinar que integra os princípios de engenharia aos das ciências biológicas com o intuito de desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função tecidual (Langer e Vacanti, 1993; Caplan e Goldberg 1999). Os primeiros indícios de sua utilização retrocedem ao ano de 1933 quando Bisceglie implantou, na cavidade abdominal de um suíno, células tumorais de camundongos carreadas em uma membrana polimérica e observou que as células permaneceram viáveis, sem serem eliminadas pelo sistema imune (Langer e Vacanti, 1999).

Ao longo dos anos e com o aumento do conhecimento relativo ao isolamento e cultivo das células, três estratégias terapêuticas passaram a ser empregadas: 1 - infusão de células; 2 - utilização de moléculas bioativas ou substâncias indutoras de tecidos; 3 - implantes de células cultivadas sobre ou dentro de matrizes (*scaffolds*) (engenharia de tecidos) (Langer e Vacanti, 1993).

Assim, a engenharia de tecidos trouxe consigo a medicina regenerativa (Vacanti e Langer, 1999). Fundamentalmente, todos os procedimentos relacionados à engenharia de tecidos envolvem a utilização de células, que constituem a base da neoformação tecidual (Caplan e Goldberg, 1999).

Tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo, duro, especializado que possui importantes funções estruturais e metabólicas (Doblare *et al.*, 2004; Samuelson *et al.*, 2007). A habilidade deste tecido em armazenar minerais, em especial o cálcio, principalmente na forma de cristais de hidroxiapatita, é uma das características que o diferencia dos outros tecidos conectivos (Samuelson *et al.*, 2007). O esqueleto do

coelho é mais frágil do que os de outras espécies e representa 8% do peso corporal total (Mader, 1997). A anatomia e a fisiologia óssea do coelho apresentam semelhanças com as dos seres humanos (Norris *et al.*, 2001), e no coelho adulto, o osso lamelar pode ser cortical (compacto) ou trabécular (esponjoso). Microscopicamente, o osso cortical possui uma unidade estrutural básica formada por um osteon ou sistema de Havers orientado longitudinalmente, onde a matriz extracelular é depositada em camadas concêntricas ao redor do canal vascular central chamado de canal de Havers. Entre as camadas, pode-se observar lacunas que contêm osteócitos (Fig. 1) (Webb e Tricker, 2000; Doblare *et al.*, 2004). Verifica-se um tempo mais curto de consolidação óssea no coelho ao ser comparado com outras espécies, devido ao metabolismo acelerado da espécie (An *et al.*, 1999; Richardson, 2000; Hankenson *et al.*, 2003).

No osso compacto, fibras nervosas e vasos sanguíneos, passam pelo canal de Havers e pelos canalículos até chegarem aos osteócitos e no osso trabécular, o aporte sanguíneo é obtido através do endóstio. Os canais de Volkmann são transversais a oblíquos e unem os canais de Havers e o sistema vascular do perióstio e do endóstio (Fig. 1) (Samuelson *et al.*, 2007).

O suprimento do osso maduro deriva-se da circulação sistêmica e é feito através das artérias nutritivas, metafisárias e periosteais (Doige, 1990; Denny e Butterworth, 2000). O fluxo de sangue através do córtex diafisário dos ossos longos ocorre de forma centrífuga, da medula para o perióstio (Wilson, 1991). O sistema vascular aferente encontra-se na cavidade medular do osso e é constituído pela artéria nutritiva e pelas artérias metafisárias proximal e distal. A artéria nutritiva atravessa a cortical e penetra na cavidade medular onde se divide em artérias ascendentes e descendentes nutrindo o endóstio da região diafisária do osso (Wilson, 1991; Denny e Butterworth, 2000).

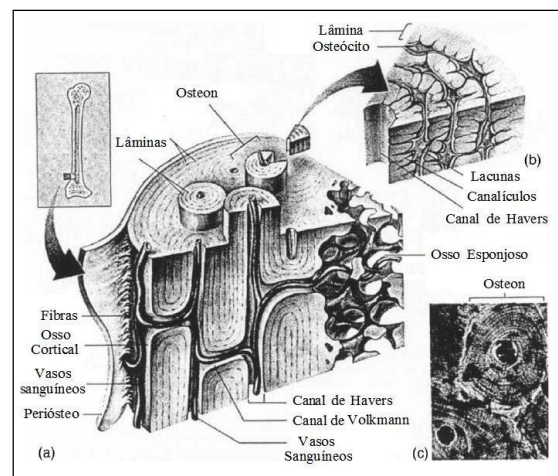


Figura 1. Representação gráfica da estrutura microscópica do osso cortical. (a) esquema 3D do osso cortical, (b) corte do sistema de Havers, (c) Fotomicrográfiás de um sistema de Havers. (Fonte: Doblare *et al.*, 2004).

As metáfises ósseas são supridas pelas múltiplas artérias metafisárias que se unem às artérias diafisárias. Nos ossos longos, medula e córtex possuem vascularização paralela, com ramos vasculares que derivam da artéria nutritiva. O ramo que nutre o córtex divide-se para suprir os vasos dos canais de Havers (Fig. 2) (Wilson, 1991).

O perióstio que se encontra unido ao osso e em contato externo com a musculatura, possui vasos sanguíneos, tecido conectivo fibroso denso e células osteogênicas (Samuelson, 2007). Sua vascularização consiste em vênulas e arteríolas que fornecem um aporte sanguíneo restrito, atingindo apenas um quarto a um terço da espessura da cortical, onde se anastomosam com os capilares do sistema arterial medular. A pressão do fluxo sanguíneo medular parece limitar o fluxo periosteal para a parte interna do córtex (Fig. 2) (Wilson, 1991).

Durante a vida, o osso cresce, modifica a sua forma, se regenera e sofre constante remodelação. No adulto, a formação e a reabsorção óssea mobilizam e armazenam o cálcio e o fósforo dos ossos, sendo que o equilíbrio entre essas atividades ao longo do tempo determina a massa óssea. Esses

processos são mediados por eventos mecânicos, hormonais e fisiológicos (Doblaré *et al.*, 2004). Dentre os fatores que promovem o processo de reabsorção óssea está principalmente, a remoção de tecido necrosado, mas também processos prolongados de estresse biomecânico, desequilíbrios nutricionais como deficiências de vitaminas e/ou minerais como o cálcio, diminuição ou ausência de atividade física e alterações na secreção de hormônios (Samuelson, 2007).

Quando lesionado, o tecido ósseo, diferente de outros órgãos, pode-se regenerar, voltando após a remodelação, ao seu estado fisiológico (função e forma). Esse complexo processo que envolve a interação de diversos mecanismos está sujeito a variações e pode ser dividido em diferentes fases sequenciais que compreendem inflamação aguda, formação do hematoma, angiogênese, formação do calo, ossificação e remodelação (Fig. 3) (Webb e Tricker, 2000; Doblaré *et al.*, 2004). A duração de cada fase e o tempo

necessário para completar o processo de reparação tecidual depende de alguns fatores como a idade do paciente e estado de saúde geral, tipo, duração e intensidade do trauma, resposta inflamatória, suprimento sanguíneo local, redução, estabilização, carga e movimento (Pinheiro e Gerbi, 2006).

Quando se produz uma fratura, o periósteo é dilacerado, os vasos sanguíneos são rompidos, os fragmentos ósseos são deslocados e o tecido mole traumatizado. Como consequência, ocorre sangramento local com subsequente formação do hematoma e interrupção do fluxo sanguíneo, inflamação e edema na área lesada, seguidos pela proliferação de células mesenquimais pluripotenciais, para depois dar início à consolidação óssea (Doige, 1990).

São descritos dois tipos de consolidação óssea, primária e secundária, e a sua ocorrência depende fundamentalmente do grau de estabilidade presente no foco da fratura durante todo o processo de

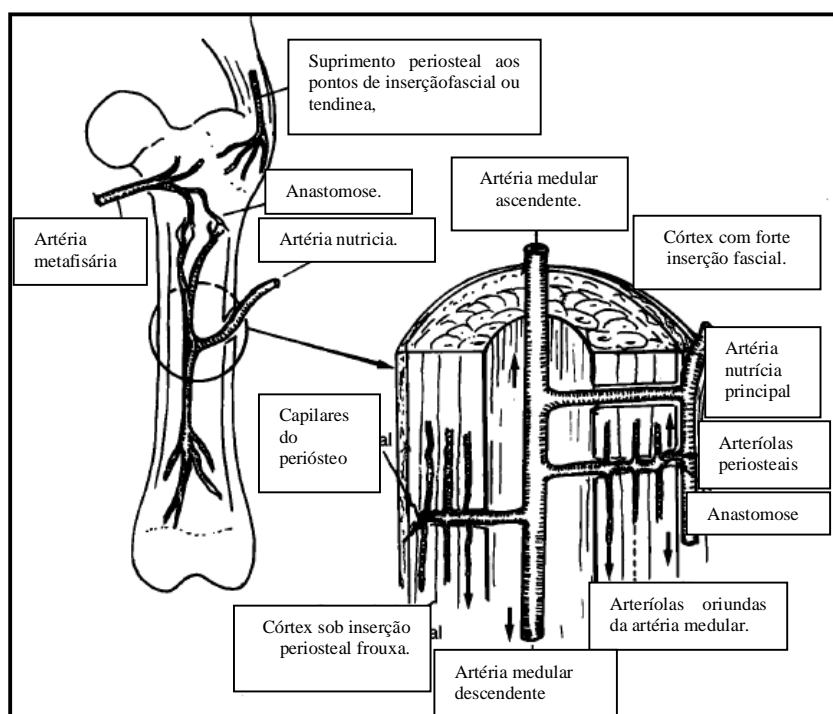


Figura 2. Esquema do suprimento sanguíneo em um osso longo maduro. (Fonte: Denny e Butterworth, 2000).

consolidação. Na consolidação primária, direta ou por primeira intenção, o osso é o único tecido formado entre os fragmentos ósseos; enquanto na consolidação secundária, indireta ou por segunda intenção, forma-se inicialmente um tecido conectivo cartilaginoso ou fibroso entre os fragmentos ósseos, chamado de calo, que se torna mineralizado e será substituído progressivamente por osso (Kaderly, 1991). A rigidez da fixação ou da imobilização da fratura determina o tamanho do calo cartilaginoso e conseqüentemente o tipo de consolidação (An *et al.*, 1999).

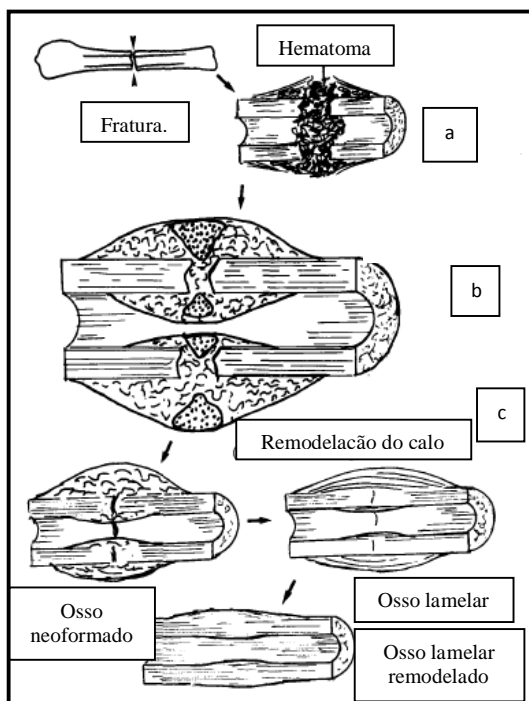


Figura 3. Ilustração esquemática da consolidação óssea secundária. (a) formação do hematoma no local da fratura. (b) substituição do hematoma pelo calo ósseo. (c) processo de remodelação óssea. (Fonte: Denny e Butterworth, 2000).

A consolidação primária depende de dois fatores básicos que são a vascularização local (biológico) e a estabilidade absoluta (mecânico). Este tipo de consolidação é observado geralmente nas reduções abertas com fixação interna rígida, onde há redução, estabilização e compressão do foco da fratura, com conseqüente eliminação do processo biológico de estabilização

progressiva, sem formação dos tecidos de granulação, fibroso e cartilaginoso (Fig. 4) (Webb e Tricker, 2000). Caracteriza-se pela ausência do calo periosteal e endósteal, uma vez que, são eliminados os sinais biológicos responsáveis pelo recrutamento de células osteogênicas precursoras dos tecidos adjacentes (Kaderly, 1991). Entretanto, na grande maioria das fraturas ocorre consolidação secundária, onde existe um discreto movimento dos fragmentos ósseos que são progressivamente estabilizados pela formação do calo ósseo com recuperação da capacidade de carga. Dispositivos de fixação de fraturas como os pinos intramedulares, reduzem, mas não impedem, o micro-movimento dos fragmentos ósseos, o que estimula a invasão vascular e a formação do calo ósseo (Webb e Tricker, 2000; Flach *et al.*, 2002).

O processo de consolidação óssea secundária é um conjunto de respostas teciduais sequenciais. Imediatamente após a fratura, ocorre hemorragia local devido à ruptura de vasos periosteais, medulares e corticais, presentes nos canais de Havers e de Wolkman, com conseqüente formação do coágulo e interrupção do fluxo sanguíneo local, na tentativa de promover hemostasia. Conseqüentemente, a isquemia local causa necrose tecidual que é removida pelos macrófagos. Paralelo a este processo, ocorre reorganização do coágulo formando-se um tecido de granulação inicial, pela migração e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas provenientes dos tecidos moles adjacentes, como também neoformação de pequenos vasos sanguíneos. Desse modo, forma-se o calo primário que confere estabilidade inicial à fratura (Webb e Tricker, 2000; Doblare *et al.*, 2004).

Geralmente, o calo cartilaginoso forma-se nos primeiros dias pós-trauma e divide-se em interno, produzido pelo endósteo, e externo, considerado o mais importante, produzido pelo periósteo (Doige, 1990; Webb e Tricker, 2000). Na formação do calo

ósseo, células mesenquimais aferentes do perióstio, endóstio e medula óssea, diferenciam-se em condrócitos, osteoblastos e fibroblastos. Os condrócitos proliferam e sintetizam matriz cartilaginosa até a completa substituição do tecido de granulação por cartilagem, enquanto os fibroblastos continuam sua proliferação. Paralelamente, ocorre a invasão de células do endotélio vascular e inicia-se a angiogênese (Doblaré *et al.*, 2004). Em seguida, inicia-se a formação de matriz óssea mineralizada que começa nas áreas de maior estabilidade na periferia do calo. Essa fase representa o período mais ativo da osteogênese e caracteriza-se por elevada atividade osteoblástica. O calo ósseo primário (cartilaginoso) é progressivamente substituído pelo calo ósseo secundário (mineralizado) formando uma ponte rígida ao redor do foco da fratura, conferindo maior resistência à mesma (Doige, 1990; Oonishi *et al.*, 1997; Webb e Tricker, 2000; Doblaré *et al.*, 2004; Samuelson, 2007).

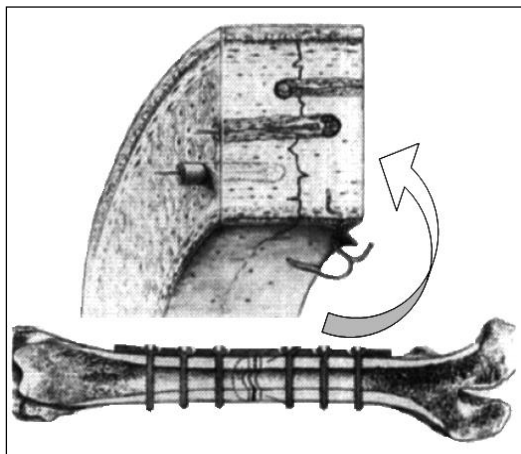


Figura 4. Esquema da ossificação primária presente nas fixações rígidas aprecia-se no detalhe a correta aposição dos segmentos ósseos, fator que favorece a consolidação primária do osso. (Fonte: Kaderly, 1991).

O processo de remodelação é a fase final e a mais longa do processo de consolidação óssea. Consiste na reestruturação do osso imaturo em sua configuração original pela

ação principalmente dos osteoclastos. Essa fase começa lenta e progressivamente com o intuito de restabelecer a estrutura e função do osso (Figs. 4 e 5) (Doige, 1990; Webb e Tricker, 2000; Doblaré *et al.*, 2004; Samuelson, 2007). Embora as fases sequenciais de consolidação descrevam os eventos fundamentais ocorridos através do tempo de regeneração óssea, existe uma inter-relação entre eles, sendo que a substituição do calo pelo osso lamelar ocorre simultaneamente com a mineralização da cartilagem, invasão vascular e formação de osso imaturo. Além disso, eventos fundamentais como proliferação e diferenciação celular e síntese de matriz extracelular ocorrem durante todas as fases de consolidação (Borges *et al.*, 1998; Rezende *et al.*, 1998; Borges *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2000; Fehlbeg, 2001; Vital *et al.* 2006). Segundo Richardson (2000), devido ao metabolismo acelerado da espécie, as fraturas nos coelhos apresentam um calo ósseo por volta do décimo dia após o trauma, sendo que a consolidação óssea completa, em fraturas sem complicações, ocorre geralmente seis semanas pós-trauma.

Diferentes animais têm sido empregados em pesquisas de consolidação de fraturas e osteotomias (An e Friedman, 1999; An *et al.*, 1999). Apesar de todos os organismos apresentarem algumas diferenças na fisiologia óssea, Norris *et al.*, (2001) propuseram o coelho como modelo particularmente útil para se estudar a fisiologia óssea humana, uma vez que essa espécie apresenta padrões de crescimento ósseo e perfis de massa óssea semelhante às dos seres humanos. O fechamento das placas epifisárias no coelho ocorre por volta da 28^a semana de idade e parece estar associado, como nos humanos, às concentrações de estrógenos no organismo (Harcourt-Brown, 2002). A densidade mineral óssea continua aumentando até a 36^a semana de vida, oito semanas após a maturidade esquelética. Padrões de aumento de densidade óssea após o fechamento epifisário também são

observados em humanos (Norris *et al.*, 2001).

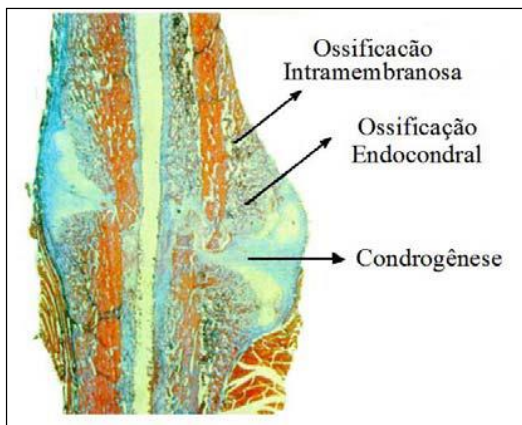


Figura 5. Representação gráfica da consolidação óssea secundária. Calo ósseo após nove dias da fratura mostrando osso maduro sob o periosteio (ossificação intramembranosa) e abundância de tecido cartilaginoso adjacente à fratura (condrogenese) (Fonte: Doblaré *et al.*, 2004).

Outra vantagem é a semelhança do comportamento dos marcadores de remodelação óssea e a 1,25 diidroxicalciferol. A metabolismo do coelho faz com que esses eventos fisiológicos aconteçam em períodos de tempo mais curtos do que nos humanos, fato que facilita e aprimora o estudo dos processos fisiológicos no tecido ósseo. Todavia, os autores alegam uma possível desvantagem do coelho, que é a maior relação entre a ingestão de Ca/Kg de massa corporal quando comparada àquela registrada em humanos. Porém, isto também é observado com outros modelos animais (Norris *et al.*, 2001).

Enxertos ósseos

O auto-enxerto é considerado a melhor opção, mas tem suas limitações, bem como o alo-enxerto. O auto-enxerto representa o padrão ouro dos enxertos ósseos, pode ser obtido do osso esponjoso, cortical ou córtico-esponjoso (Goldberg e Akhavan, 2005) e possui propriedades osteogênicas (células osteoblásticas derivadas da medula óssea e células precursoras

preosteoblásticas), osteo-inductivas (proteínas não colagênicas da matriz óssea, incluindo fatores de crescimento) e osteo-condutivas (mineral ósseo e colágeno). É histocompatível e não há risco de transmissão de doenças (Zárate-Kalfópulos e Reyes-Sanchez, 2006). As desvantagens são a insuficiente quantidade de enxerto, o risco de morbidade pós-cirúrgica significativa na zona doadora, infecção, dor, hemorragia, debilidade muscular, além de maior tempo cirúrgico, perda sanguínea e custos adicionais (Goldberg e Akhavan, 2005).

O aloenxerto é empregado no preenchimento de falhas e suporte estrutural. Uma de suas grandes vantagens é sua maior disponibilidade, diferentes formatos e tamanhos, não são sacrificadas estruturas do hospedeiro e não acarreta morbidade no local doador (Goldberg e Akhavan, 2005). A maior preocupação na utilização de aloenxertos é a possibilidade de transmissão de doenças, reação imune, que apesar de reduzida pelos processos de conservação, continua sendo um fator preocupante. Os processos empregados na redução dos componentes antigênicos (congelamento e irradiação) do enxerto têm efeito dose-dependente, sobre as propriedades biológicas e biomecânicas do enxerto (Vacarro, 2004; Goldberg e Akhavan, 2005).

As limitações do emprego do enxerto biológico têm impulsionado as pesquisas com biomateriais capazes de favorecer o crescimento ósseo por condução e se possível, por indução. Estas características, dependentes das propriedades físicas e químicas do material, devem ser compatíveis com a fisiologia óssea. Devido a suas propriedades físicas e estruturais, a biocerâmica de fosfatos de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa mostra-se como alternativa para uso em diferentes situações, uma vez que, favorece a reparação óssea em fraturas recentes, crônicas e é usada também para preenchimento de falhas

ósseas nos casos de prótese articular. É uma alternativa viável, disponível na quantidade desejada, economicamente viável e compatível com o tecido ósseo, visto que sua estrutura é semelhante a do osso (Gao *et al.*, 1995). O biomaterial deve ser degradável, para não interferir nas propriedades mecânicas do osso neoformado e possuir poros interconectados de diâmetro entre 100 e 500 μm (Rumpel *et al.*, 2006). A conexão entre os poros facilita a invasão de células e vasos sanguíneos. As desvantagens do material poroso, entretanto, são a dificuldade de uniformidade dos poros e a susceptibilidade de desintegração e consequente perda de função (Shimazaki e Mooney, 1985).

Um substituto ósseo ideal deve ser esterilizável, biocompatível e estar disponível em quantidades suficientes. Deve proporcionar osteocondução ou ser capaz de induzir diferenciação de células locais em células formadoras de osso (Linkhart, 1998).

“Um biomaterial é caracterizado como qualquer substância diferente de um fármaco, ou uma combinação de substâncias de origem natural ou sintética, que possam ser utilizadas durante qualquer período de tempo, como um sistema ou parte de um sistema, que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (Willians, 1987), e são divididos em: biológicos e sintéticos. Os biológicos podem ser moles e duros.

Os biomateriais para enxerto ósseo são também classificados como osteogênicos osteoindutores e osteocondutores (Spriano *et al.*, 2005, Suzuki, 2005). Os osteogênicos são capazes de estimular a formação de osso diretamente a partir de osteoblastos. Os osteoindutores induzem a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas, aumentando a formação óssea local, ou mesmo estimulando a formação de osso em um sítio heterotópico. Os osteocondutores,

geralmente inorgânicos, permitem a aposição de tecido novo na sua superfície, requerendo a presença de tecido ósseo preexistente como fonte de células osteoprogenitoras. Na osteocondução tem-se a adesão, migração, distribuição e infiltração de células osteogênicas, assim como de vasos sanguíneos no material (Olsson, 2008).

Existem diferentes tipos de biomateriais inorgânicos dentre os quais se destacam as cerâmicas, que se mostram promissoras como substitutos ósseos. As cerâmicas são enxertos cujos poros permitem a invasão vascular e favorece o crescimento e adesão celular (Safdar *et al.*, 2005).

Biocerâmicas

Os procedimentos de enxertias normalmente utilizados para o tratamento de pacientes portadores de grandes perdas ósseas envolvem enxertos autólogos, homólogos (ou heterólogos), xenólogos ou ainda os aloplásticos, conhecidos também como biomateriais (De Long *et al.*, 2007 e Lobo, 2011).

Os enxertos homólogos, obtidos de cadáveres, embora não requeiram nova cirurgia e estejam disponíveis em quantidades ilimitadas, elevam o custo dos procedimentos cirúrgicos e implicam principalmente na possibilidade de transmissão de doenças infectocontagiosas (Betz, 2002). Embora alguns enxertos homólogos e xenólogos, incluindo as DBMs (matriz óssea desmineralizada), sejam considerados osteoindutores, devido à presença de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), não há estudos concretos na literatura mundial que comprovem este fato, assim como, não há evidências clínicas que mostrem a eficácia ou eventuais vantagens de tais enxertos sobre os demais. O processo de esterilização desses tipos de enxertos é crucial e normalmente realizado por radiação gama ou óxido de etileno.

Entretanto, enquanto a radiação gama afeta significativamente a resistência mecânica dos enxertos, o óxido de etileno parece interferir nas suas eventuais propriedades osteoindutoras (Lobo, 2011).

Portanto, os enxertos ou implantes de materiais aloplásticos representam a mais promissora alternativa para o tratamento de pacientes portadores de perdas ósseas. Dentre os biomateriais para reconstrução óssea, as biocerâmicas de fosfatos de cálcio, materiais obtidos por sinterização a temperaturas acima de 1000°C, ocupam posição de destaque não apenas por sua similaridade com o tecido ósseo, mas também por sua biocompatibilidade, segurança, previsibilidade, ilimitada disponibilidade, ausência de morbidade para o paciente, custo-benefício favorável e possibilidade de serem obtidas com propriedades distintas, podendo assim atender às necessidades de cada paciente (Legeros, 1988; Legeros, 2008).

As biocerâmicas de fosfatos de cálcio são utilizadas como substitutos ósseos não apenas em cirurgias ortopédicas, de crânio e buco-maxilo-faciais, procedimentos de artrodese de coluna e neurocirurgias (Davies, 2000; Le Nihouannen *et al.*, 2007), mas também como cimentos, recobrimentos e sistemas liberadores de drogas. Muitos tipos de fosfatos de cálcio são naturalmente encontrados em sistemas biológicos (Quadro 1) (Lobo, 2011). As apatitas são os compostos de fosfatos de cálcio mais comumente encontrados (Legeros *et al.*, 2003). De maneira geral, os biomateriais para reconstruções ósseas podem ser classificados de acordo com sua composição química, estrutura física, grau de reabsorção e tipo de adesão ao tecido ósseo. Quanto à composição química, os biomateriais são inicialmente classificados dentre os grandes grupos representados pelos biomateriais cerâmicos, poliméricos, metálicos e compósitos. Dentre os cerâmicos, eles

Fosfatos de cálcio	Fórmula química	Ocorrência
Apatita carbonatada, apatita - F - carbonatada	$(Ca, Z)_{10}(PO_4, Y)_6(OH, Z)_2$	Esmalte, dentina, osso, algumas conchas, calcificações patológicas como cálculos renais, dentes de fósseis, calcificações de próteses de valvas cardíacas
Octacálcio fosfato, OCP	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	Calcificações patológicas (cálculos dentários, pedras urinárias)
Brushite, dicálcio fosfato dihidratado, DCPD	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	Calcificações patológicas, esmalte humano, cáries dentárias
Whitlockite, beta tricálcio fosfato Mg-substituído, β -TCMP	$(Ca, Mg)_3(PO_4)_2$	Calcificações patológicas, cartilagem artrítica, calcificações de tecidos moles
Fosfato de cálcio amorfo, ACP	$(Ca, Mg)_x(PO_4, Y')_y$	Calcificações de tecidos moles (pele e articulações) associadas à uremia
Pirofosfato de cálcio dihidratado, CPPD	$Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$	Depósitos em pseudo-gotas no fluido sinovial

Z = Na, Mg, K, Sr, etc; Y = CO₃, HPO₄; X = Cl, F; Y' = P₂O₇, CO₃

Quadro 1: Fosfatos de cálcio em sistemas biológicos (Fonte: Lobo, 2011).

podem ser subdivididos em, biomateriais de fosfatos de cálcio, sulfatos de cálcio, carbonatos de cálcio e silicatos. Os de fosfatos de cálcio podem ainda ser subdivididos em hidroxiapatitas (HA) $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, beta-tricálcio fosfato (β -TCP) $[Ca_3(PO_4)_2]$, alfa-tricálcio fosfato (α -TCP), octacálcio fosfato, dentre outros, além dos biomateriais bifásicos de fosfatos de cálcio (BCP), que são uma mistura de HA e β -TCP (Legeros, 1988). As HA podem ainda ser subdivididas em HA sintéticas ou HA derivadas de produtos naturais como as obtidas de corais (Legeros, 1988).

No Brasil, a primeira biocerâmica bifásica micro e macro porosa têm sido produzida e aplicada clinicamente com sucesso desde 1985 (EINCO Biomaterial Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil).

Modificações em parâmetros como temperatura de sinterização e pureza dos materiais iniciais originam diferentes biocerâmicas de fosfatos de cálcio cujas variáveis incluem composições químicas distintas, diferentes estruturas físicas (como tamanho, geometria de poros e rugosidade de superfície), energia e carga de superfície, além da área de superfície específica (Legeros *et al.*, 2003; Le Nihouannen, *et al.*, 2007). Essas variáveis alteram a bioatividade, osteocondução e as propriedades mecânicas das biocerâmicas, que por sua vez, influenciam na adesão, proliferação e diferenciação celulares (Lobo *et al.*, 2009). Mais recentemente têm sido relatado que algumas biocerâmicas osteoindutoras estão sendo implantadas ectopicamente em modelos animais (Yuan *et al.*, 2006; Ripamonti, 2010).

Quanto à reabsorção, as biocerâmicas podem variar de não reabsorvíveis (como por exemplo, as hidroxiapatitas) até as totalmente reabsorvíveis (como o β -TCP). O grau de reabsorção decorre de fatores como a composição química, porosidade (quanto maior o número e tamanho de poros, maior

a taxa de reabsorção/dissolução) e cristalinidade, ou seja, tamanho de cristais em um dado tamanho de partícula, onde quanto menores os cristais, maior a taxa de reabsorção. A utilização de biomateriais completamente reabsorvíveis e/ou solúveis tem sido o objetivo de muitos pesquisadores e cirurgiões. O processo de reabsorção refere-se ao mecanismo mediado por células, enquanto a dissolução refere-se ao processo químico resultante de reações com os fluidos corporais. Uma alta taxa de reabsorção/dissolução pode comprometer a reconstrução óssea já que o biomaterial pode ser degradado mais rapidamente do que a taxa de neoformação óssea. Além disso, um processo de solubilização muito rápido pode ser prejudicial à neoformação óssea devido aos altos níveis de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} que são liberados no microambiente, após sua implantação, resultando em uma mudança de pH, com consequente resposta inflamatória indesejada e formação de fibrose (Yuan *et al.*, 2001). Através da utilização de biocerâmica bifásica pode-se elaborar biomateriais com taxas diferentes de reabsorção, já que é possível variar as proporções entre HA/ β -TCP, o que abre um leque de alternativas para o tratamento de perdas ósseas em pacientes com diversas condições clínicas (Lobo, 2011).

Com relação ao tipo de adesão ao tecido ósseo, os biomateriais podem ser classificados em biotolerantes, bioinertes ou bioativos (Quadro 2). A bioatividade das biocerâmicas pode ser o fator responsável por sua osteocondução e/ou eventual osteoindução. No primeiro processo, osteoblastos maduros promovem a aposição de matriz óssea diretamente na superfície do biomaterial enquanto que na osteoindução, o biomaterial favorece o recrutamento, diferenciação e maturação de células tronco em células da linhagem osteoblástica (Lobo, 2011).


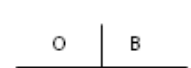
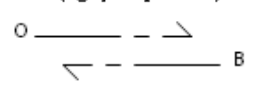
As biocerâmicas bifásicas de fosfatos de cálcio (BCP) apresentam, portanto

significativas vantagens sobre as demais devido a sua controlada bioatividade e ao equilíbrio entre reabsorção e solubilização, o que proporciona uma estabilidade do biomaterial, ao mesmo tempo em que permite a neoformação óssea (Daculsi *et al.*, 1990). A combinação de diferentes proporções entre a fase mais estável (HA) e a fase mais solúvel (β -TCP) permite a obtenção de materiais aplicáveis em grandes perdas ósseas, em áreas de carga e ainda, a produção de substitutos individuais para casos específicos confeccionados a partir de tomografias computadorizadas (Daculsi *et al.*, 1990; Davies, 2000; De Oliveira *et al.*, 2007).

Esta biocerâmica é usada como arcabouço para reconstrução e/ou neoformação óssea, permitindo os eventos naturais do processo a partir das estruturas e substâncias orgânicas do próprio indivíduo. A estrutura mineral orgânica tem características arquitetônicas próprias com micro e macro poros intercomunicantes com espaços necessários

para interpenetração e deposição de substâncias e estruturas orgânicas que caracterizam o tecido ósseo (Fehlberg, 2001; Duarte, 2003; Vital *et al.*, 2006). A HA/TCP possui poros, com limitações máximas de 500 μ m e topografia de superfície rugosa que permitem a deposição de células e substâncias orgânicas essenciais. Possui micro poros com até 10 μ m de diâmetro, apresenta capilaridade e tensão superficial e propriedades para armazenar, transportar e liberar substâncias protéicas (quimiotaxia), como fatores morfogênicos sinalizadores do próprio indivíduo para a formação de tecidos, ou substâncias extrínsecas como fatores de crescimento (BMP's), medicamentos e quimioterápicos. Sua geometria apresenta vantagens em relação a outros materiais desprovidos destas características, já que a osteogênese é geometricamente dependente (Biocerâmica, 2011).

As respostas orgânicas diferem de acordo com o material utilizado, o que significa que

Tipo de Biomaterial	Biodinâmica	Tipo de ligação
Metais	Biotolerantes	Osteogênese - distante 
Óxidos (Al_2O_3)	Bioinertes	Osteogênese - em contato 
Biocerâmicas de Ca-P, biovidro	Bioativas	Osteogênese - continuidade (ligação química) 

Quadro 2: Classificação dos biomateriais de acordo com o tipo de ligação com o tecido ósseo (biodinâmica).

O= tecido ósseo; B= biomaterial (Fonte: Lobo, 2011).

diferentes cerâmicas podem provocar respostas orgânicas diferenciadas. Essas respostas estão diretamente relacionadas às estruturas físico-química e arquitetônica do material usado para reconstrução óssea. A HA/TCP granulada com peso específico de $1,2 \text{ g/cm}^3$ tem a concentração de fosfatos de cálcio necessária para sua finalidade, com porosidade e resistência mecânicas imprescindíveis. Permite sua mistura com sangue e outras substâncias do paciente sem perdas de suas características. O número de poros além dos limites (quantidade excessiva), ou o aumento do diâmetro além de $500 \text{ }\mu\text{m}$ leva a perda da resistência mecânica, do volume de fosfatos de cálcio necessários e, evidentemente, à diminuição do peso específico. Cada grama do material granulado tem a capacidade de absorção de aproximadamente $0,7 \text{ ml}$ de substâncias, ou cada cm^3 tem a capacidade de absorção de mais ou menos $0,84 \text{ cm}^3$ de substâncias, como sangue medular e seus componentes, por exemplo. Quando usada para reconstrução óssea, o material deve apresentar granulometria variável entre 10 e 200 *mesh*, pois partículas maiores podem levar a reações de corpo estranho e abaixo de $150 \text{ }\mu$ (acima de 200 *mesh*), podem ser rapidamente fagocitadas por processo inflamatório agudo que pode ser exacerbado (biocerâmica, 2011).

Um bom material para reconstrução óssea não pode ter alteração das características físico-químicas quando introduzidos no organismo até ocorrer a neoformação óssea desejável. Portanto, deverá ser substituído pelo organismo no processo orgânico natural de reposição óssea e não ser reabsorvido e/ou solubilizado quando aplicado. Por ser biologicamente atóxica, sem reações indesejáveis, a biocerâmica fosfo-cálcica bifásica micro-macro porosa HA/TCP (Osteosynt), pode ser utilizada nas mais diversas situações e áreas da medicina, odontologia e veterinária, para o preenchimento e reconstrução de perdas ósseas em geral, manutenção de estruturas

anatômicas em ortopedia e traumatologia, neurocirurgia, cirurgia e traumatologia buco-maxilo-facial, cirurgias plásticas estéticas reconstrutoras, cirurgias crânio faciais, oftalmologia para o tratamento de lesões e perdas, recomposições como perdas segmentares, afundamentos, pseudoartroses, processos infecciosos ósseos, osteomielites, osteólises, cistos e tumores, laminectomias, artrodeses, inclusive vertebrais, osteotomias, reparações estéticas, entre outras. É, portanto, um material que se mostra promissor no reparo de defeitos ósseos críticos e não críticos (biocerâmica, 2011).

A biocerâmica de fosfato de cálcio bifásico micro-macro porosa nano estruturada composta de 65% HÁ e 35% de β -TCP foi utilizada por Lobo *et al.* (2009) para preencher defeito de 5mm de diâmetro no fêmur de coelhos Nova Zelândia, machos, adultos, seguindo-se avaliações por 90 dias. Os achados histológicos mostravam aos 15 dias, tecido ósseo em torno e dentro dos grânulos da biocerâmica nas regiões cortical e medular. Havia aos 30 dias, maior organização do osso compacto e manutenção do mesmo padrão de distribuição, apesar da presença de células adiposas circundando o complexo. Aos 90 dias, verificou-se maior quantidade de tecido adiposo e tecido ósseo bem organizado em torno e dentro dos grânulos. No grupo sem biocerâmica os autores observaram aos 15 dias, na cortical, defeito preenchido por coágulo mostrando ilhas de tecido ósseo sem orientações, com muitos vasos sanguíneos no tecido adiposo, na região medular. Aos 30 dias a região cortical mostrava camadas interrompidas de tecido ósseo, O padrão foi mantido aos 90 dias com tecido adiposo ocupando parte da região cortical.

Lobo *et al.* (2009) e Lobo e Arinzeh (2010). Relataram presença de canais de Havers e osteócitos dispostos longitudinalmente ao longo do osso enquanto o canal medular era completamente composto por tecido

adiposo. Aos 15 dias, o grupo controle mostrava defeitos preenchidos por coágulo sanguíneo, apresentando pequenas ilhas de tecido ósseo sem nenhuma orientação definida na região cortical, e muitos vasos sanguíneos na região medular. Aos 30 dias, a região cortical apresentava uma camada contínua de tecido ósseo. Esse padrão foi mantido até os 90 dias, com o tecido adiposo ocupando parte da região cortical. No grupo tratado, aos 15 dias, foi observado tecido ósseo em volta e no interior dos grânulos de cerâmica, em regiões corticais e medulares. Aos 30 dias, as amostras apresentaram um padrão de tecido ósseo compacto mais organizado na região cortical. No canal medular, o tecido ósseo se manteve com o mesmo padrão de distribuição (na periferia e dentro dos grânulos). Aos 90 dias, observou-se mais tecido adiposo na região medular, mas, foi observado também tecido ósseo bem organizado ao redor e dentro dos grânulos inteiros da biocerâmica

Estudo radiográfico.

A radiografia é um exame complementar essencial para o estudo das afecções que acometem o sistema osteoarticular. Além de propiciar informações diagnósticas permite acompanhar a evolução do processo. Algumas afecções necessitam de um razoável tempo para se manifestarem radiograficamente, é o tempo necessário para que as reações ósseas promovam alterações da densidade do tecido, mesmo o paciente apresentando sinais clínicos precoces (Godoy *et al.*, 2010).

Para a avaliação radiográfica apropriada da condição osteoarticular, são necessárias pelo menos duas projeções em incidências padronizadas (craniocaudal, dorsopalmar / dorsoplantar e mediolateral). É importante o conhecimento da posição dos centros de ossificação e o período em que as linhas epifisárias se fecham (Godoy *et al.*, 2010).

Densitometria óssea.

A avaliação da densidade mineral óssea é um parâmetro biofísico de grande importância experimental e clínica, podendo auxiliar o profissional da área da saúde a compreender e avaliar melhor o processo de mineralização óssea (Louzada *et al.*, 1990). Na medicina humana e veterinária diferentes técnicas tem sido utilizadas para a determinação da densidade óssea mineral. Algumas doenças, tais como osteoporose, osteopenia, e osteocondrose foram estudadas por meio da densitometria óssea em cães, coelhos, bovinos, cavalos e seres humanos (Louzada *et al.*, 1990).

OBJETIVOS.

Objetivo geral:

Estudar o efeito da biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturado micro-macro porosa em grânulos (HA/ β -TCP) no tratamento de defeito ósseo crítico experimental em coelhos.

Objetivos específicos:

- Determinar as características e propriedades estruturais da HA/ β -TCP, mediante avaliações de microscopia eletrônica de varredura.
- Estudar a resposta óssea induzida pela HA/ β -TCP porosa em grânulos.
- Avaliar o efeito da HA/ β -TCP em defeitos ósseos críticos experimentais, mediante avaliações clínicas, radiográficas, histológicas, e por densitometria óssea.

HIPÓTESE.

O emprego da HA/ β -TCP porosa em grânulos permite o reparo de defeito ósseo crítico experimental em rádio de coelhos.

MATERIAL E MÉTODOS.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, como consta no protocolo N° 275/2010 (em anexo).

Animais.

Foram utilizados 70 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia brancos, machos, adultos jovens com massa corporal média de 2,5 – 3,0 Kg, clinicamente saudáveis, adquiridos na fazenda Experimental Prof. HELIO BARBOSA - Universidade Federal de Minas Gerais, localizada no município de Igarapé-MG.

Os animais foram mantidos por duas semanas em gaiolas individuais de arame galvanizado medindo 60x60x37 cm, no Laboratório de Metabolismo Animal da Escola de Veterinária da UFMG, em Belo Horizonte, quando foram avaliados mediante o exame clínico geral e laboratorial (hemograma) e submetidos a avaliações radiográficas de controle.

Biocerâmicas.

As biocerâmicas bifásicas à base de fosfatos de cálcio foram produzidas e gentilmente cedidas pela empresa EINCO Biomaterial Ltda. (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

Dois tipos de biocerâmicas foram avaliados: cerâmica em grânulos de absorção lenta (*CGAL*) e cerâmica em grânulos de absorção moderada (*CGAM*). Os grânulos eram de 40-60 mesh com aproximadamente 1,0 mm em seu maior diâmetro.

Caracterização das biocerâmicas por microscopia eletrônica de varredura.

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para a análise da topografia de superfície e da presença de poros nas

biocerâmicas estudadas. Para isto foi tomado um grama de cada uma das amostras das biocerâmicas de absorção lenta e moderada em grânulos de 40-60 mesh, que foram encaminhadas ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (CM-UFMG).

As amostras foram montadas nos “stubs” usando fita de carbono e procedeu-se a metalização das mesmas com ouro, 3nm de espessura. Uma vez metalizadas as amostras foram analisadas ao microscópio eletrônico de varredura, para documentação. Utilizou-se o Microscópio Eletrônico de Varredura - JEOL JSM - 6360LV com detector de elétrons secundários, detector de elétrons retroespalhados para alto e baixo vácuo, detector de EDS (espectrômetro de raios-X de energia dispersiva) e detector de EBSD (difração de elétrons retroespalhados).

Implantação das biocerâmicas.

No pré-operatório os coelhos receberam, pela via intravenosa, 30mg/Kg de cefalotina como antibiótico profilático, 30 minutos antes do procedimento. A anestesia foi induzida com injeção intramuscular, na região glútea, de 20mg/Kg de Cloridrato de Cetamina e 2,5mg/Kg de Cloridrato de Xilazina. Logo após, foi feita a tricotomia ampla dos membros torácicos direito e esquerdo desde a região da escápula até a articulação metacarpofalangeana. Para a manutenção anestésica foi utilizada anestesia inalatória com isoflurano, mediante o emprego de tubo endotraqueal número 2 sem cuff, na dose de manutenção de 1-3% segundo a necessidade. Durante todo o período anestésico foram monitoradas as frequências cardíaca e respiratória e fluidoterapia de apoio foi feita com solução de cloreto de sódio a 0,9%.

Uma vez posicionados em decúbito esternal com os membros anteriores estendidos, foi realizada antisepsia simultânea de ambos os membros com solução de

iodopolivinilpirrolidona (PVPI) degermante seguida por solução alcoólica de iodo a 2% desde a articulação escápulo-umeral até a articulação metacarpofalangeana, seguindo-se a colocação dos panos de campo.

Foram operados os rádios direito e esquerdo simultaneamente. Os membros constituíram os grupos de estudo, denominados GI, GII e GIII. No grupo I o defeito foi preenchido com a biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturado micro-macro poroso em grânulos de absorção lenta com dimensão de 40-60 mesh e no grupo II, com a biocerâmica de absorção moderada. No grupo III (GIII) o defeito permaneceu vazio e constituiu o grupo controle negativo. A abordagem ao rádio foi feita segundo preconizado por Piermattei e Flo (1997). Após a exposição do rádio e da ulna, seguiu-se a ostectomia realizada com o emprego de uma serra pneumática sob irrigação constante com solução fisiológica estéril (Fig. 6). Foi removido um fragmento ósseo de duas vezes o diâmetro do terço médio do rádio, cuja mensuração foi feita no momento da cirurgia, mediante o emprego de um paquímetro. A ulna foi preservada. Para a estabilização do rádio foram empregadas mini placas ósseas de titânio de 2 mm com seis furos, fixadas com dois parafusos de 2 mm de diâmetro em cada fragmento. Os orifícios adjacentes à linha de ostectomia permaneceram vazios. Em seguida o defeito ósseo foi preenchido ou não segundo o grupo experimental. Seguiu-se a sutura de cada um dos diferentes planos cirúrgicos (fáscia, subcutâneo e pele). A fáscia e o tecido subcutâneo foram aproximados com fios absorvíveis de ácido poliglicólico 5-0, em padrão simples contínuo. A dermorrafia foi realizada por pontos simples separados com náilon monofilamentar 5-0. Em ambos os membros operados foi feita uma bandagem de proteção com atadura cobam, por dois dias. Após as cirurgias, os animais foram mantidos em gaiolas individuais de 60x60x37 cm, no laboratório de metabolismo animal da Escola de

Veterinária da UFMG. Realizaram-se avaliações clínicas diariamente durante os 10 primeiros dias, tempo no qual foram observados: aumento de volume, temperatura local, estabilidade óssea e deambulação.

Avaliação radiográfica.

As radiografias foram feitas no setor de diagnóstico por imagem do Hospital Veterinário da UFMG. Foram realizadas radiografias dos membros torácicos direito e esquerdo em duas incidências: mediolateral e craniocaudal. Para isto foi utilizado o aparelho de Raios X digital REGIUS modelo 110 de 500 mA. com 43 Kvs, 200mA e tempo de exposição de: 0,4seg.

As avaliações radiográficas foram realizadas antes da cirurgia (tempo zero), imediatamente após (tempo um), aos oito dias (tempo dois), 15 dias (tempo três), 30 dias (tempo quatro), 45 dias (tempo cinco), 60 dias (tempo seis), 90 dias (tempo sete) e 120 dias (tempo oito). Foram avaliadas a densidade óssea na região do defeito, presença da linha de ostectomia, reação periosteal e a evolução do processo de reparação óssea.

Estas avaliações foram feitas em duplo cego com três avaliadores distintos que desconheciam o tempo de realização do exame e o grupo experimental. Para isto foi colocado um número aleatório (1-70) e com o auxílio de um escore (Quadro 3), foi quantificada a evolução do processo de consolidação óssea.

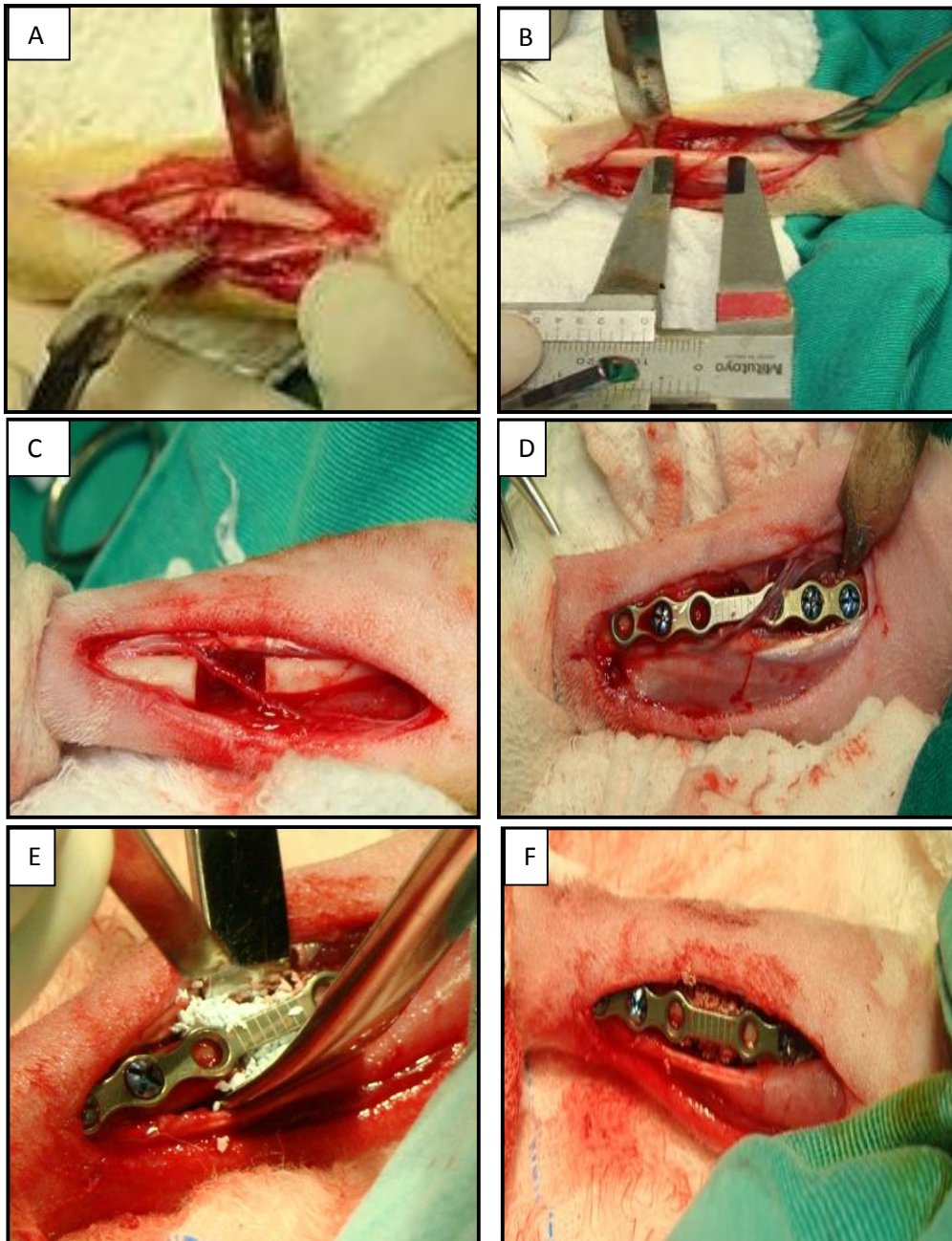


Figura 6. Representação fotográfica dos momentos cirúrgicos. (A) exposição do rádio, (B) mensuração do comprimento do defeito crítico, (C) defeito crítico, (D) mini placa óssea posicionada e implantada, (E) implantação da biocerâmica e (F) material já posicionado no defeito sob a mini placa óssea.

CATEGORIA	ESCORE	ESPECIFICAÇÕES
Reação periosteal. (RP)	0 Ausente 1 Discreto 2 Moderado 3 Exuberante	Não existe reação. Menor a 30% do fragmento ósseo. Entre os 30 – 60% do fragmento ósseo. Ultrapassa os 60% do fragmento ósseo.
Formação de calo ósseo. (FCO)	0 Ausente 1 Discreto 2 Moderado 3 Exuberante	Não existe formação de calo ósseo. Longitudinalmente é menor do que os 30% do fragmento ósseo e/ou transversalmente é menor do que os 50% do diâmetro do osso. Longitudinalmente está entre os 30 - 60% do fragmento ósseo e/ou transversalmente está entre os 50 -100% do diâmetro do osso. Longitudinalmente ultrapassa os 60% do fragmento ósseo e transversalmente é maior do que o diâmetro do osso.
Formação de ponte óssea. (FPO)	0 Ausente 1 Discreto 2 Moderado 3 Exuberante	Visão nítida de linha radiolucida bilateral. Visão de linha radiolucida pouco definida bilateralmente. Visão de linha radiolucida parcial e pouco definida. O calo óssea esta completamente definido bilateralmente.
Remodelação óssea. (RO)	0 Ausente 1 Discreta 2 Moderada inicial 3 Moderada avançada 4 Total	Calo ósseo com superfície irregular. Superfície do calo regular. Discreto calo ósseo com radiopacidade aumentada. Discreto calo ósseo com radiopacidade similar ao osso e/ou visibilização do canal medular. Ausência de calo ósseo.

Quadro 3. Escore de avaliação radiográfica para consolidação de osteotomia experimental. (Fonte: Sanchez, 2010).

Para a análise estatística utilizou-se a média dos valores registrados. Reação periosteal, formação de calo ósseo, formação de ponte óssea e remodelação óssea foram os parâmetros semi-quantitativos usados para a avaliação. Cada avaliador recebeu duas tabelas, uma delas com o escore e as especificações de cada categoria (Quadro 3) e outra com o código da radiografia onde era registrado o escore (Öztürk *et al.*, 2008).

Densitometria Óssea.

A densidade mineral óssea (DMO), em g/cm^2 , o conteúdo mineral ósseo (CMO), em g, e a área em cm^2 foram examinados em todos os raios. A avaliação densitométrica foi realizada aos 8, 15, 30, 45, 60,90 e 120 dias, após a eutanásia em todos os animais, objeto do estudo. Utilizou-se o densitômetro de dupla emissão de raios – X (DXA), modelo DPX-ALPHA LUNAR de

propriedade do Laboratório de Biofísica, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba / UNESP. (Fig. 7).



Figura 7. Densitômetro de dupla emissão de raios X (DXA) modelo DPX-ALPHA LUNAR.

Os ossos foram agrupados em blocos de seis, posicionados crânio-caudalmente sobre a superfície da mesa do densitômetro e

alinhados com o feixe de luz do laser do aparelho. Para isto, foi empregada uma bandeja cuja superfície possui uma graticula que permite o correto posicionamento das amostras e seu alinhamento com o feixe dos raios-X (Fig. 8).

Uma vez posicionados os ossos, foram introduzidos os dados dos animais na configuração do densitômetro para então iniciar a avaliação.

Após a varredura foi obtida uma imagem radiográfica de alta definição do osso e da área do defeito. A área de estudo foi então delimitada mediante o mesmo *software* para determinar a DMO (Fig. 9).

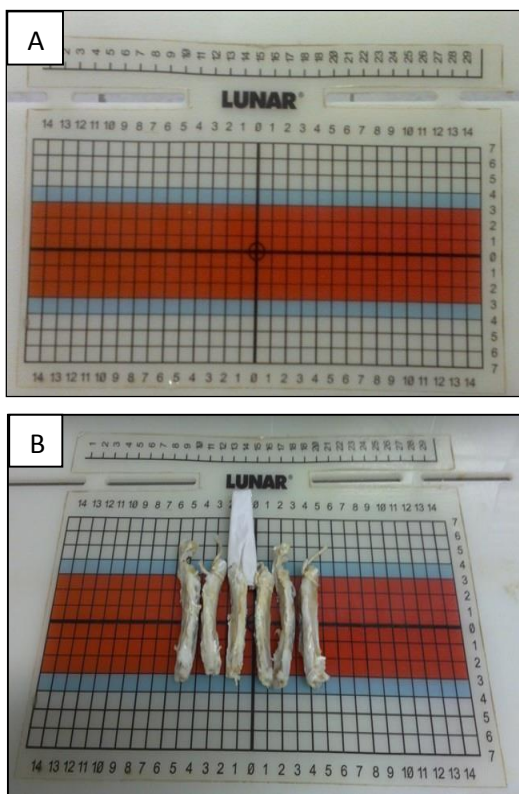


Figura 8. (A) Fotografia da graticula empregada no posicionamento dos ossos na mesa do densitômetro ósseo, (B) fotografia dos ossos posicionados sobre a graticula prontos para serem escaneados no densitômetro ósseo.

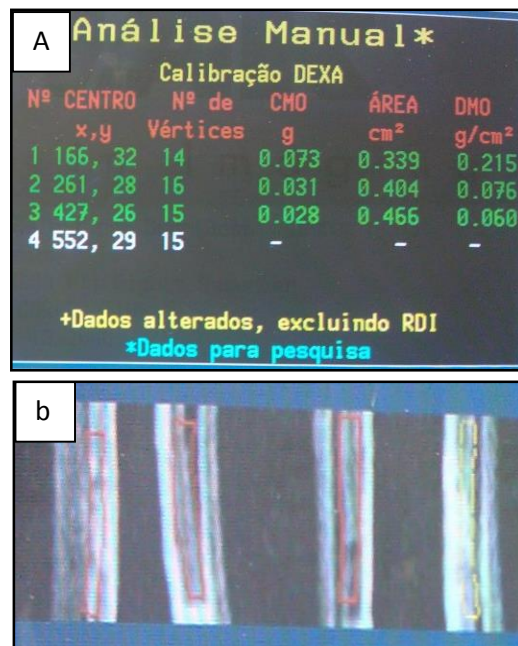


Figura 9. Fotografias da tela do computador durante o processamento das análises densitométricas. (A) fotografia com os dados obtidos depois das análises feitas pelo software. (B) imagem da densitometria, observa-se a área delimitada (quadro vermelho) no osso representando a área objeto do estudo.

As avaliações estatísticas foram feitas comparando o desempenho de cada um dos tratamentos ao longo do tempo. Foram obtidas a média e o desvio padrão da DMO observados nos diferentes grupos de tratamentos. Estes valores foram analisados pelo teste de Tukey com uma significância de ($p < 0,05$).

Microscopia eletrônica do osso.

A análise do osso por microscopia eletrônica de varredura foi limitada aos tempos finais do estudo, 60, 90 e 120 dias e as imagens foram analisadas no centro de microscopia da UFMG e comparadas com as obtidas na microscopia ótica.

Após a eutanásia, foram colhidas amostras ósseas que foram processadas seguindo-se os protocolos desenvolvidos no CM-UFMG.

As amostras constituíram-se de fragmentos ósseos do rádio direito e esquerdo, de cerca de 2 cm de comprimento compreendendo a região do defeito (1 cm) e 0,5 cm além da linha de osteotomia proximal e distal. As amostras foram acondicionadas em placa de 12 *wells* e cobertas com fixador primário modificado: * Karnovsky (2,0% paraformaldeído e 2,5% glutaraldeído), em tampão fosfato 0,1M, overnight. O fixador foi removido e as amostras foram lavadas três vezes (10 minutos) em tampão fosfato 0,1M. Em seguida foi realizada a pós-fixação das amostras no fixador secundário** por 1 hora; (**tetróxido de ósmio 1,0%). Logo depois foram lavadas novamente por três vezes (10 minutos) em tampão fosfato 0,1M. Posteriormente, procedeu-se a imersão das amostras em ácido tânico 1% em tampão fosfato 0,1M por 20 minutos. Em seguida, foram lavadas novamente por três vezes (10 minutos) em tampão fosfato 0,1M, seguindo-se a imersão no fixador secundário** por 1 hora; (**tetróxido de ósmio 1,0%). Imediatamente após, as amostras foram lavadas por três vezes (10 minutos) em água destilada. Uma vez lavadas, as amostras foram desidratadas em solução crescente de álcool etílico 35%, 50%, 70%, 85%, 95% (10 minutos) e 100% (três vezes -10 minutos). Seguiu-se, então, a secagem das amostras no ponto crítico de CO², utilizando-se a mesma metodologia já descrita anteriormente para a microscopia eletrônica da biocerâmica.

Análises histológicas

As avaliações histológicas foram realizadas aos oito (tempo 1), 15 (tempo 2), 30 (tempo 3), 45 (tempo 4), 60 dias (tempo 5), noventa (tempo 6) e cento e vinte dias (tempo 7). Os animais foram submetidos à eutanásia por sobre dose anestésica com tiopental sódico, após sedação com 40 mg/Kg de cloridrato de cetamina.

Após a remoção dos tecidos moles, o terço médio do rádio foi colhido numa extensão de

cerca de 5 mm além do defeito ósseo. Este material foi fixado por 48 horas em formalina a 10% tamponada. Posteriormente, cada fragmento foi envolvido em gaze e identificado para descalcificação em ácido fórmico a 50%, durante 20 dias. A solução era trocada a cada 48 horas até a comprovação radiográfica de completa descalcificação do tecido.

Após a descalcificação, as amostras foram lavadas por 24 horas em água corrente, foram posteriormente desidratadas em álcoois de concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, absoluto 1, absoluto 2), permanecendo duas horas em cada um deles. Após a desidratação, os fragmentos foram diafanizados em xilol por duas horas, embebidos em parafina líquida por duas horas e incluídos em blocos de parafina. As amostras foram coradas com Hematoxilina-Eosina segundo o procedimento padrão para observação por microscopia óptica de luz.

A análise das amostras foi realizada no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Na avaliação microscópica descritiva foram considerados a presença e o tipo de tecido no defeito e na interface.

RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Neste estudo, o coelho como modelo experimental foi satisfatório com as vantagens da maior facilidade de manipulação e manejo, menor custo da pesquisa e menor tempo de obtenção de resultados, vantagens já relatadas por An *et al.*, (1999). Apesar de o esqueleto do coelho ser mais frágil do que os de outras espécies (Mader, 1997), o coelho é um dos animais mais comumente empregados em pesquisas ortopédicas, superando outras espécies experimentais como camundongos, ratos, cabras e cães (An e *et al.*, 1999; An e Friedman, 1999). A docilidade da espécie, especificamente a Nova Zelândia, e seu pequeno porte contribuíram para facilitar o

manejo dos animais para a realização dos exames clínicos e radiográficos, assim como as colheitas de sangue e urina realizadas no início do experimento.

A análise da topografia de superfície dos biomateriais, realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciou em todas as biocerâmicas analisadas superfície nano estruturada macro poros

acima de 100 μ m e micro poros de até 10 μ m de diâmetro (Fig. 10).

As avaliações radiográficas realizadas ao longo do experimento possibilitaram o acompanhamento da evolução de todo o processo de reparação óssea. A sedação facilitou o posicionamento dos coelhos para a execução dos exames radiográficos

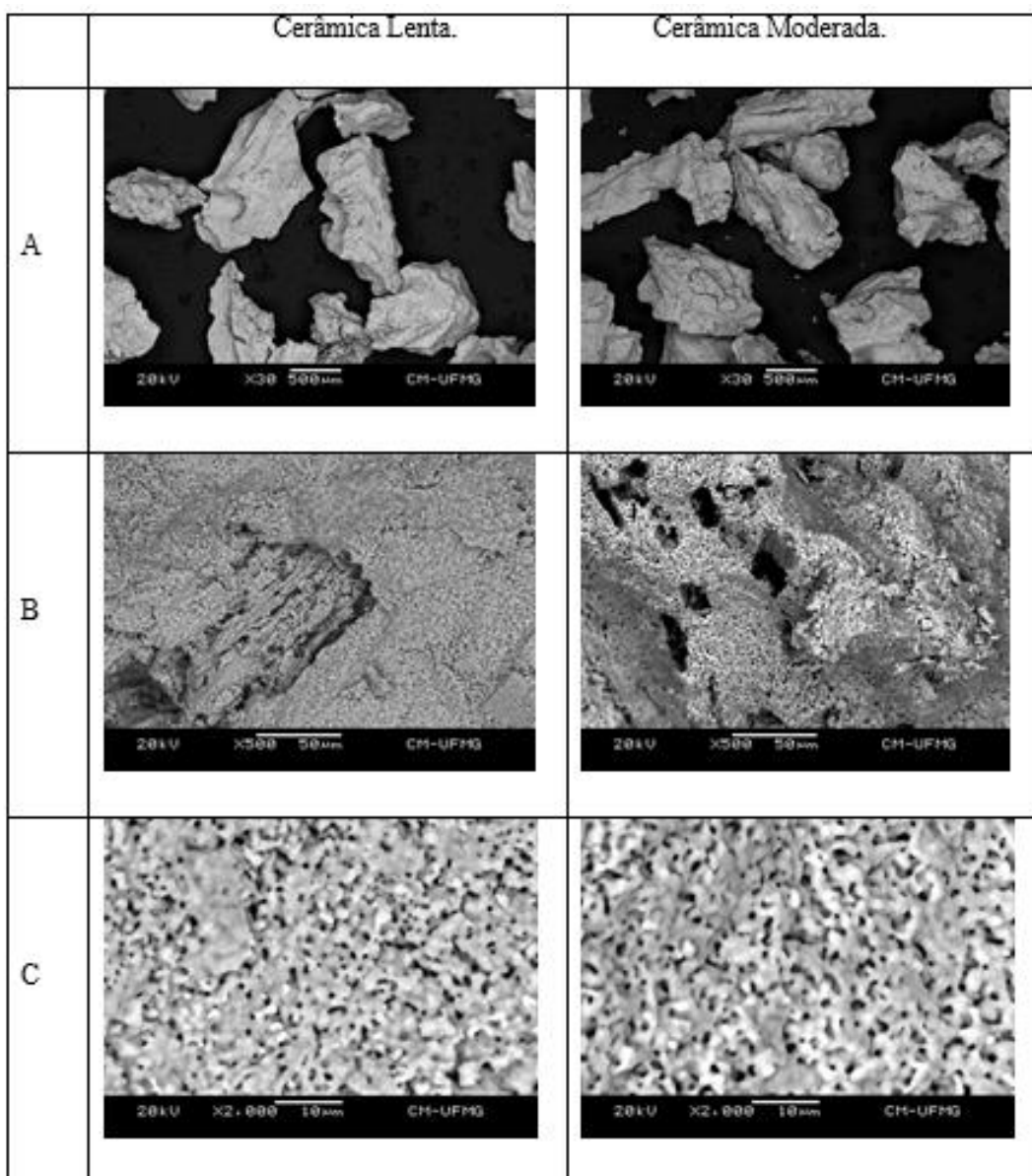


Figura 10. Fotografias da microscopia eletrônica de varredura mostrando os grânulos das biocerâmicas de absorção lenta e de absorção moderada. Na linha A, observa-se a macro estrutura das partículas de 40-60 *mesh*; Na linha B, observa-se a macro porosidade das partículas das biocerâmicas. Na linha C, observam-se os micro poros presentes nos grânulos das biocerâmicas.

No pós-operatório imediato, verificou-se radiograficamente em todos os animais o adequado posicionamento da mini placa óssea e dos quatro parafusos, assim como a biocerâmica implantada no defeito crítico (fig. 11B). A apresentação granulada do produto dificultou sua deposição unicamente no defeito, contribuindo para a disseminação no tecido mole adjacente, como observado nas avaliações radiográficas. Mas, notou-se também já aos oito dias, redução deste material fora do defeito, sugerindo reabsorção como também mencionado por Yamamoto *et al* (2000) e Vital *et al* (2006).

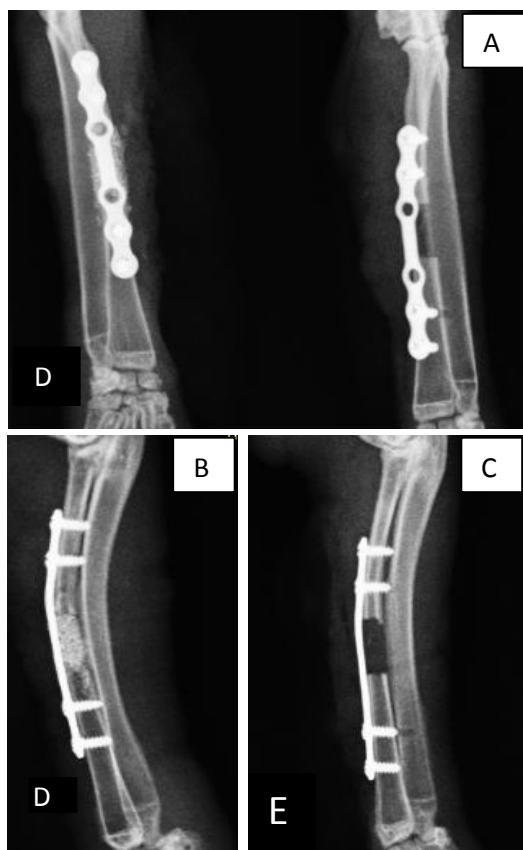


Figura 11. Imagem fotográfica das radiografias dos rádios dos coelhos no pós-cirúrgico imediato. Observa-se a ostectomia do rádio e o defeito crítico, a mini placa óssea e os seus parafusos, assim como o material implantado e o defeito crítico vazio (controle negativo). (A) incidência craniocaudal e mediolateral oblíqua dos rádios operados, (B) incidência mediolateral do rádio direito com a biocerâmica, (C) incidência mediolateral do rádio esquerdo com o defeito crítico vazio, controle negativo.

Aos oito dias (35 animais), verificou-se em todos os animais dos grupos I (biocerâmica lenta) e II (biocerâmica moderada) uma maior radiopacidade do material ao se comparar com o osso receptor e delimitação dos grânulos da cerâmica no defeito ósseo. Neste mesmo tempo, na avaliação densitométrica verificou-se que ambos os grupos tratados GI e GII apresentavam maior DMO em relação ao grupo GIII, fato observado também nas radiografias, traduzido pela maior densidade dos grânulos das biocerâmicas. Radiograficamente observou-se ainda, corticais e canal medular bem definidos, assim como ampliação da interfase biocerâmica ostectomia, processo considerado normal nesta fase do processo de consolidação. Os demais escores avaliados no estudo radiográfico foram mantidos em zero, com as imagens semelhantes àquelas do pós-cirúrgico imediato (fig. 12). Na avaliação histológica aos oito dias, verificou-se no grupo GI, tecido de granulação, presença de matriz orgânica não mineralizada nas bordas do defeito crítico e proliferação óssea a partir do periósteo ulnar em direção ao defeito. Já no GII, além do tecido de granulação também se observou formação de tecido ósseo de aspecto trabecular, sobre o qual havia proliferação endosteal com células osteoblásticas (Fig. 13). As bordas do defeito já não eram visíveis e havia presença de pequenos ninhos cartilaginosos provenientes da ulna. No grupo controle, nesta mesma data, a falha permaneceu sem alterações na radiopacidade, ou seja, sem presença de neoformação óssea. Segundo Borges (1998) e Fehlberg (2001), em todo processo de reparação óssea, desenvolve-se inicialmente um tecido de granulação no foco da lesão, cuja radiopacidade é insuficiente para ser perceptível ao exame radiográfico, devido ao baixo número atômico dos constituintes químicos do tecido neoformado. No GIII, neste mesmo tempo, foram observados os seguintes achados na histologia, além da presença do tecido de granulação o defeito também

estava preenchido por tecido fibroso e em alguns casos com restos de fibras musculares com as bordas ainda evidentes. Estes

achados foram já mencionados na literatura em estudos semelhantes, Borges (1998), Fehlberg (2001) e Vital *et al.*, (2006).

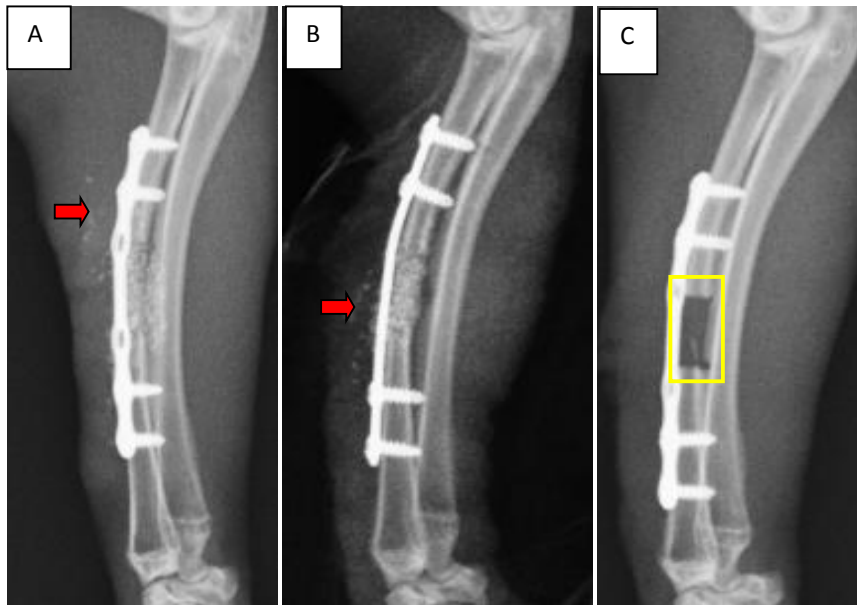


Figura 12. Imagem fotográfica das radiografias dos rádios de coelhos após oito dias. (A) vista mediolateral do rádio direito implantado com a biocerâmica de absorção lenta. Nota-se a presença do material ultrapassando os limites do defeito ósseo (seta vermelha). (B) vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica de absorção moderada; a seta vermelha indica a presença do material no tecido adjacente. (C) vista mediolateral do rádio esquerdo com o defeito crítico vazio (controle negativo) (quadrado amarelo).

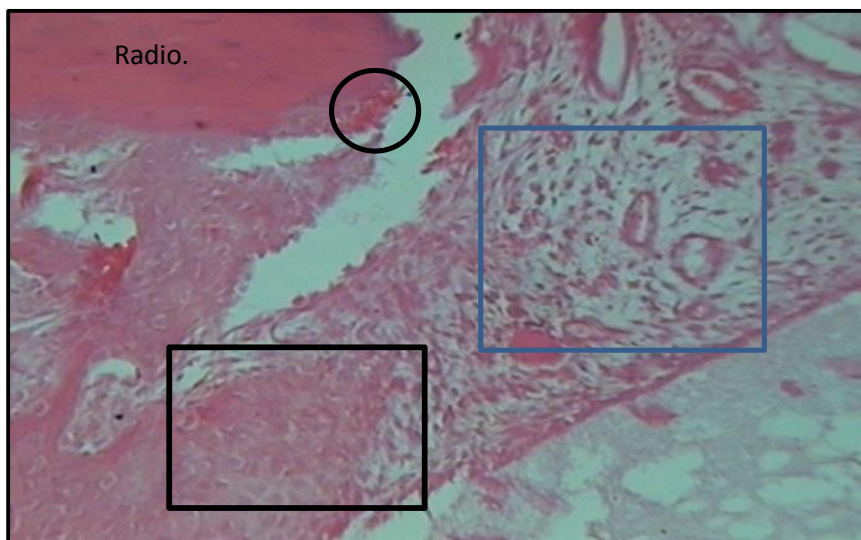


Figura 13. Fotografia de microscopia ótica aos oito dias. Observa-se tecido de granulação (quadrado azul) assim como presença de matriz orgânica não mineralizada nas bordas do defeito crítico (circulo preto), há formação de tecido ósseo de aspecto trabécular, sobre se observa proliferação endosteal com células osteoblásticas (quadrado preto) (Hematoxilina-Eosina; 4x).

Aos 15 dias (30 animais), verificou-se na avaliação radiográfica, reação periosteal nos extremos da mini placa óssea em todos os grupos, ocorrendo em seis animais (20%) do GI, em 10 (33,3%) do GII e em 5 (16,6%) do GIII, principalmente no segmento distal com cerca de 1,0 cm de extensão por 3,0 mm de altura, classificado com escore 1. Esta reação pode ser atribuída ao trauma cirúrgico para a exposição óssea e justaposição da placa. Em um animal do GIII havia opacidade no defeito a partir das linhas de osteotomia, mais evidente no segmento distal do rádio, sugerindo neoformação óssea centrípeta (Fig. 14). No grupo GI, oito animais apresentaram calo ósseo adjacentes á as linhas de osteotomia do segmento proximal e caudal do rádio com escore um (26,6%) e três animais com escore dois (10%), perfazendo um total de 36% da população avaliada neste período de tempo.

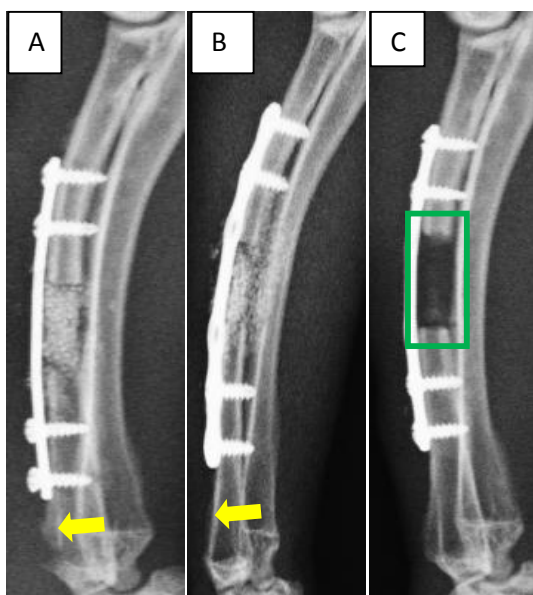


Figura 14. Imagem fotográfica das radiografias dos rádios de coelhos aos 15 dias pós-cirurgia. Observa-se: (A) vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica de absorção lenta. Observa-se a presença de reação periosteal discreta (escore um) (seta amarela); (B) vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica de absorção moderada; nota-se a presença de reação periosteal avaliada como discreta (escore um) (seta amarela). (C) vista mediolateral do rádio esquerdo com o defeito crítico vazio, observa-se um aumento na radiopacidade no defeito (controle negativo).

No grupo GII, apenas três animais apresentavam sinais radiográficos de formação de calo ósseo, com escore um, sendo equivalente a 10% do total da população. No grupo GIII, havia ponte óssea em quatro animais, sendo três avaliados com escore um (10%) e um animal, com escore três (3,3%). Neste mesmo período de tempo (15 dias), observou-se histologicamente no GI, formação de tecido ósseo imaturo entremeado nos grânulos da cerâmica, com proliferação osteoblástica intensa, assim como resposta hiperplásica do periósteo ulnar. No GII era evidente a formação de tecido ósseo assim como a osteointegração desse novo tecido ósseo com as bordas do defeito, presença de túneis vasculares no interior do implante, assim como pequenos focos cartilagosos no centro do defeito (Fig. 15). A presença de ninhos cartilagosos desorganizados entremeando o implante pode ser explicada pelo grande tamanho do defeito. Este tipo de formação óssea foi descrita por Webb e Tricker, (2000) e Flach et al. (2002). Os achados histológicos corroboram os dados obtidos na densitometria onde aos 15 dias verificou-se um aumento na DMO em ambos os grupos tratados, sendo mais evidente no GII, mas sem diferença significativa ao ser comparado com o GI (Graf. 1). Já no GIII (grupo controle), ainda havia presença de tecido de granulação e tecido conjuntivo fibroso, angiogênese acentuada e escassa presença de osteoclastos, como descrito por Borges (1998), Borges et al. (2000), Vital *et al.*, (2006), Lobo *et al* (2009), Lobo e Arinzeh (2010) e Lobo (2011). Aos 30 dias (25 animais) verificou-se em todos os animais do grupo GI (biocerâmica lenta), similaridade da densidade entre a biocerâmica e o osso. Reação periosteal discreta (escore um) nos extremos da mini placa óssea foi observada em sete animais representando 28 % da amostra e reação periosteal moderada (escore dois) em quatro, equivalentes a 16%. Em 60% dos animais do grupo GI havia formação de calo ósseo

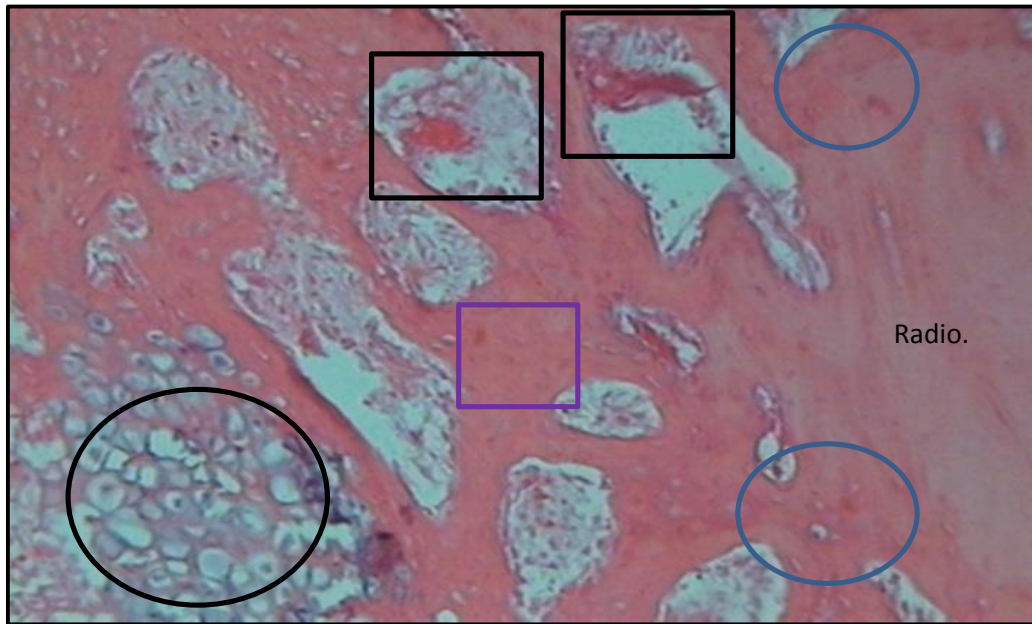


Figura 15. Fotografia de microscopia ótica aos 15 dias, animal pertencente ao grupo GII. Observa-se evidente a formação de tecido ósseo (quadrado roxo) assim como a osteointegração desse novo tecido ósseo com as bordas do defeito (círculos azuis), presença de túneis vasculares no interior do implante (quadrados pretos), assim como pequenos focos cartilaginosos no centro do defeito (círculo preto), (Hematoxilina-Eosina, 10X).

cortical discreto, na linha de osteotomia proximal no segmento distal, escore um (44%) e moderado escore dois (16%). Ponte óssea estava presente em 10 animais constituindo 44%, com continuidade da cortical caudal, mas com presença de tênue linha de osteotomia no segmento cranial do defeito. Observou-se em um animal (4%) sinais radiográficos de remodelação óssea discreta (escore um). No grupo GII, 48% dos animais apresentaram reação periosteal adjacente aos extremos da placa, de contorno irregular com escore um, 20% (5) formação de calo ósseo cortical na linha de osteotomia proximal e 56% da população apresentavam ponte óssea, sendo 52% classificados com escore um e apenas um animal com escore dois. Neste grupo observou-se também em dois animais (8%) sinais radiográficos de remodelação óssea (escore um). Também verificou-se um animal com calo ósseo cortical discreto (escore um). Neste mesmo período de tempo a avaliação densitométrica mostrou uma pequena diferença nos valores da DMO entre os grupos tratados, sendo maior no GI,

porém, sem diferença significativa. Isto pode ser devido provavelmente à diferença nas porcentagens de HA e β -TCP, já que a biocerâmica moderada possui na sua composição 40% β -TCP e 60% HA, enquanto a lenta é constituída por 20% β -TCP e 80% HÁ. Já no grupo GIII 56% dos animais apresentavam reação periosteal adjacente aos extremos da placa, sendo discreta em 13 (52%) com extensão máxima de 8 mm e 3 mm de altura (escore um). Apenas dois animais apresentavam sinais de reação periosteal moderada, constituindo 4% da população. Neste grupo não foi observado formação de calo ósseo. 60% dos animais apresentavam ponte óssea representada por crescimento ósseo preenchendo grande parte do defeito, porém sem atingir a superfície em contato com a mini placa óssea, sendo 13, (52%) escore um (52%) e dois animais (8%) escore dois. Neste mesmo grupo (GIII) um animal (4%) evidenciava sinais radiográficos de remodelação óssea classificado com escore um. (Fig. 16D).

Neste mesmo período de avaliação (30 dias), a análise histológica mostrou que nos animais do GI já não eram evidentes as bordas dos segmentos proximais e distais do rádio, com presença de matriz óssea não mineralizada (osteóide) e de osteoblastos ativos adjacentes à borda óssea, indicando osteointegração. Todavia era evidente a presença da cerâmica e de tecido fibroblástico assim como acentuada angiogênese. Havia também presença de tecido ósseo imaturo de aspecto trabecular. Nos animais do GII observou-se presença significativa de tecido ósseo imaturo, com numerosas células osteoblásticas.

Ocasionalmente observou-se presença de fibras musculares, possivelmente originadas de células tronco provenientes da medula óssea ou do tecido adjacente. Também foi evidente a presença da cerâmica no local do implante assim como a presença de vasos sanguíneos de grande calibre (Fig. 17), o que está de acordo com o mencionado por Vital *et al.*, (2006). No GIII, verificou-se mínima evidência de crescimento de tecido ósseo a partir das bordas do rádio, observando-se no defeito a presença de tecido fibroso, adiposo e fibras musculares, como descrito e relatado por Lobo *et al* (2009), Lobo e Arinze (2010) e Lobo (2011).

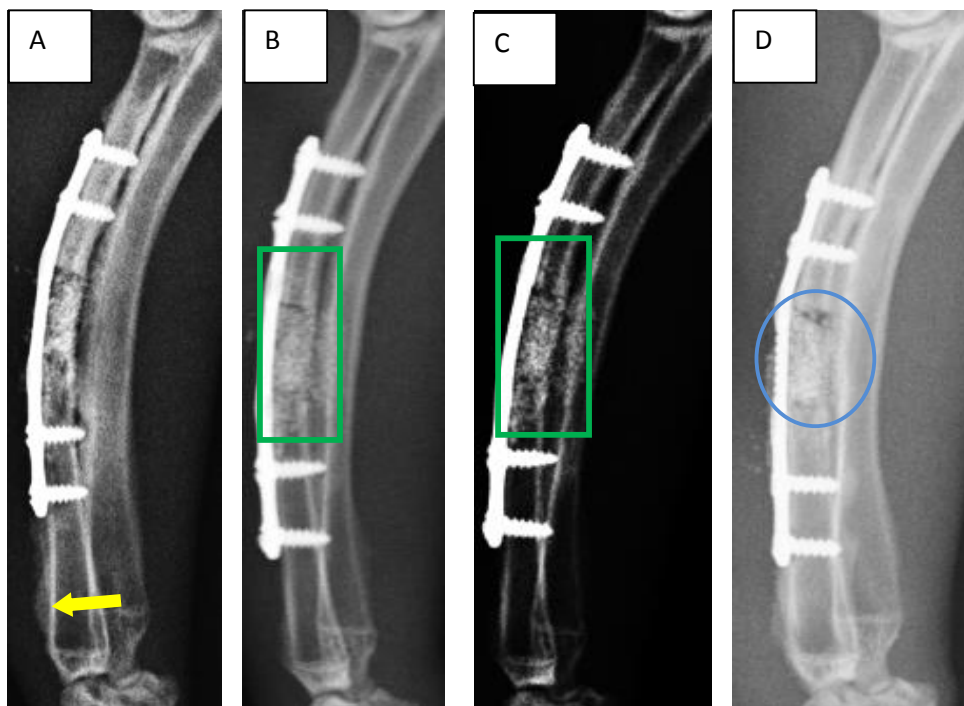


Figura 16. Imagem fotográfica das radiografias dos rádios de coelhos aos 30 dias. Observa-se: (A) vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica de absorção lenta. Observa-se a presença de reação periosteal discreta (escore 1) (seta amarela); (B e C) vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica de absorção lenta. Observa-se a formação de ponte óssea discreta (escore 1) (retângulo verde), (D) vista mediolateral do rádio direito com presença de calo ósseo discreto (escore 1) GII.

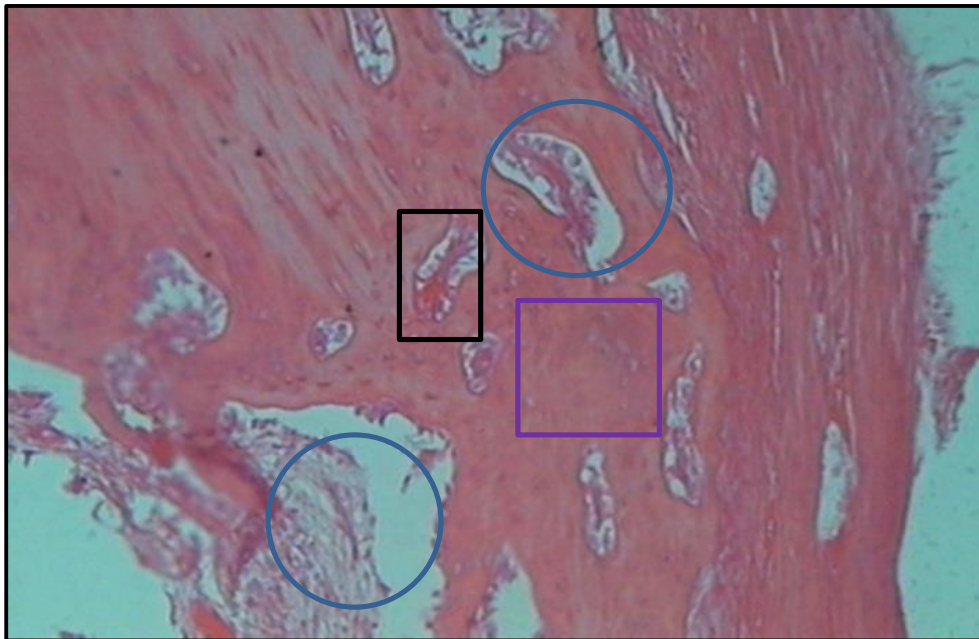


Figura 17. Fotografia de microscopia ótica aos 30 dias, animal pertencente ao grupo GII. Observa-se presença significativa de tecido ósseo imaturo (quadrado roxo), com numerosas células osteoblásticas. Também foi evidente a presença da cerâmica no local do implante (círculos azuis) assim como a presença de vasos sanguíneos de grande calibre (retângulo preto) (Hematoxilina-Eosina, 10X.)

Aos 45 dias (20 animais) de estudo verificou-se continuidade das corticais distal e proximal no segmento caudal, com radiopacidade semelhante a do osso receptor nos grupos GI e GII. Neste tempo de observação, 70% dos animais do GI mostravam ponte óssea discreta (escore um) e um animal (5%), ponte óssea moderada (escore dois). No grupo GII, 75% dos animais apresentavam ponte óssea, sendo 30% escore um, e os demais 45%, escore dois. Em 25% dos animais avaliados neste período havia remodelação óssea, dos quais 60% eram discretas (escore um) e 40% moderada inicial (escore dois). No GIII foi observado que 75% dos animais tinham ponte óssea de aspecto cuneiforme preenchendo o defeito, onde a ponte óssea apresentava na região central uma largura de aproximadamente um mm com evidente presença de espaços vazios circundando a neoformação óssea central. Destes, 45%,

eram moderada (escore dois), 20%, discreta (escore um) e 10% moderada avançada (escore três) (Fig. 18). Aos 45 dias na avaliação densitométrica verificou-se um aumento nos valores da DMO, devido provavelmente à presença da HA e β -TCP das biocerâmicas, associadas ao tecido ósseo neoformado que resultou no aumento dos valores da densidade óssea mineral, nos animais dos GI e GII. Na avaliação histológica aos 45 dias verificou-se nos animais dos grupos GI e GII, evolução normal no preenchimento da falha, ainda com presença de pequenos focos do material cerâmico no defeito. Havia numerosas células osteoblásticas sobre a superfície do tecido osteóide adjacente às bordas, indicando osteointegração (Fig. 19). No GIII foi evidente a presença de tecido fibrocartilaginoso, adiposo e muscular mais acentuada que aos 30 dias.

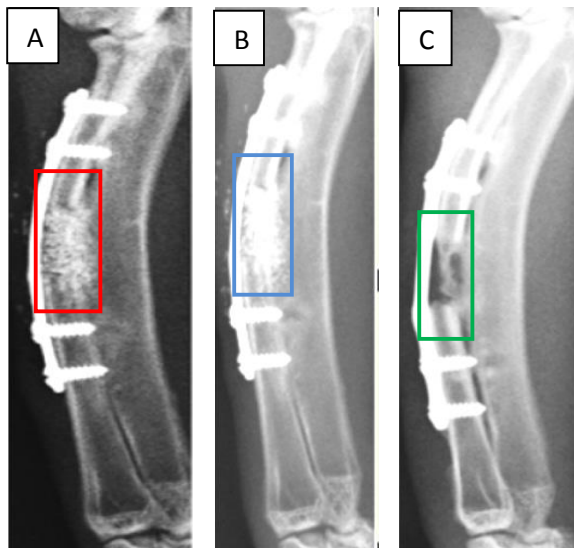


Figura 18. Imagem fotográfica das radiografias dos rádios de coelhos aos 45 dias. Observa-se: (A) vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica de absorção moderada; observa-se ponte óssea discreta (escore 1) (retângulo vermelho), (B) vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica de absorção moderada; observa-se ponte óssea moderada (escore 2) (retângulo azul). (C) vista mediolateral do rádio direito com neoformação no centro do defeito crítico (controle negativo). Nota-se a presença de material radiopaco preenchendo o defeito, reação avaliada como moderada (escore 2) (retângulo verde).

Já aos 60 dias (15 animais), 73% dos animais do GI apresentavam reação periosteal nos extremos da mini placa óssea, sendo 5,3% discreta (escore um), 13,3% moderada inicial (escore dois) e 6,6% moderada avançada (escore três) com aproximadamente 2 cm de extensão medial e lateral, recobrendo parte da placa. Esta reação periosteal tinha aproximadamente 6 mm de altura ao exame radiográfico e representa o crescimento do osso sobre a placa e na periferia. Ponte óssea foi observada em 73,3% dos animais do GI, sendo 40% discreta (escore um) e 33,3% moderada (escore dois). Neste período já havia remodelação óssea discreta (escore um) em 46,6% dos animais. No GII 60% dos animais apresentavam reação periosteal nos

extremos da mini placa óssea, sendo que 50% (escore um) era discreta e 10% moderada inicial (escore dois). Ao ser avaliada a formação de calo ósseo cortical verificou-se que somente um animal (6,6%) evidenciava sinais radiográficos com calo discreto (escore um). Em 73% dos animais havia evidências radiográficas de ponte óssea, discreta em 20% dos animais (escore um); moderada inicial em 40% (escore dois) e moderada avançada em 13,3% (escore três). A remodelação óssea foi observada em 60% dos animais, sendo 26,6% discreta (escore um); 20% moderada inicial (escore dois) e 13,4% moderada avançada (escore três). Estas observações acompanham os dados obtidos na densitometria óssea, onde verificou-se uma queda nos valores das DMO dos grupos tratados no dia 60, devido provavelmente, à reabsorção do implante e substituição pelo tecido ósseo neoformado ainda em processo de maturação. No GIII, 60% dos animais apresentavam reação periosteal nos (Fig. 20) extremos da mini placa óssea discreta (escore um) e 93,3% apresentavam sinais radiográficos de ponte óssea, sendo 13,4% discreta (escore um), 46,6% moderada inicial (escore dois) e 13,4% moderada avançada (escore três). Remodelação óssea foi observada em 20% dos animais classificada como discreta (escore um), moderada inicial (escore dois) 26,6% e moderada avançada 13,4% (escore três). Na avaliação histológica aos 60 dias, foi observada, em dois animais do GI, formação mínima de tecido osteóide, principalmente no extremo proximal do defeito e presença de grânulos da cerâmica. Nos demais animais, na interface entre as bordas da ostectomia e o implante havia evidente formação de novo tecido ósseo, assim como a presença de centros de ossificação. Nos animais do GII, houve maior formação e crescimento de tecido ósseo do que no grupo GI, presença de pequenos focos cartilaginosos, da cerâmica e de tecido conjuntivo ao redor dos grânulos

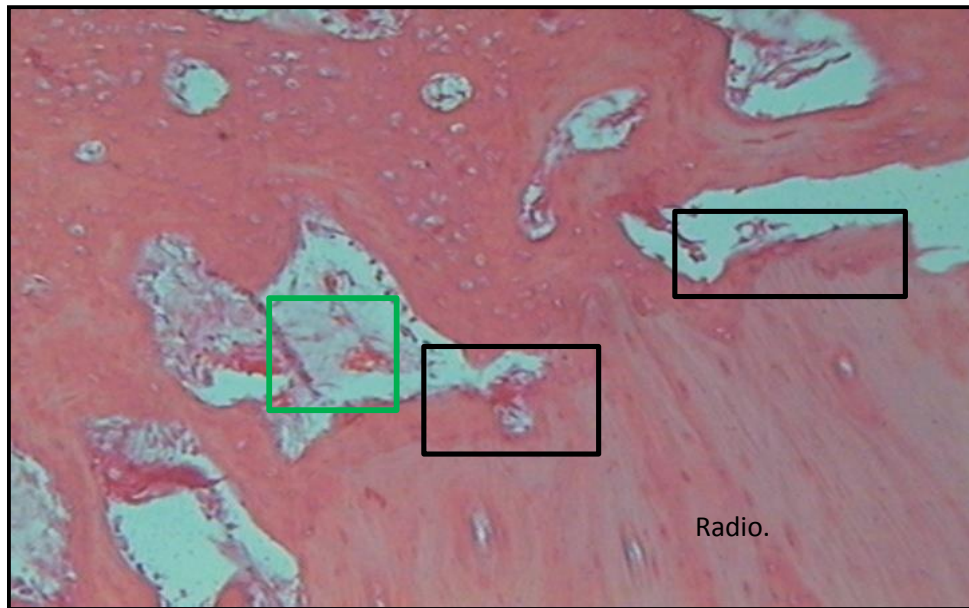


Figura 19. Fotografia de microscopia ótica aos 45 dias. Observa-se evolução normal no preenchimento da falha, ainda com presença de pequenos focos do material cerâmico no defeito (quadrado verde), numerosas células osteoblásticas sobre a superfície do tecido osteóide adjacente às bordas, indicando osteointegração (quadrados pretos). Estas observações foram semelhantes para os GI e GII. (Hematoxilina-Eosina, 10X).

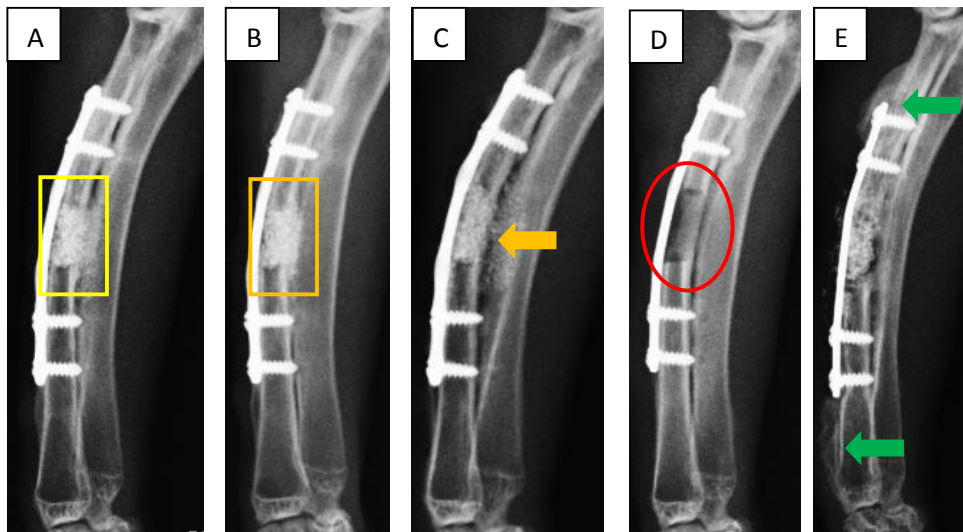


Figura 20. Imagem fotográfica das radiografias dos rádios de coelhos aos 60 dias. A e B vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica moderada. Observa-se a formação de ponte óssea escore 1 (retângulo amarelo), e escore 3 (retângulo laranja). (C) vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica de absorção lenta. Nota-se a presença de remodelação óssea (escore 3) (Seta laranja). (D) preenchimento do defeito por novo osso, formação exuberante (escore três) (círculo vermelho). (E) vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica de absorção lenta, reação periosteal exuberante (escore 3) (seta verde) nos extremos da placa.

do implante (Fig. 21). Já no grupo GIII, observou-se maior evolução do processo em relação aos 30 dias, com maior substituição de tecido cartilaginoso por tecido ósseo, como já relatado na literatura (Doige, 1990; Webb e Tricker, 2000; Doblare *et al.*, 2004; Samuelson, 2007; Lobo *et al.* (2009), Lobo e Arinzeh (2010) e Lobo (2011). A formação óssea era mais evidente nos grupos tratados, nos quais o osso apresentava trabéculas mais espessas, tendendo a osso compacto, mostrando a característica osteocondutora da cerâmica de hidroxiapatita e seu efeito favorável na reparação óssea, (Fig. 21, como já mencionado por Oonishi *et al.* (1997), Borges *et al.*(2000) e Vital *et al.* (2006), Estes achados foram corroborados pelas análises de MEV nos três grupos avaliados, onde observou-se as características mostradas na avaliação por microscopia

ótica. Verifica-se a presença de tecido osteóide ao redor dos grânulos da biocerâmica, preenchendo a totalidade do defeito e evidente formação de ósteons primários e estruturas semelhantes a osteócitos e osteoblastos, nos grupos tratados (Fig. 22 A e B). Nos animais do GIII foi observado tecido neoformado, mas com presença de lacunas vazias distribuídas no defeito crítico (Fig. 22 C). Aos 90 dias (10 animais) verificou-se no GI, reação periosteal nos extremos da mini placa óssea em 60% dos animais, sendo 50% classificada como discreta (escore um) e 10% como moderada inicial (escore dois). Calo ósseo discreto na interface proximal estava presente em 20% dos animais, (escore um) e moderado (escore dois) em 10%. Ponte óssea foi observada em 70% dos animais, sendo 30% discreta (escore um),

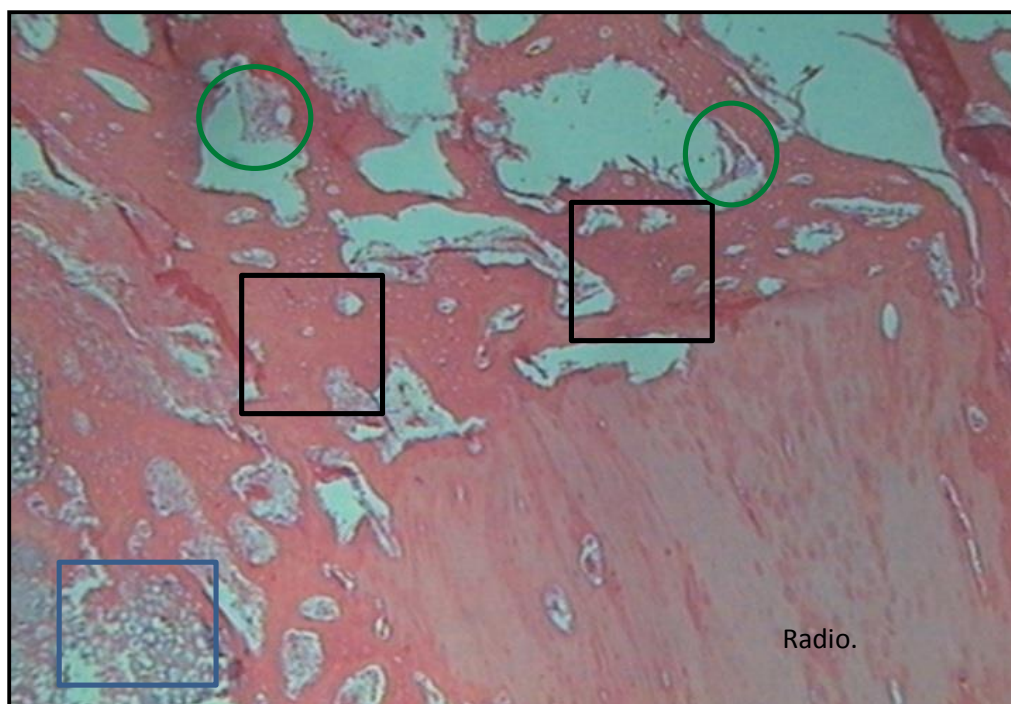


Figura 21. Fotografia de microscopia ótica aos 60 dias, grupo GII. Observou-se maior formação e crescimento de tecido ósseo (quadrado preto) do que no grupo GI, presença de pequenos focos cartilagosos (quadrado azul) assim como da cerâmica (círculos verdes) e tecido conjuntivo ao redor dos grânulos do implante (Hematoxilina-Eosina, 10X).

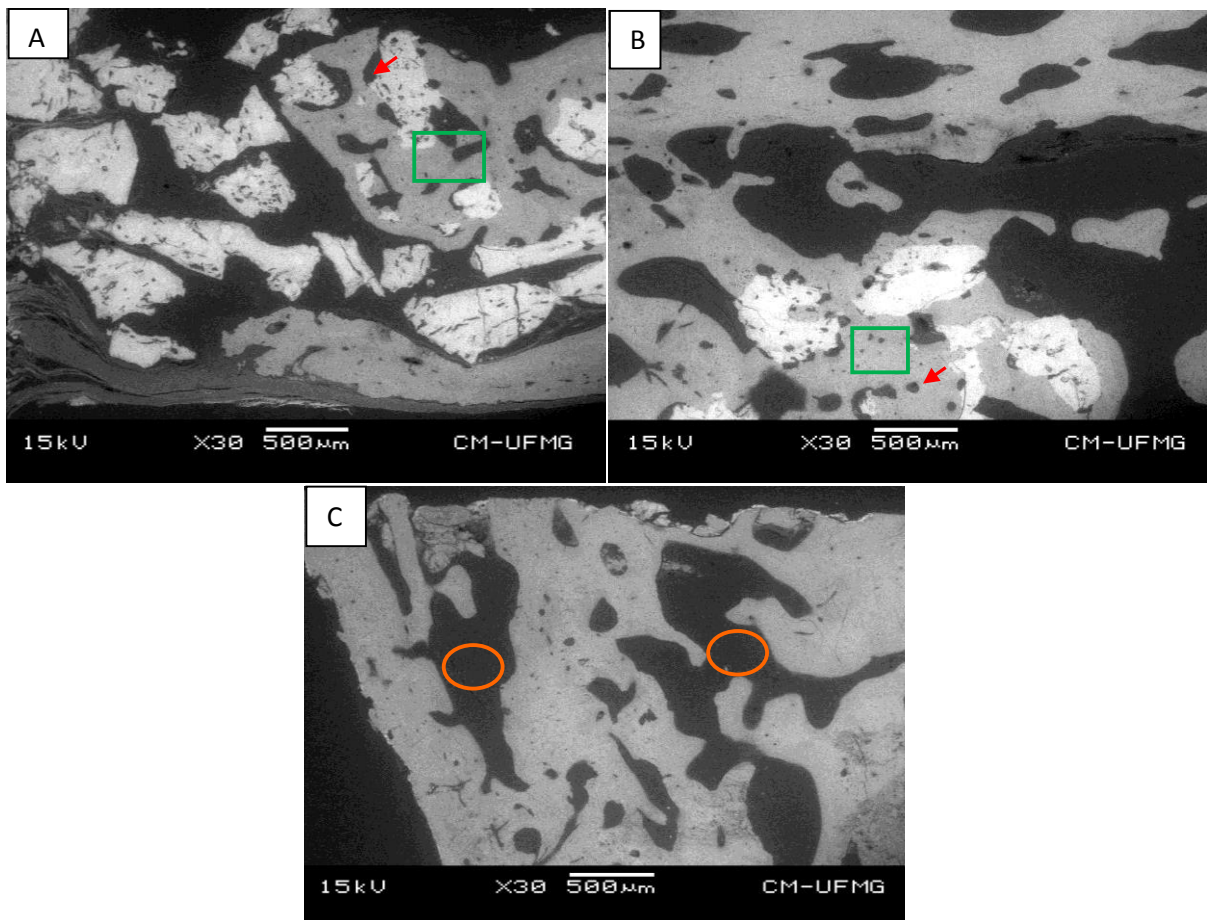


Figura 22. Fotomicrográfiyas de microscopia eletrônica de varredura aos 60 dias após a implantação da biocerâmica macro-micro porosa em defeito crítico do rádio de coelho, evidenciando o crescimento do tecido ósseo. (A) grânulos de biocerâmica de absorção lenta: observa-se o tecido ósseo neoformado ao redor (quadrado verde) dos grânulos e formação de ósteon primário (seta vermelha); (B) grânulos de biocerâmica de absorção moderada evidenciando também o crescimento de tecido ósseo ao redor dos grânulos de biocerâmica (quadrado verde); (C) grupo controle negativo, observam-se as lacunas dentro do tecido ósseo neoformado (círculos laranja).

30% moderada inicial (escore dois) e 10% moderada avançada (escore três). A remodelação óssea foi observada em 50% dos animais, sendo 30% discreta (escore um) e 20% moderada inicial (escore dois). No grupo GII, um animal apresentava reação periosteal nos extremos da mini placa óssea, constituindo 10% do total dos animais avaliados. Nesse grupo nenhum dos animais apresentou calo ósseo, enquanto, 50% tinham ponte óssea discreta (10%); moderada inicial (30%) com escore dois, e moderada avançada (10%), escore três. Remodelação óssea foi observada em 60%

dos animais, sendo discreta em 30% (escore um), moderada inicial em 20% (escore dois) e moderada avançada (escore três) 10% (Fig. 23A). No GIII, dois animais apresentavam reação periosteal nos extremos da mini placa óssea discreta (escore um). Não foi observado calo ósseo neste período de tempo neste grupo. Em 80% foi verificada ponte óssea, sendo discreta (escore um) em 20%; moderada inicial (escore dois) em 10% e moderada avançada (escore três) em 50% (Fig 23 B e C). A remodelação óssea foi observada em 60% dos animais, sendo 30% moderada inicial (escore dois) e 30%

moderada avançada (escore três). Na avaliação densitométrica neste período de tempo verificou-se que os valores das DMO dos grupos tratados se mantiveram estáveis, mas com diferença significativa ao serem comparados com o grupo GIII. Esta diferença foi presente durante todas as

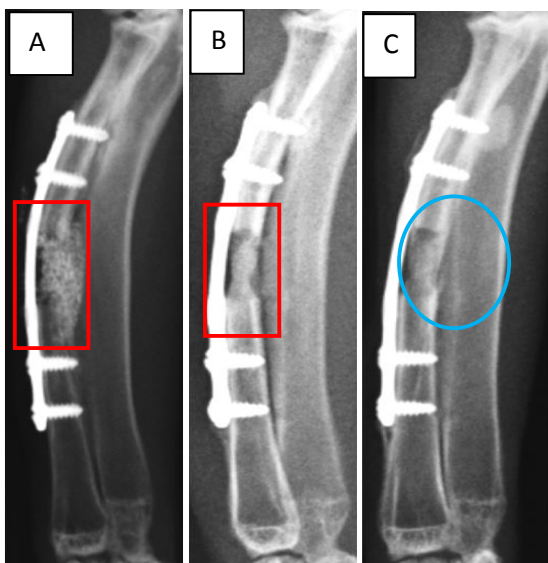


Figura 23. Imagem fotográfica das radiografias dos rádios de coelhos aos 90 dias. (A) vista mediolateral do rádio direito com a biocerâmica de absorção moderada. Nota-se a presença de ponte óssea, exuberante (escore 3) (retângulo vermelho). (B) vista mediolateral do rádio direito, grupo controle. Nota-se a presença de ponte óssea, exuberante (escore 3) (retângulo vermelho). (C) Pode-se observar a remodelação óssea no controle negativo, classificada como moderada (escore 2) (círculo azul).

observações ao longo do experimento. Na avaliação histológica aos 90 dias observou-se nos animais do grupo GI presença de tecido ósseo maduro com osteointegração do implante e presença de grânulos da cerâmica. Apenas um animal do GI apresentava discreto atraso na formação de tecido ósseo no defeito. Já nos animais do GII foi observada maior presença de tecido ósseo maduro em relação ao GI, caracterizado por presença de osteons secundários e grandes vasos sanguíneos, ainda com presença de grânulos da cerâmica (Fig. 24), semelhante ao descrito por Samuelson *et al* (2007). No GIII, houve presença acentuada de tecido conjuntivo, tecido ósseo imaturo em pequenos focos e

invasão do defeito por tecido mole, dificultando o crescimento do osso. Como já relatado por Lobo *et al* (2009), Lobo e Arinzeh (2010) e Lobo (2011). Nas avaliações da MEV aos 90 dias observou-se de forma mais evidente, do que aos 60, maior proporção de tecido ósseo, além da presença de osteons secundários, significando maturidade do tecido ósseo neoformado no defeito, em conformidade com as avaliações na microscopia ótica (Fig. 25 A e B).

Ainda aos 120 dias (5 animais), verificou-se nos grupos I e II reação periosteal em torno da placa, em 40% dos animais; No GI, um animal (20%) apresentou calo ósseo discreto (escore um), e nenhum animal do GII tinha formação de calo ósseo. Nos grupos I e II todos os animais (100%) apresentaram ponte óssea, discreta em 20%, moderada inicial (escore dois) em 40% e moderada avançada (escore três) em 40%. Remodelação óssea foi observada em 100% dos animais de ambos os grupos classificada como moderada inicial, escore dois (40%) e moderada avançada, escore três (60%). No GIII, um animal (20%) apresentou reação periosteal nos extremos da mini placa óssea (escore um). Todos os animais observados apresentavam ponte óssea, porém mais estreita na região central do defeito e com presença de espaços vazios sob a mini placa óssea, sendo discreta escore um, (20%), moderada inicial, escore dois (20%) e moderada avançada, escore três (60%). A remodelação óssea foi observada em 60% dos animais, sendo discreta, escore um, em 40% e moderada avançada, escore três em 20%. Na avaliação densitométrica observou-se uma discreta diferença entre as DMO do GI em relação ao GII, mas sem diferença significativa (Graf.1). Este aumento discreto no valor da DMO no GI, pode ser devido à maior percentagem de HA associado à presença de maior quantidade de osso compacto. A diferença significativa entre os grupos tratados GI e GII e o grupo controle

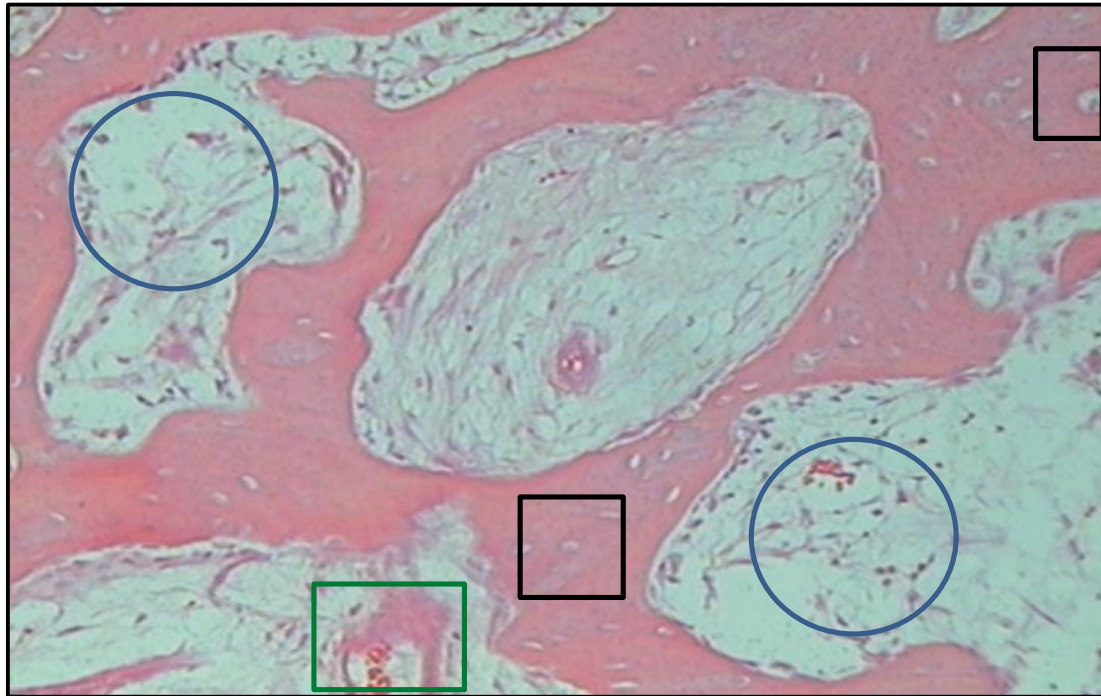


Figura 24. Fotografia de microscopia ótica aos 90 dias, grupo GII. Observa-se presença de tecido ósseo maduro, caracterizado por ósteons secundários (quadrado preto) e grandes vasos sanguíneos (quadrado verde), ainda com presença de grânulos da cerâmica (círculos azuis) (Hematoxilina-Eosina, 10X).

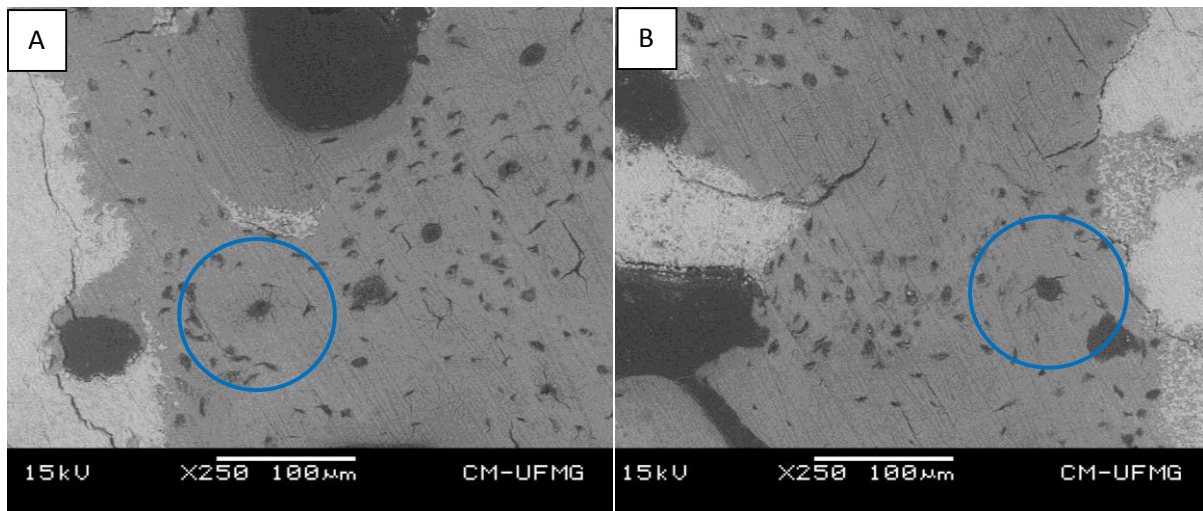


Figura 25. Fotomicrográfas de microscopia eletrônica de varredura aos 90 dias após a implantação da biocerâmica macro micro porosa no defeito crítico do rádio de coelho. (A, B) biocerâmica de absorção lenta e moderada: observa-se o tecido ósseo neoformado maduro, com presença de ósteons secundários (círculo azul).

GIII se manteve até 120 dias, última avaliação do experimento. Na avaliação histológica aos 120 dias, verificou-se no GI, presença de osso compacto, presença de cerâmica no defeito, porém em menor quantidade quando comparada com os outros tempos. No GII, havia tecido ósseo compacto bem diferenciado preenchendo a totalidade do defeito. Em um animal foi observado que o osso formado era semelhante ao osso receptor com presença de osteons secundários, sendo evidentes os sistemas de Havers. No GIII, observou-se regeneração óssea, porém, menos desenvolvida quando comparada aos grupos GI e GII. O processo de reparação óssea nos grupos tratados mostrou-se mais adiantado do que no grupo controle até os 120 dias. Esse fato reforça a afirmação de vários autores, como Oonishi *et al.* (1997),

Rezende *et al.* (1998), e Legeros (2003), que atribuem o efeito osteocondutor da hidroxiapatita como um favorecedor da regeneração óssea, fato demonstrado neste estudo (Fig. 26 A e B). As avaliações de microscopia eletrônica de varredura evidenciaram uma maior proporção de tecido ósseo maduro e presença de osteons secundários, confirmando os achados nas avaliações histológicas neste mesmo período de tempo (Fig. 27 A e B). Neste trabalho não foi encontrada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na densitometria, entre as biocerâmicas (Tab. 1), enquanto houve diferença significativa entre os grupos GI e GII, quando comparados com o grupo GIII (Graf.1). Isto se deve à grande proporção de HA no implante em relação ao osso.

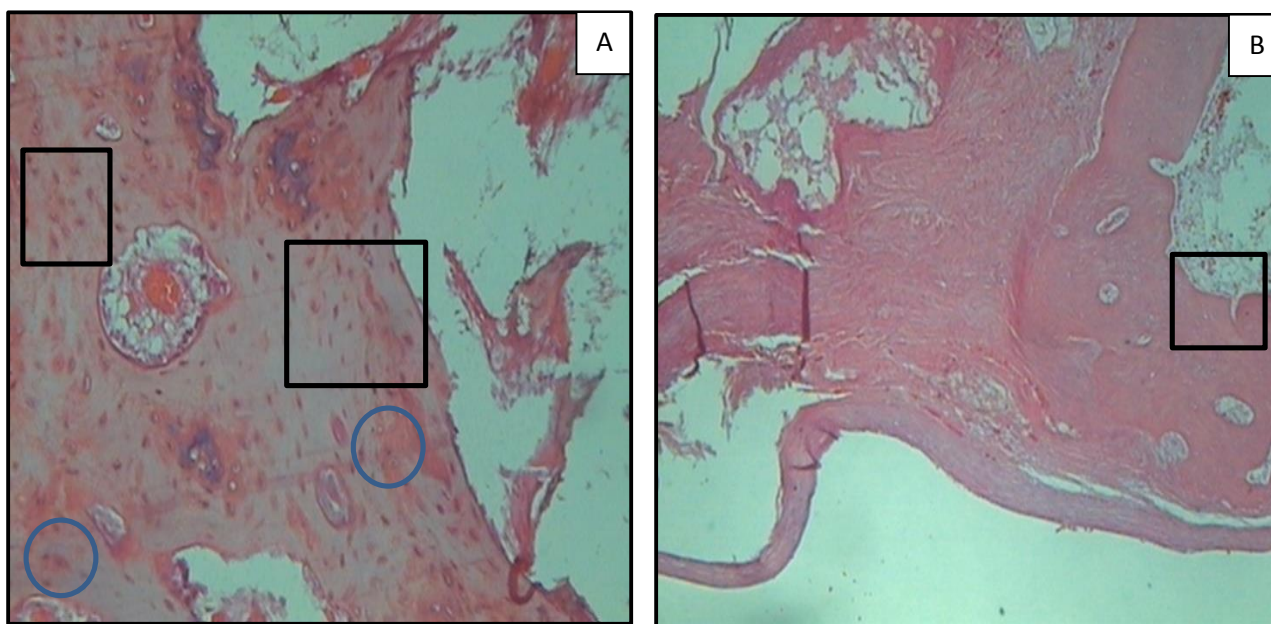


Figura 26. Fotografias de microscopia ótica aos 120 dias. (A) Observa-se tecido ósseo compacto bem diferenciado preenchendo a totalidade do defeito (quadrados pretos), com presença de osteons secundários (círculos azuis), sendo evidentes os sistemas de Havers. 10X. (B) Controle: observa-se regeneração óssea, porém, menos desenvolvida quando comparada aos grupos tratados (quadrado preto) GI e GII. 4X (Hematoxilina-Eosina).

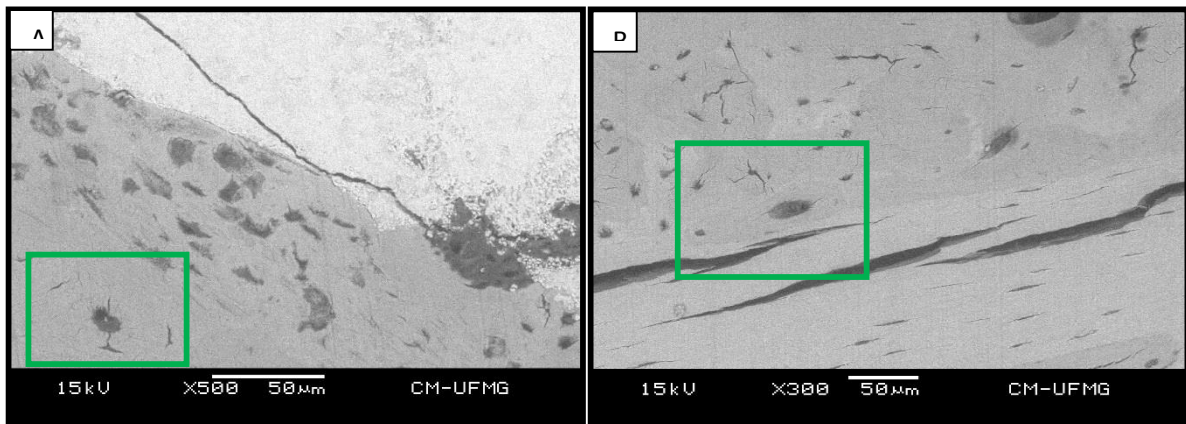


Figura 27. Fotomicrográfas de microscopia eletrônica de varredura aos 120 dias após a implantação da biocerâmica macro micro porosa no defeito crítico do rádio de coelho. (A, B) biocerâmica de absorção lenta e moderada: observa-se a presença de tecido ósseo maduro, com presença de ósteons secundários (quadrado verde).

Tratamentos	Medias	Resultados do teste
3	0.036235	a1
2	0.274031	a2
1	0.28991	a2

Medias seguidas pela letra minúscula com diferente número diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 1. Valores das médias da densidade mineral óssea (g/cm^2) observados nos grupos avaliados ao longo do tempo. Observa-se diferença significativa ao serem comparadas às médias do GIII e as médias dos GI e G II, ao serem avaliados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

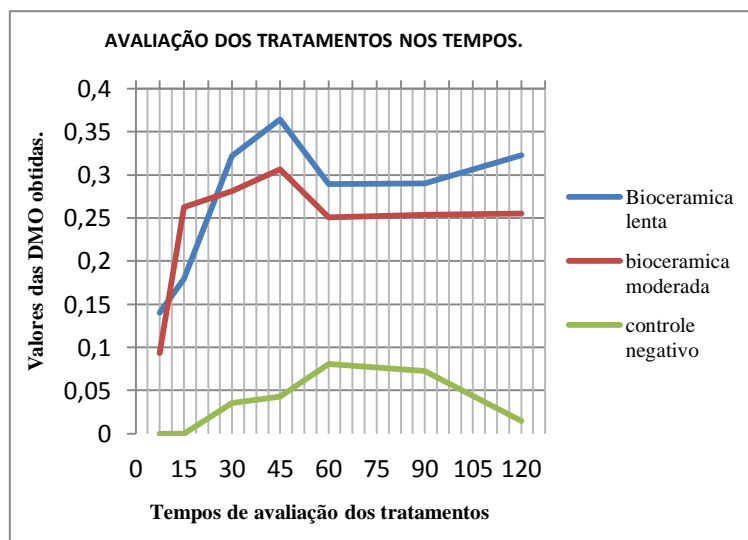


Gráfico 1. Comparação das médias das DMO obtidas durante todos os tempos experimentais nos três tratamentos. No eixo Y valores das médias das DMO obtidas, no eixo X os dias de avaliação dos tratamentos ao longo do tempo.

CONCLUSÕES.

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

As biocerâmicas de fosfatos de cálcio nano-estruturada micro macro porosa em grânulos de absorção lenta e moderada podem ser indicadas para o tratamento de defeitos ósseos críticos.

As biocerâmicas permitem um tipo de crescimento ósseo direto por meio da formação de um tecido fibrovascular, diferenciação e migração ao local de células osteoblásticas, com síntese de tecido osteóide.

A maturação óssea ocorre mais precocemente quando se emprega a cerâmica de absorção moderada.

PERSPECTIVAS FUTURAS.

A Realização de um estudo histomorfométrico, que permitirá obter informações detalhadas a respeito da qualidade óssea após implantação de biocerâmica.

São necessárias mais pesquisas com o intuito de parametrizar as possibilidades de emprego das biocerâmicas de absorção lenta e moderada em relação ao paciente avaliando o seu emprego em animais doentes, pacientes pediátricos e geriátricos, bem como em pacientes do sexo feminino e masculino para se estabelecer os efeitos hormonais.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- AN, E.H. and FRIEDMAN, R.J. *Animal Selection in Orthopaedic Research*. c.3 In: *Animal Models in Orthopaedic Research*. Boca Raton: CRC Press. 1999. p. 39 -57.

- AN, E.H.; FRIEDMAN, R.J.; DRAUGHN, R.A. *Animal Models of Bone Fracture or Osteotome*. C.11 In: AN, E.H. and FRIEDMAN, R.J. *Animal Models in Orthopaedics Research*. Boca Raton: CRC Press. 1999. p. 197 – 217.

- BETZ, R.R. *Limitations of autografts and allograft: new synthetic solutions*. Orthopedics. 2002; v.25, n.5, p.561-570.

- BIOCERAMICA para reconstrução óssea. Belo Horizonte: EINCO, 2011. 13p. (Relatório Técnico).

- BORGES, A.P.B. *O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia de cães: estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodisperção*. 1998. 112f. Tese (Doutorado)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

- BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B. et al. *Hidroxiapatita sintética (HAP-91) como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 2000. v.52, p.616-620.

- BRODBELT, D. *Perioperative mortality in small animal anaesthesia*. The Vet. J. 2009. v.182, p.152-161.

- CAPLAN, A.I.; GOLDBERG, V.M. *Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues*. Clin. Orthop. Relat. Res. 1999; v.367, p.12-16.

- DACULSI, G.; LEGEROS, R.Z.; HEUGHEBAERT, M.; et al., *Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics*. Calcif. Tissue Int. 1990; v.46, n.1, p.20-27.

- DAVIES, J. E. *Bone Engineering*. In: ed. J. E. Davies, Toronto, Canada, 2000; p. 516-525.

- DE LONG, W.G.; EINHORN, T.A.; KOVAL, K.; et al., *Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery*. J Bone Joint Surg. 2007; v.89A n.3 p.649-658.

- DE OLIVEIRA, R.S.; BRIGADO, R.; MADUREIRA, J.F; et al., *Reconstruction of a large complex skull defect in a child: a case report and literature review*. Childs Nerv. Syst. 2007; v.23, n.10, p.1097-1102.
- DELMAS, P.D. *Treatment of postmenopausal osteoporosis*. Lancet 2002; v.8, p.:2018-26.
- DENNE, H.R.; BUTTERWORTH, S.J. *Fracture Healing*. C. 1. In: _____. *A Guide to Canine and Feline orthopaedic*. USA.: Blackwell Science. 2000. P. 1 – 17.
- DOBLARE, M.; GARCIA, J.M.; GOMEZ, M.J. *Modelling bone tissue fracture and healing: a review*. Eng. Fract. Mech. 2004. V.71, p. 1809 -1840.
- DOIGE, C. *Sistema esquelético*. c. 11. In: THOMSON, R.G. *Patologia Veterinária Especial*. SP: Manole. 1990. p. 531 – 578.
- DUARTE TS. *Osseointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães*. 2003. [Tese Mestrado]. Universidade Federal de Viçosa; Viçosa, MG, Brasil.
- FEHLBERG, A.F.; *Hidroxiapatita sintética na regeneração de falha óssea provocada em fratura do Tércio intermédio de tibia imobilizada pela fixação percutânea em cães*, 2001. p. 42. (Tese Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.
- FLACH, D.M.; GORGOZINHO, K.B.; PRAZERES, M.N. et al. *Regeneração óssea em cães e gatos*. 2002.
- FLECKNELL, P. *Laboratory Animal Anesthesia*. 3ed. USA: Elsevier Inc. 2009. p.15-18.
- GAO, T. J. et al.,; *Microscopic evaluation of bone-implant contact between hydroxyapatite, bioactive glass and tricalcium phosphate implanted in sheep diaphyseal defects*. Biomaterials, v. 16, issue 15, p.1175-1179, 1995.
- GODOY, C.L.B.; PELLEGRINI, L.C.; SANTAROSA, I.M.; KROLIKOWSKI, G. *Diagnóstico por imagem em medicina veterinária*. Ed. da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. Rio Grande do Sul. 2010.
- GOLDBERG V.M, AKHAVAN S. *Biology of Bone Grafts*. In. Bone Regeneration and Repair in Biology and Clinical Application; Totowa, New jersey, 2005, p. 57-65.
- HANKENSON, K.D.; CAVALIERE, C.M.; FRANK, R.P. *Animals Models of Skeletal Disease*. c.10. In: HAU, J. VAN HOOSIER, G.L. *Handbook of Laboratory Animal Science*. 2ed. v.2. Washington: CRC Press. 2003. p.183-224.
- HARCOURT-BROWN, F. *Textbook of Rabbit Medicine*. USA: Elsevier Science Limited. 2002.
- KADERLY, R.E. *Primary Bone Healing*. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Animal)*. 1991. v.6, n.1, p. 21 – 25.
- LANGER, R.; VACANTI, J.P. *Tissue engineering: the challenges ahead*. Sci. Am. 1999; v.280, p.62-65.
- LANGER, R.; VACANTI, J.P. *Tissue engineering*. Science. 1993; v. 260, p.920-926.
- LE NIHOANNEN, D.; DUVAL, L.; LECOMTE, A.; et al., *Interactions of total bone marrow cells with increasing quantities of macroporous calcium phosphate ceramic granules*. J. Mater Sci. Mater Med. 2007; v. 18, n.10, p.1983-1990.
- LEGEROS, R.Z. *Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review*. Adv. Dent. Res. 1988; v.2, n.1, p.164-180.
- LEGEROS, R.Z.; LIN, S.; ROHANIZADEH, R.; et al. *Biphasic calcium*

- phosphate bioceramics: preparation, properties and applications*. J. Mater Sci. Mater Med. 2003; v.14, issue,3, p.201-209.
- LEGEROS, R.Z.; *Calcium phosphate-based osteoinductive materials*. Chem. Rev. 2008; v. 108, n.11, p. 4742-4753.
 - LINKHART, T.A. *Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF-b and BMP*. Bone, 1998. v.19, n.6, p.591-603.
 - LIPMAN, N.S.; MARINI, R.P.; FLECKNELLIN, P.A. *Anesthesia and Analgesia in Rabbits*. c.11. In: FISH, R.; DANNEMAN, P.J.; BROWN, M.; et al., *Anesthesia and Analgesia in Laboratore Animals*. 2ed. USA: American College of Laboratory Animal Medicine. 2008. p.299-333.
 - LOBO, S.E.; WYKROTA, F.H.; OLIVEIRA, A.C.; et al., *Quantification of bone mass gain in response to the application of biphasic bioceramics and platelet concentrate in critical-size bone defects*. J. Mater Sci. Mater Med. 2009; v. 20, n.5, p.1137-1147.
 - LOBO, S.E; ARINZEH, T.L.; *Biphasic calcium phosphate ceramics for boné regeneration and tissue engineering applications*. Materials. 2010; v. 3, p. 815 – 826.
 - LOBO, S.E. *Modulação do fenótipo de células tronco através de biocerâmicas de fosfatos de cálcio*. 2011. Tese de doutorado. Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo.
 - LOUZADA M.J.Q.; XAVIER C.A.M.; MARQUES NETO J.F. *Ação da calcitonina na resolução de perfurações ósseas em coelhos: controle fotodensitométrico e histológico*. Rev. Bras. de Reumat. 1990; v.30, n.4, p.111-116.
 - MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; MURPHE, J.M.; et al., *Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow*. Tissue Eng. 1998; v.4, p.415-428.
 - MADER, D.R. *Basic Approach to Veterinary Care*. c.15. In: QUENSENBERRE, H. *Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. US: Saunders Company. 1997. p. 160 – 168.
 - MASON, D.E. *Anesthesia, Analgesia, and Sedation for Small Mammals*. In: QUENSENBERRE, H. *Ferrets, Rabbits and Rodents: Clínica Medicine and Surgery*. USA: Saunders Company. 1997. p.382,384-385.
 - NORRIS, S.A.; PETTIFOR. J.M.; GRAE, D.A.; et al., *Calcium Metabolism and Bone Mass in Female Rabbits During Skeletal Maturation: Effects of Dietary Calcium Intake*. Bone. 2001. v.29, n.1, p. 62 -69.
 - OLSSON et al., *Comportamento biológico de matriz scaffold acrescida de células progenitoras na reparação óssea*. Ciênc. Rural, 2008. v.38, n.8, p. 2403-2412,
 - OONISHI, H.; KUSHITANI, S.; YASUKAWA, E. et al. *Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute*. Clin. Orthop. Rel. Res. v.334, p.316-325, 1997.
 - ÖZTÜRK, A.; ILMAN, A.A.; SAGLAM, H.; et al. *The effects of phytoestrogens on fracture healing: experimental research in New Zealand white rabbits*. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery*. v.14, n.1, p.21-27. 2008.
 - PIERMATTEI, D.L., FLO, G.L. *Handbook of small animal orthopedics and fracture treatment*. 3.ed. Philadelphia : Saunders, 1997. The stifle joint: p.516-580.
 - PINHEIRO, A.L.B.; GERBI, M.E.M.M. *Photo engineering of Bone repair Processes*. Photo medicine and Laser Surgery. 2006. v.24, n.2, p.169 – 178.
 - REZENDE, C.M.F.; BORGES, A.P.B.; BERNIS, et al., *Aspectos clinico-cirurgicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na*

- diáfise distal da tíbia de cães*. Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec. 1998; v.50, n.5, p. 537-545.
- RICH, G.A. *Rabbit Orthopedic Surgery*. Vet. Clin. of North America: Exotic Animal Practice. 2002. v.5, n.1, p.157-168.
 - RICHARDSON, V.C.G. *Anesthesia and Surgery*. C.16, In: Rabbits: health, husbandry and Diseases. Oxford: Blackwell Science Ltd. 2000. p. 151 – 157.
 - RIPAMONTI, U. *Soluble and insoluble signals sculpt osteogenesis in angiogenesis*. World J. Biol. Chem. 2010; v.1, n.5, p.109-132.
 - RUMPEL, E., WOLF, E., KAUSCHKE, E., BIENENGRBER, V., BAEERLEIN, T., GEDRANGE, T. AND PROFF, P. *The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo*, F. Morph. 2006. v. 65, n.1, p.43-48.
 - SAFDAR N, KHAN F, CAMMISA H JR, SANDHU S, ASHISH D, et al., *The biology of bone grafting*. J. Am. Acad. Orthop. Surg., 2005. v.13, p.77-86,
 - SAMUELSON, D.A. *Cartilage and Bone*. C.6. In: _____. *Textbook of Veterinare Histologie*. China: Saunders Elsevier. 2007. p. 100 – 129.
 - SHIMAZAKI, K.; MOONEE, V. *Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute*. J. Orthop. Res., 1985. v.3, p.301-310,
 - SPRIANO S., VERNE E., FAGA M.G. BUGLIOSI S., MAINA G. *Surface treatment on an implant cobalt alloy for hig biocompatibility and wear resistance*. Wear 2005; v.259, p.919 – 925.
 - SUZUKI O. *Interface of synthetic inorganic biomaterials and bone regeneration*. International congress series. 2005; v.1284, p.274-283.
 - VACANTI, J.P.; LANGER, R. *Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation*. Lancet. 1999; v.354(suppl I), p.32-34.
 - VACARRO A.R, PATEL T.C, FISCHGRUND J, ANDERSON D.G, TRUUMES E, HERKOWITZ H.N. *A pilot study evaluating the safety and efficacy of OP-1 putte (shBMxP-7) as a replacement for iliac crest autograft in posterolateral lumbar arthrodesis for degenerative spondelolisthesis*. Spine. 2004. v.29, p.1885-1892,
 - VITAL C.C, BORGES A.P, FONSECA C.C, TSIOMIS A.C, CARVALHO T.B, FONTES E.B, et al. *Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2006. v.58(2), p.175-83.
 - WEBB, J.C.J.; TRICKER, J. *Bone Biology. A review of fracture healing*. Current Orthopaedics. 2000. v. 14, p. 457 – 463.
 - WILLIAMS D.F. *Definition in biomaterials*. Amsterdam Elsevier. Progress in biomedical engineering. 1987. cap 4;
 - WILSON, J.W. *Vascular Supple to Normal Bone and Healing Fracture*. Sem. in Vet. Med. and Surg. (Small Animal). 1991. v. 6, n. 1, p. 26 -38.
 - WYKROTA, L.L.; WYKROTA, F.H.L.; GARRIDO, C.A. *Long-term bone regeneration in large human defects using calcium-phosphate particulate*. In: Bone engineering. Ed. Davies, J.E., em square incorporated, Toronto. 2000, p. 516-525.
 - YAMAMOTO, T.; ONGA, T.; MARUI, T.; et al., *Use of the hydroxyapatite of fill cavities after excision of bening bone tumors*. J. Bone Joint Surg. 2000. v.82, n.B, p. 1117-1120.

- YUAN, H.; DE BRUIJN, J.D.; LI, E.; et al., *Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous alpha-TCP and beta-TCP*. J. Mater Sci. Mater Med. 2001; v.12, n.1, p.7-13.

- YUAN, H.P.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; DE GROOT, K.; et al., *Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds*. Tissue Eng. 2006; v.12, n.6, p.1607-1615.

- ZÁRATE-KALFÓPULOS, B. REYES-SANCHEZ, A.; *Injertos óseos en cirugía ortopédica*. Cir. Ciruj., 2006. v.74, n.3, p.217-222.