

ENDRIGO GABELLINI LEONEL ALVES

**COMPÓSITO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) E
HIDROXIAPATITA (HAP-91[®]) COMO IMPLANTE ORTOPÉDICO
EM GATOS (*FELIS CATUS*).**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária
da Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciência Animal
Área de concentração: Medicina e Cirurgia
Veterinárias
Orientadora: Prof^a Cleuza Maria de Faria Rezende

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2009

A474c Alves, Endrigo Gabellini Leonel, 1980-

Compósito de polihidroxibutirato (PHB) e hidroxiapatita (HAP-91[®]) como implante ortopédico em gatos (*Felis catus*) / Endrigo Gabellini Leonel Alves. – 2009.

64 p. : il.

Orientadora: Cleuza Maria de Faria Rezende

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Gato – Cirurgia – Teses. 2. Implantes Ortopédicos – Teses. 3. Ortopedia veterinária – Teses. I. Rezende, Cleuza Maria de Faria. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.808 97

Dissertação defendida e aprovada em 05 de Fevereiro de 2009, perante a Comissão Examinadora constituída por:

Prof^ª. Dr^ª. Cleuza Maria de Faria Rezende
Orientadora

Prof^º. Dr^º. Humberto Pereira Oliveira
Coorientador

Prof^º. Dr^º. Leonardo Augusto Lopes Muzzi

Prof^º. Dr^º. Ernane Fagundes do Nascimento

Prof^º Dr^º. Estevam Barbosa de Las Casas

Por todo carinho e amizade, dedico esse trabalho à toda minha família especialmente:
Aos meus pais José Walter Leonel Alves e Beatriz Gabellini Alves
Aos meus avos Wilson Gabellini e Aparecida Straiotto Gabellini
Ao meu irmão Enzo Gabellini Leonel Alves
À minha futura esposa Isabel Robrigues Rosado e
E ao meu sobrinho e afilhado Gabriel Gabellini Freitas Leonel.

Agradecimentos

Agradeço a Deus força maior que rege o equilíbrio de nossas vidas.

À minha orientadora Professora Cleuza Maria de Faria Rezende por sua dedicação, amizade e pelo grande conhecimento transmitido.

Ao meu coorientador Professo Humberto Pereira Oliveira pelo grande auxilio neste trabalho.

À professora Rogéria Serakides pelo auxilio com a interpretação histológica, pela amizade e pelo extenso conhecimento transmitido.

À professora Eliane Gonçalves de Melo pela amizade e pelo conhecimento transmitido.

À professora Marivalda de Magalhães Pereira pela inestimável ajuda com os testes mecânicos de flexão e compressão.

Ao professor Ronaldo Antônio Neves Barbosa pelo grande auxilio com o teste mecânico de torção.

Ao professor Antônio Ferreira Ávila pelo inestimável auxilio com a parte mecânica do experimento.

Ao professor Hélio Chiarini Garcia pela grande ajuda com a parte histologia do experimento.

Ao amigo e incentivador, professor Leonardo Augusto Lopes Muzzi pela por sua participação na banca de defesa de tese.

Aos professores Ernane Fagundes do Nascimento e Estevam Barbosa de Las Casas por participarem da banca de defesa de tese.

A todos os demais professores da pós-graduação que com certeza me ajudaram de alguma forma.

À professora Sheyla Maria de Castro Máximo Bicalho e ao professor Paulo Miranda Oliveira pela parceria e pelo grande auxilio neste trabalho.

Aos funcionários do Hospital Veterinário Carlos, Terezinha, Ronaldo, Cleide, Joaquim, Messias e Tião, que sempre estiveram prontos para ajudar.

Às Enfermeiras do Hospital Veterinário Dorinha e Sílvia pela colaboração na execução deste trabalho junto ao bloco cirúrgico.

Aos técnicos do laboratório de patologia Mel, Flávia e Ronaldo que sempre estiveram pronto pra ajudar em todos os procedimentos histopatológicos.

Às funcionárias da secretaria Eliane, Rosangela, Lurdes, que muito me ajudaram com as tarefas burocráticas.

Aos técnicos Eduardo e Eli pela cooperação na realização dos exames radiográficos.

Às alunas Samanta e Juliana pela inestimável ajuda com os animais do experimento.

Aos colegas e amigos de pós-graduação Natalie, Plínio, Jankerle, Cíntia, Fátima, Fabíola e Sabrina que muito me ajudaram nessa jornada.

Ao doutorando Welberte e a técnica Denise, pois sem eles não haveria como realizar os testes mecânicos.

À professora Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho e à colega Gabriele pela grande ajuda com a alimentação dos animais.

Ao colega Médico Veterinário Marcos Abel Domingues do CCZ de Uberaba e a minha querida sogrinha Ivonilde Rodrigues Rosado pelo grande empenho em conseguir os animais do experimento.

Ao brilhante estatístico e amigo Renato de Abreu pelos conhecimentos compartilhado e análise estatística.

À empresa Ouro Fino em especial à amiga Lídia M S Lima pelo grande auxílio com medicamentos e produtos veterinários utilizados no experimento.

Ao colega Germano Jeycic pelo grande auxílio com medicamentos e produtos veterinários utilizados no experimento.

Aos meus pais José Walter Leonel Alves e Beatriz Gabellini Alves pelo amor incondicional e grande incentivo aos estudos.

Aos meus avós Wilson Gabellini e Aparecida Straiotto Gabellini pela amizade, amor e pelos sábios ensinamentos.

Ao meu irmão Enzo Gabellini Leonel Alves por ser meu melhor amigo e companheiro de todas as horas, me apoiando sempre que preciso.

À Isabel Rodrigues Rosado, minha futura esposa, pelo amor e companheirismo.

Ao Gabriel meu sobrinho e afilhado por ser o mais novo motivo de alegria e inspiração.

Aos grandes amigos Bruno, Diego, Marcus e Gustavo que sempre me incentivaram a continuar principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos animais utilizados neste experimento pela doçura mesmo em momentos desconfortáveis.

À capes, pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS.....	9
	LISTA DE FIGURAS.....	10
	LISTA DE ANEXOS	15
	RESUMO.....	16
	ABSTRACT.....	17
1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Biomateriais e a reparação óssea.....	19
2.1.1	Biocerâmicas.....	20
2.1.2	Biopolímeros.....	21
2.2	Fisiologia óssea.....	23
2.3	Biomecânica e as Fraturas.....	24
2.4	Placas de fixação óssea.....	25
3.	Material e Métodos.....	26
3.1	Preparação dos implantes.....	26
3.2	Testes de resistência mecânica da placa.....	26
3.3	Implantação do compósito no tecido subcutâneo e no tecido ósseo.....	29
3.4	Emprego experimental da placa de compósito PHB/HA.....	33
3.5	Análise estatística.....	34
4	Resultados e discussão.....	34
4.1	Teste mecânico.....	34
4.2	Avaliação do compósito no tecido subcutâneo e no tecido ósseo.....	41
4.3	Emprego experimental da placa de compósito na fixação do fêmur.....	55
5	Conclusão.....	59
6	Perspectivas futuras.....	59
7	Referências Bibliográficas.....	59
	ANEXOS.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Valores de força máxima e de deformação até a falha dos modelos ósseos fixados com placas de aço e submetidos ao teste de flexão com quatro pontos de apoio utilizando uma máquina universal de ensaios EMIC DL3000 e célula de carga 2000N	35
Tabela 2:	Valores de força máxima e de deformação até falha dos modelos ósseos fixados com placas de Compósito PHB (70%) HA (30%) e submetidos ao teste de flexão com quatro pontos de apoio utilizando uma máquina universal de ensaios EMIC DL3000 e célula de carga 2000N	36
Tabela 3:	Valores de torque máximo e deformação até a falha dos modelos ósseos fixados com placas de aço e submetidos ao teste de torção utilizando uma máquina hidráulica de ensaios de torção MTS modelo 66.11A.02 com célula de torque 250Nm	38
Tabela 4:	Valores de torque máximo e deformação até a falha dos modelos ósseos fixados com placas de Compósito PHB (70%) HA (30%) e submetidos ao teste de torção utilizando uma máquina hidráulica de ensaios de torção MTS modelo 66.11A.02 com célula de torque 250Nm	38
Tabela 5:	Valores de força máxima e deformação até a falha dos modelos ósseos fixados com placas de aço e submetidos ao teste de compressão axial utilizando uma máquina universal de ensaios EMIC DL3000 e célula de carga 2000N	40
Tabela 6:	Valores de força máxima e deformação até falha dos modelos ósseos fixados com placas de Compósito PHB (70%) HA (30%) e submetidos ao teste de compressão axial utilizando uma máquina universal de ensaios EMIC DL3000 e célula de carga 2000N	40
Tabela 7:	Grau de radiopacidade observado na interface osso-implante e no tecido ósseo adjacente ao compósito PHB/HA implantado na metáfise femoral distal de gatos 30 dias após sua implantação	43
Tabela 8:	Grau de radiopacidade observado na interface osso-implante e no tecido ósseo adjacente ao compósito PHB/HA implantado na metáfise femoral distal de gatos, 60 dias após a cirurgia	44
Tabela 9:	Grau de radiopacidade observado na interface osso-implante e no tecido ósseo adjacente ao compósito PHB/HA implantado na metáfise femoral distal de gatos 90 dias após a cirurgia	44

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Placa de fixação óssea composta de PHB (70%) e HA (30%). A - placa estéril dentro da embalagem de papel cirúrgico e filme laminado de poliéster e polipropileno. B - placa estéril após ser retirada da embalagem, vista da superfície plana. C - superfície plana da placa com os orifícios. D – superfície côncava da placa com orifícios. E – espessura e forma da placa	26
FIGURA 2:	Fotografia do molde de gesso utilizado para confeccionar os modelos de fêmur esquerdo de gato em metilmetacrilato	27
FIGURA 3:	Fotografia mostrando a máquina utilizada no ensaio de flexão com quatro pontos utilizando corpo de prova constituído pelo modelo ósseo em acrílico, fixado pela placa de PHB (70%) e HA (30%) (indicado pela seta amarela). (A) constitui a base para realização do teste e seus pontos de apoio estão distantes 80mm (setas verdes). (B) mostra os pontos de aplicação de força e estão equidistantes da linha de secção (seta azul) e distantes 40mm entre si (setas vermelhas)	28
FIGURA 4:	Fotografia mostrando a máquina de torção. Os círculos vermelhos evidenciam as peças de adaptação que permitiram o encaixe do corpo de prova à unidade de torção. A - peça responsável pela aferição do ângulo de deslocamento. B – peça responsável pela aferição do torque. C - corpo de prova em uma visão da superfície plana da placa. B - corpo de prova em uma visão lateral. A seta azul aponta a linha de secção do modelo	28
FIGURA 5:	Fotografia da máquina universal de ensaios EMIC DL 3000 empregada no ensaio de compressão axial. A - modelo fixado com placa de aço. B - modelo fixado com a placa de compósito. A seta amarela aponta para o defeito de 5mm localizado no terço médio do modelo e as setas vermelhas apontam as bases de apoio utilizadas no teste	29
FIGURA 6:	Fotografias mostrando a seqüência da cirurgia de implantação do compósito na metáfise distal do fêmur direito de gato. A – Exposição cirúrgica da metáfise distal do fêmur (seta azul). B - defeito ósseo realizado na metáfise (seta amarela). C – defeito ósseo preenchido pelo compósito de PHB (70%) e HA (30%) (seta vermelha)	30
FIGURA 7:	Esquema utilizado para mensuração do grau de radiopacidade na interface osso-implante e no tecido ósseo adjacente nas projeções radiográficas médio-lateral (A) e crânio-caudal (B). Cada divisão representa 25% de área analisada	31
FIGURA 8:	Fotografia da região metafisária distal do fêmur direito de gato. A - implante de compósito PHB (70%) e HA (30%) (seta amarela) aos 30 dias após a cirurgia experimental. B - furadeira pneumática e broca trefina (seta vermelha) de 8mm de diâmetro no momento da biópsia óssea aos 30 dias	32

-
- FIGURA 9: Fotografia dos corpos de prova constituídos do modelo ósseo seccionado no terço médio e fixado com microplaca de aço reta de 2mm, com oito orifícios, após os ensaios de flexão com quatro pontos realizado com uma máquina universal de ensaios EMIC DL 3000 com célula de carga de 2000N. Os corpos de prova estão enumerados de acordo com a ordem de realização dos ensaios. Observar a deformação da placa na região adjacente à linha de secção do modelo acrílico 37
- FIGURA 10: Fotografia dos corpos de prova constituídos do modelo ósseo seccionado no terço médio e fixado com placa de compósito PHB (70%) e HA (30%) após os ensaios de flexão com quatro pontos realizado com uma máquina universal de ensaios EMIC DL 3000 com célula de carga de 2000N. Os corpos de prova estão enumerados de acordo com a ordem de realização dos ensaios. Observar a ruptura da placa na região adjacente à linha de secção do modelo acrílico 37
- FIGURA 11: Fotografia dos corpos de prova constituídos do modelo ósseo seccionado no terço médio e fixado com microplaca de aço reta de 2mm com oito orifícios, após os ensaios de torção realizado em uma máquina hidráulica de ensaios de torção MTS modelo 66.11A.02 com célula de torque de 250Nm. Os corpos de prova estão enumerados de acordo com a ordem de realização dos ensaios. Observar a deformação da placa na região adjacente à linha de secção do modelo acrílico..... 39
- FIGURA 12: Fotografia dos corpos de prova constituídos do modelo ósseo seccionado no terço médio e fixado com placa de compósito PHB (70%) e HA (30%) após os ensaios de torção realizado em uma máquina hidráulica de ensaios de torção MTS modelo 66.11A.02 com célula de torque de 250Nm. Os corpos de prova estão enumerados de acordo com a ordem de realização dos ensaios. Observar a ruptura da placa por cisalhamento na região adjacente à linha de secção do modelo acrílico 39
- FIGURA 13: Fotografia dos corpos de prova constituídos do modelo ósseo apresentando um defeito de 5mm no ponto médio e fixado com microplaca de aço reta de 2mm, com oito orifícios após os ensaios de compressão axial realizado em uma máquina universal de ensaios EMIC DL 3000 com célula de carga de 2000N. Os corpos de prova estão enumerados de acordo com a ordem de realização dos ensaios. Observar a deformação da placa na região adjacente à linha de secção do modelo acrílico 41
- FIGURA 14: Fotografia dos corpos de prova constituídos do modelo ósseo apresentando um defeito de 5 mm no ponto médio e fixado com placa de compósito PHB (70%) e HA (30%) após os ensaios de compressão axial realizado em uma máquina universal de ensaios EMIC DL 3000 com célula de carga de 2000N. Os corpos de prova estão enumerados de acordo com a ordem de realização dos ensaios. Observar a ruptura da placa na região adjacente à linha de secção do modelo acrílico 41

FIGURA 15:	Exame radiográfico da região metafisária distal do fêmur direito de gatos onde foi implantado compósito PHB (70%) e HA (30%). Observar a redução da linha radioluciente (setas vermelhas) em torno do implante ao longo do experimento. As imagens identificadas com as letras A, B e C correspondem aos períodos de avaliação de 30, 60 e 90 dias respectivamente	43
FIGURA 16:	Exame radiográfico da região metafisária distal do fêmur direito de gatos onde foi implantado compósito PHB (70%) e HA (30%). Observar o aumento de radiopacidade no (setas vermelhas) tecido adjacente ao implante. “A” corresponde à projeção médio-lateral e “B” à crânio-caudal ambas realizadas aos 30 dias de implantação	43
FIGURA 17:	Exame radiográfico da região metafisária distal do fêmur direito de gatos onde foi implantado compósito PHB (70%) e HA (30%). Observar a reação periosteal (setas vermelhas) adjacente ao local de colocação do implantes. As imagens identificadas com as letras A, B e C correspondem às projeções crânio-caudais realizadas nos períodos de avaliação 30, 60 e 90 dias respectivamente	43
FIGURA 18:	Fotografia do fêmur direito de gato no momento da biópsia. A - mostra o aspecto macroscópico do compósito de PHB/HA (seta vermelha) aos 30 dias após implantação. B - mostra o implante (seta amarela) aos 60 dias. C - mostra a região metafisária com o implante recoberto por tecido conjuntivo fibroso (seta azul) aos 90 dias	45
FIGURA 19:	Fotografia da amostra osso-implante retirada por biópsia aos 60 dias após sua implantação. A - mostra uma visão oblíqua (a seta amarela aponta o periósteeo). B - mostra uma visão da superfície periosteal do osso com o implante (seta azul) recoberto pelo periósteeo (seta amarela)	45
FIGURA 20:	Fotografia da amostra osso-implante retirada por biópsia aos 90 dias após sua implantação. A - mostra uma visão da superfície periosteal do osso que não permite a visibilização do implante (setas vermelhas), pois encontra-se recoberto por uma camada de tecido denso. B - mostra uma visão lateral que permite avaliar a espessura da cortical (seta verde) e periósteeo (seta amarela). C - visão da superfície medular do osso com o implante no seu interior (seta azul)	45

-
- FIGURA 21: Fotomicroscopia da interface subcutâneo-implante 15 dias após a cirurgia experimental de implantação de compósito PHB 70% e HA 30% no tecido subcutâneo de gatos. A – Pele (linha pontilhada em amarela), tecido subcutâneo e cápsula fibrosa sobre o implante (linha pontilhada em azul) (HE, 515,9X). B – Cápsula fibrosa em maior aumento (linha pontilhada em azul) mostrando infiltrado infamatório intenso (HE, 2733,5X). C – Área de necrose (Seta vermelha) e cápsula (linha pontilhada em azul) (HE, 3450,5X). D – Cápsula fibrosa: maior aumento mostrando os tipos celulares: células gigantes multinucleadas (seta vermelha), neutrófilo (seta amarela), linfócito (seta azul) e macrófago (seta preta) (HE, 7416X) 47
- FIGURA 22: Fotomicroscopia da interface subcutâneo-implante 30 dias após cirurgia experimental de implantação de compósito PHB 70% e HA 30% no tecido subcutâneo de gatos. A – Pele (linha pontilhada em amarela), tecido subcutâneo e cápsula fibrosa sobre o implante (linha pontilhada em azul) (HE, 598,4X). B – Cápsula fibrosa em maior aumento mostrando o biomaterial (aspecto birrefringente) no interior de uma célula gigante (seta azul), a seta verde aponta um vaso (HE, 4752X). C – Cápsula fibrosa com infiltrado inflamatório intenso, células gigantes (seta vermelha) e área de hemorragia (seta preta) (HE, 2856X). D – Cápsula fibrosa: maior aumento mostrando células gigantes multinucleadas (seta vermelha), neutrófilo (seta amarela) e vaso (seta verde) (HE, 6048X) 48
- FIGURA 23: Fotomicroscopia da interface subcutâneo-implante 45 dias após cirurgia experimental de implantação de compósito PHB 70% e HA 30% no tecido subcutâneo de gatos. A – Pele (linha pontilhada em amarela), tecido subcutâneo e cápsula fibrosa sobre o implante (linha pontilhada em azul) (HE, 658X). B – Cápsula fibrosa em maior aumento mostrando o biomaterial (aspecto birrefringente) no interior de uma célula gigante (seta azul), a seta verde aponta um vaso (HE, 6204X). C – Cápsula fibrosa com intensa neovascularização (setas verdes) (HE, 5414,5X). D – Cápsula fibrosa: maior aumento mostrando neovascularização (setas verdes) e células gigantes (seta vermelha) (HE, 6097X) 49
- FIGURA 24: Fotomicroscopia da interface osso-implante na metáfise distal de fêmur de gatos aos 30 dias. A – Osso trabecular adjacente ao implante (linha pontilhada em amarela), cápsula fibrosa sobre o implante (linha pontilhada em azul), a seta azul aponta fibroplasia e a vermelha o biomaterial (aspecto birrefringente) parcialmente envolvido pela cápsula fibrosa (HE, 119,21X). B – Cápsula fibrosa mostrando infiltrado inflamatório formado principalmente por macrófagos (seta preta) e linfócitos (seta verde). A seta vermelha aponta o biomaterial (aspecto birefringente) no interior de uma célula gigante (HE, 13068X) 52

FIGURA 25:	Fotomicroscopia da interface osso-implante na metáfise distal de fêmur de gatos aos 60 dias. A – biomaterial (aspecto birefringente) circundado por tecido conjuntivo (linha pontilhada em azul) e por tecido ósseo (HE, 3350X). B – Cápsula fibrosa em maior aumento mostrando infiltrado inflamatório formado principalmente por macrófagos (seta azuis) e células gigantes (seta amarela). A seta vermelha aponta o biomaterial (aspecto birefringente) no interior de uma célula gigante e a preta mostra um fibroblasto (HE, 22324,4X)	53
FIGURA 26:	Fotomicroscopia da interface osso-implante na metáfise distal de fêmur de gatos aos 90 dias. A – Área focal de necrose óssea próxima área de implantação do biomaterial (setas vermelhas). Notar a cápsula (linha pontilhada em azul) (HE, 3420X). B – Área focal de necrose óssea (setas vermelhas). As setas amarelas apontam osteoclastos (HE, 32832X)	54
FIGURA 27:	Imagem radiográfica do fêmur esquerdo de gato 21 dias após osteotomia transversal no terço médio e fixação com placa de compósito PHB (70%) e HA (30%). A - projeção crânio-caudal, notar a ruptura da placa (setas vermelhas). B - projeção médio-lateral, notar os focos de ossificação do calo (Setas vermelhas)	58
FIGURA 28:	Imagem radiográfica de três placas de compósito de PHB (70%) e HA (30%) pertencentes ao primeiro lote. Os círculos vermelhos evidenciam manchas radiolucidas que correspondem a bolhas de ar no interior do material	58
FIGURA 29:	Imagem radiográfica de duas placas de compósito de PHB (70%) e HA (30%) pertencentes ao segundo lote. A - placa sem bolhas selecionada para utilização no experimento. B - placa com bolha (circulo vermelho) que foi descartada	58
FIGURA 30:	Imagem radiográfica do fêmur esquerdo de um gato imediatamente após a fixação da osteotomia transversal no terço médio com placa de compósito PHB (70%) e HA (30%) (setas vermelhas). A - projeção crânio-caudal. B - projeção médio-lateral	58
FIGURA 31:	Imagem radiográfica do fêmur esquerdo de um gato 24 horas após a cirurgia para fixação óssea apresentando ruptura da placa de compósito PHB (70%) e HA (30%). A - projeção crânio-caudal. B - projeção médio-lateral	58
FIGURA 32:	Fotografia de duas placas de compósito de PHB (70%) e HA (30%) uma íntegra (B) e outra após ser retirada do animal, apresentando ruptura oblíqua curta passando por um dos orifícios centrais (A)	58

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)	65
--	----

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar o compósito de polihidroxibutirato (PHB) 70% e hidroxiapatita (HA) 30% na forma de placas para fixação em gatos. Foram usadas placas do compósito com 60mm de comprimento por 10mm de largura e espessura variando de 3mm no centro a 5mm nas extremidades, com seis orifícios. As placas foram submetidas aos testes de flexão, compressão e torção, empregando como controle microplacas de aço ASTM-F138 2,0mm. Os resultados foram semelhantes para as forças máximas e torque máximo mas, as placas de compósito se romperam e as de aço apenas se deformaram. Para a avaliação “*in vivo*”, amostras do compósito de 10x10mm foram implantadas no tecido subcutâneo da região dorso-lombar e um fragmento cilíndrico de 4x3mm foi introduzido na região metafisária distal do fêmur direito. Empregou-se 12 gatos adultos jovens, sendo seis machos e seis fêmeas, castrados, sem raça definida e com massa corporal média de 3,5kg. Os gatos foram divididos aleatoriamente em três grupos: GI, GII e GIII de acordo com o tempo de avaliação. As avaliações nos tecidos subcutâneo e ósseo foram realizadas aos 15, 30 e 45 dias e aos 30, 60 e 90 dias respectivamente. A reação subcutânea ao compósito foi caracterizada por uma reação inflamatória granulomatosa com infiltrado misto e predominância de mononucleares, com grande número de macrófagos ativos e células gigantes. No tecido ósseo verificou-se em torno do compósito, a formação de uma camada de tecido conjuntivo fibroso com infiltrado inflamatório composto por mononucleares com predominância de macrófagos e células gigantes. A placa do compósito foi empregada na fixação de osteotomia de fêmur em quatro gatos, totalizando seis intervenções. Verificou-se a ruptura de cinco placas (83,33%) até o quarto dia e de uma placa (16,67%) aos 21 dias, quando se observou um calo ósseo exuberante. Os resultados obtidos no teste tecidual evidenciaram que o compósito não é osteocondutor e não permite a invasão vascular. Os testes mecânicos mostraram mínima ductibilidade do compósito e os resultados da implantação da placa no gato mostraram que o compósito não possui resistência suficiente para ser empregado como placas de fixação de fêmur em gatos.

Palavras Chave: biomateriais, polihidroxibutirato/hidroxiapatita, osteossíntese, gato.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the composite of polyhydroxybutyrate (PHB) 70% and hydroxyapatite (HA) 30% as plates for bone fixation in cats. The employed composite plates presented six orifices and measured 60 and 10 mm, length and width respectively, with thickness ranging from 3 to 5 mm according to the region. The plates were subjected to bending, compression and torsion tests, using as reference a 2 mm stainless steel plate. The results were similar for the maximum forces and torque but, while the plate of composite broke up under the load, the stainless steel plate only presented deformation. For the *in vivo* evaluation, samples of composite measuring 10 x 10 mm were implanted in the subcutaneous tissue of the dorsolumbar region and a cylindrical piece of 4 x 3 mm was introduced in the distal metaphyseal region of the right femur. Twelve adult mixed-breed cats were used; six males and six females, neutered and with mean body weight of 3.5 kg. The cats were randomly distributed into three groups; GI, GII, and GIII, according to the time of evaluation. The assessments were performed at days 15, 30, and 45 for the subcutaneous tissue and at days 30, 60, and 90 for the osseous one. The reaction to the subcutaneous composite was characterized by a granulomatous inflammatory response with mixed infiltrate and predominance of active macrophages and giant cells. There was formation of a layer of fibrous connective tissue around the composite with predominance of macrophages and giant cells. The composite plate was used in the fixation of femoral osteotomy in four cats, in a total of six interventions. There were ruptures in five plates (83.33%) until Day 4 and in one plate (16.67%) on the Day 21, when it was possible to observe an exuberant osseous callus. The results of tissue evaluation demonstrated that the composite does not allow vascular invasion and that it is not osteoconductive. The mechanical tests revealed the minimal ductility of the composite and the clinical results evidenced that the composite does not have sufficient strength to be used as plate of femoral fixation in cats.

Keywords: biomaterial, polyhydroxybutyrate/hydroxyapatite, osteosynthesis, cat.

1 Introdução

As ligas metálicas têm sido estudadas e utilizadas na fabricação de implantes ortopédicos há séculos. São constituídas principalmente por ferro, cobalto, cromo, níquel e titânio que conferem a resistência e dureza necessárias aos implantes (Wang, 2003). No entanto, seqüelas como corrosão, liberação de íons no organismo e osteoporose podem ser observadas após seu emprego (Galvão et al., 1999; Uthoff et al., 2006). Os íons da corrosão podem causar reações adversas como alergia, metalose e reação do tipo corpo estranho (Hu et al., 2004). Cistos periarticulares causados pela liberação de fragmentos metálicos (Niimi et al., 2007) e neoplasias associadas à implantes ósseos metálicos, também têm sido relatados (McDonald et al., 2002).

Apesar das fixações com implantes metálicos serem procedimentos bem sucedidos (Hu et al., 2004), o osso cortical e o metal possuem propriedades mecânicas distintas. O módulo de elasticidade do osso cortical é de aproximadamente 20GPa enquanto o de uma placa óssea de aço inoxidável é cerca de 190GPa (Cordey et al., 2000). Essa diferença faz com que o implante absorva a maior parte das forças atuantes no osso, reduzindo as tensões sobre o mesmo. A diminuição das forças sobre o osso pode levar ao seu enfraquecimento principalmente por osteoporose (Cordey et al., 2000; Sakata et al., 2004; Uthoff et al., 2006). A força mecânica moderada, quando aplicada sobre o tecido ósseo, favorece a atividade osteoblástica e com isso a síntese de matriz óssea (Ocarino e Serakides, 2006; Ocarino et al., 2007; Skerry, 2008). A osteoporose devido à utilização de placas rígidas é causada pelo estresse de proteção. Macroscopicamente verifica-se o alargamento do canal medular e o adelgaçamento da cortical e, microscopicamente, é caracterizada por osteoporose cortical (Wang, 2003; Uthoff et al., 2006). Além disso, a falha óssea

decorrente da retirada dos parafusos atua como fator sinérgico predispondo a outra fratura após a retirada do implante (Elias et al., 1997). Face às complicações decorrentes da implantação de placas metálicas, dispositivos reabsorvíveis tem sido empregados em cirurgias ortopédicas sob forma de placas, pinos e parafusos (An et al., 2000; Wang, 2003). Um dos benefícios dos implantes biodegradáveis utilizados em cirurgias ortopédicas é o de não ser removido, evitando portanto, um segundo procedimento cirúrgico, o que proporciona vantagens biológicas e econômicas (Hu et al., 2004), principalmente no que se refere a animais cuja manipulação excessiva é indesejável como alguns gatos, aves e animais silvestres. A manipulação desses animais geralmente acarreta estresse, interferindo na recuperação e por isso deve ser evitada.

Dentre os materiais utilizados na fabricação de implantes reabsorvíveis destacam-se os biopolímeros e as biocerâmicas. Os compósitos constituídos por polímeros e cerâmicas bioativas são alternativas viáveis para a fabricação de implantes ósseos, pois possuem características físicas e químicas semelhantes ao osso (Doyle, et al. 1991; Boerre et al., 1993; Matsusue et al., 1995; Luklinska e Schluckwerder, 2003; Wang, 2003). Suas propriedades mecânicas podem ser modificadas para prover rigidez durante a regeneração óssea, degradando-se numa velocidade que permita a transferência gradual da tensão do implante para o osso em consolidação, prevenindo assim o acúmulo de tensão no implante (Bergsma et al., 1995; Elias et al., 1997; An et al., 1998; Wang, 2003; Saikku-Bäckström et al., 2005).

Muito tem se pesquisado na tentativa de reduzir o efeito da proteção ao estresse causado pela fixação óssea com placa rígida (Elmaraghy et al., 2001; Uthoff et al., 2006) assim, as placas com módulo de elasticidade semelhante ao do osso surgem como alternativa à fixação rígida, pois

permitem melhor distribuição das forças entre osso e implante evitando os efeitos indesejáveis da proteção ao estresse fisiológico (Ganesh et al., 2005).

O compósito polihidroxibutirato/hidroxiapatita (PHB/HA) tem propriedades bioativas favoráveis para ser utilizado como substituto de tecidos ósseos, pelas suas propriedades físicas, químicas e estruturais que se assemelham à estrutura e composição química do osso. É um compósito biodegradável que permite a osteointegração por substituição do polímero por tecido ósseo (Doyle et al., 1991; Luklinska e Bonfield, 1997; Shishatskaya et al., 2006). Desta forma, o emprego deste produto na forma de placa poderia ser vantajoso, pois além da estabilização, ocorreria a perda gradual da resistência física e sua osteointegração, o que favorece o processo de consolidação da fratura (Ganesh et al., 2005).

As características físicas e químicas do compósito PHB/HA descritas na literatura bem como a escassez de estudos de avaliação mecânica e biológica dos dispositivos de fixação fabricados a partir do compósito PHB/HA, estimulou a realização do presente trabalho que tem como proposta a avaliação do compósito polihidroxibutirato (PHB) 70% e hidroxiapatita (HA) 30% em gatos com vistas a seu futuro emprego em animais de pequeno porte como cães miniatura, gatos, aves e animais silvestres.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomateriais e a reparação óssea

O termo biomaterial foi definido na Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento do Conselho de Saúde nos EUA em 1982, como qualquer substância que não seja droga ou uma combinação de substâncias, sintéticas ou de origem animal, que possa ser utilizada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou

substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo (Jones e Hench, 2003).

A biocompatibilidade é a habilidade de um material desempenhar uma função com resposta apropriada do tecido hospedeiro em uma aplicação específica, sem agressão deste (Davies, 2000; Jones e Hench, 2003; Rezende, 2006). Inicialmente, era considerado biocompatível aquele material totalmente inerte quando implantado no tecido animal, ou seja, sua presença não estimularia nenhuma resposta orgânica. No entanto, esse conceito alterou-se ao se reconhecer que qualquer biomaterial elucida uma resposta do tecido receptor. Além disso, percebeu-se que o mesmo biomaterial poderia mostrar-se biocompatível para uma aplicação ou para um tipo de paciente e incompatível para outras aplicações biomédicas ou para pacientes de diferentes espécies, raças, faixas etárias, sexo, estado geral de saúde (Hench et al., 2006; Rezende, 2006).

A utilização de biomateriais em aplicações ortopédicas possui dois focos, um voltado para a produção de substitutos ósseos e outro direcionado para a produção de próteses e implantes de fixação esquelética (Sá et al., 2007). Os substitutos ósseos são importantes na consolidação de fraturas, especialmente nas cominutivas e com perda óssea, onde é difícil ou até mesmo impossível estabelecer o contato entre as extremidades, sem o encurtamento do osso fraturado. Nesses casos, os enxertos ósseos e seus substitutos são uma alternativa, pois promovem o preenchimento do espaço vazio e favorecem a regeneração óssea por osteocondução, osteoindução e osteogênese, dependendo da composição química e/ou biológica do mesmo (Giannoudis et al., 2005; Duarte et al., 2006; Rezwan et al., 2006). A osteocondução se refere à capacidade de um biomaterial ou enxerto fornecer uma matriz, um arcabouço, passível de ser colonizado, invadido e/ou substituído por células osteoprogenitoras, permitindo assim a formação de um novo tecido ósseo. O termo osteogênese deve ser utilizado apenas para

aqueles enxertos ou preparações que possuam células ósseas viáveis com capacidade de se multiplicar e produzir novo tecido ósseo, e a osteoindução é a capacidade de um biomaterial ou enxerto estimular a multiplicação e diferenciação de células tronco mesenquimais em células osteoprogenitoras e osteoblastos (Geissler, 2006; De Long Jr et al., 2007).

A produção de implantes e próteses ortopédicas é importante na fixação de fraturas e a nas substituições articulares. Para isso a bioengenharia busca materiais mecanicamente resistentes e que incitem resposta orgânica favorável à osteointegração e reparação óssea (Zhao et al., 2002; Rezwan et al., 2006; Rezende, 2006).

2.1.1 Biocerâmicas

Nos últimos 30 anos as cerâmicas bioativas, grupo composto pelos fosfatos de cálcio, biovidros e vidro-cerâmicas, têm sido muito empregadas na substituição óssea. Esses materiais são compatíveis com os tecidos do corpo humano e animal por possuírem em sua composição química íons normalmente encontrados no organismo animal (Wang, 2003; Eppley et al., 2005). As cerâmicas bioativas favorecem a regeneração óssea e a osteointegração dos implantes por possuírem propriedades como osteocondutibilidade, osteofilia e semelhança química e física com a matriz óssea mineral (Oliveira, 2005; Vallet-Regí, 2006). De Long Jr. et al. (2007) salientam que as cerâmicas possuem apenas propriedades osteocondutoras e jamais devem ser consideradas osteoindutoras a menos que estejam associadas a fatores de crescimento ou a outras substâncias osteoindutoras. As biocerâmicas têm sido empregadas na produção de matrizes capazes de absorver fármacos e fatores de crescimento e promover sua liberação controlada (Vallet-Regí, 2006). A confecção de matrizes tridimensionais sintéticas cuja arquitetura mimetiza o osso esponjoso é uma maneira eficiente de promover a cicatrização

de grandes falhas ósseas. Por suas propriedades osteocondutivas, as cerâmicas permitem a migração e adesão de células tronco mesenquimais (CTM), que podem se diferenciar em células osteoprogenitoras, favorecendo a regeneração óssea (Watson, 2005; Vallet-Regí, 2006). O tamanho do poro da cerâmica deve ser semelhante ao do osso esponjoso (Watson, 2005) para permitir a invasão vascular, colonização celular e substituição por tecido ósseo (Geissler, 2006). Chen et al., (2001) recomendam um diâmetro maior que 100-150 μm e Geissler (2006) cita que o diâmetro dos poros deve variar entre 150 e 500 μm , mas salienta que poros muito amplos podem enfraquecer o implante. De Long Jr. et al (2007) relatam que o tamanho ideal dos poros deve ser de 300 a 500 μm , pois permite maior colonização do implante. Os autores advertem ainda que a presença de interconectividade entre os poros é tão importante quanto o tamanho, pois influencia diretamente na tensão de oxigênio, fator de importância relevante na diferenciação das células tronco mesenquimais em células osteoprogenitoras e dessas em osteoblastos. Ao estudar a colonização e diferenciação de células tronco mesenquimais em arcaço de hidroxiapatita, Mygind et al. (2007) relatam uma maior colonização nas amostras cujo diâmetro médio do poro era de 500 μm e uma maior diferenciação celular nas amostras cujo diâmetro médio era 200 μm . As biocerâmicas possuem diferentes características químicas que refletem diretamente na sua reabsorção. A cristalinidade da cerâmica representa o grau de organização e de ligação das moléculas sendo que quanto mais cristalina a amostra, maior é a ligação entre as moléculas e menor a taxa de dissolução, conseqüentemente mais lenta é a reabsorção (Watson, 2005; De Long Jr. et al., 2007). A taxa de reabsorção difere entre os fosfatos de cálcio, sendo que a maior reabsorção é observada nos fosfatos amorfos de cálcio, seguida pelos fosfatos tetracálcico, α -fosfato tricálcico, β -fosfato

tricálcico e hidroxiapatita em ordem decrescente. O termo fosfato de cálcio é utilizado genericamente para definir um extenso grupo de substâncias que possuem essa composição em suas moléculas. Dentre eles estão a hidroxiapatita (HA), o fosfato tricálcico (TCA) e o fosfato de cálcio bifásico (formado pela mistura de TCA com HA) (Eppley et al., 2005; Vallet-Regí, 2006). A capacidade desses materiais de ligar-se quimicamente ao osso através da superfície do implante se dá pela formação de micro-cristais de apatita semelhante à apatita óssea, que permitem o crescimento de tecido ósseo e a osteointegração (Oliveira, 2005; Pereira et al., 2006). Alterações teciduais no microambiente de implantação da cerâmica como aumento da acidez, edema e aumento de temperatura local podem também acelerar a reabsorção da cerâmica (Eppley et al., 2005).

A hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$) é uma das cerâmicas mais difundidas e utilizadas em cirurgias ortopédicas para preenchimento de falhas ósseas e na confecção de compósitos para emprego ortopédico (Duarte et al., 2006). É encontrada nos ossos, sendo o principal constituinte da matriz mineral, constituindo cerca de 70 a 95% (Eppley et al., 2005; Pereira et al., 2006). É lentamente biodegradável e pode ser produzida na forma porosa, o que provê uma estrutura para invasão do tecido receptor, aumentando a ligação osso-implante na sua interface (Giannoudis et al., 2005; Duarte et al., 2006). Sua reabsorção ocorre principalmente por osteoclasia (Murphey et al., 1992). A hidroxiapatita é atóxica, pode ser produzida no tamanho e na quantidade desejada, pode ser recortada, esterilizada e guardada por longos períodos de tempo à temperatura ambiente (Cullum et al., 1988; Oguchi et al., 1995; Manjubala et al., 2002; Pereira et al., 2006). A hidroxiapatita porosa permite a invasão e o crescimento interno de tecido ósseo, mas apresenta baixa taxa de dissolução e lenta reabsorção (Blitterswijk et al., 1985; Geissler, 2006). Estudos efetuados por

longos períodos de tempo têm mostrado que a hidroxiapatita começa a ser reabsorvida quatro a cinco anos após sua implantação óssea (Pereira et al., 2006). A hidroxiapatita é capaz de se ligar fortemente ao osso adjacente, por ligações dipolo, promovendo a osteointegração (Geissler, 2006; Pereira et al., 2006). De Long Jr. et al. (2007) relatam que melhores resultados são observados quando se adiciona as cerâmicas a outros compostos com propriedades osteoindutivas e osteogênicas tais como fatores de crescimento, matriz óssea desmineralizada, aspirado de medula óssea. Os autores citam que não houve diferença significativa em estudos clínicos comparativos do uso de cerâmicas bioativas associadas a fatores de crescimento e enxertos autógenos de crista ilíaca na reparação de fraturas.

Dados recentes indicam que as cerâmicas à base de cálcio podem possuir ação osteoindutiva por aumentarem a acidez local, provocando desmineralização de matriz e liberação de proteínas ósseas morfogênicas, as quais são capazes de estimular o crescimento e diferenciação de células ósseas, resultando assim em um efeito estimulatório (Watson, 2005). Outros pesquisadores sugerem que as propriedades físico-químicas e estruturais do material sejam capazes de iniciar o processo de diferenciação celular (Habibovic et al., 2006).

2.1.2 Biopolímeros

Os polímeros possuem uma longa e bem sucedida história na medicina, sendo utilizados na produção de artigos médico-hospitalares como equipos, cateteres, fios, placas, pinos, parafusos e vários tipos de próteses, principalmente ortopédicas e cardiovasculares. Como exemplo pode-se citar o polimetilmetacrilato e o polietileno de alto peso molecular utilizados na confecção de próteses articulares (coxofemoral e de cotovelo) (Wang, 2003). Muitos outros polímeros são utilizados no campo biomédico e dentre eles estão o

poliuretano, polytetrafluoretileno, policloreto de vinila, poliamidas, poliacetato e policarbonato (An et al., 2000; Wang, 2003). Com o crescimento da engenharia de tecidos, os polímeros ganharam uma posição de destaque entre os demais biomateriais principalmente por apresentarem características desejáveis como matriz de compósitos bioativos (Wang, 2003). Dentre os mais adequados para substituição de tecidos ósseos e fabricação de implantes ortopédicos estão os polímeros biodegradáveis do grupo dos polihidroxiácidos. Os mais conhecidos e utilizados são o poli(ácido láctico) - PLA, o poli(ácido glicólico) - PGA, a polidioxanona - PDS e o poliglecapone. Recentemente uma gama de outros polímeros pertencentes ao grupo dos polihidroxiálcanoatos também estão sendo utilizados, como o polihidroxi butirato - PHB, o polihidroxi valerato - PHV e o copolímero polihidroxi butirato-co-hidroxi valerato - PHBV (Gogolewski et al., 1993; Zhao et al., 2002; Wang, 2003).

Os polihidroxiálcanoatos são poliésteres naturais produzidos por bactérias como reserva energética intracelular. O polihidroxi butirato (PHB) é o principal representante desse grupo de polímeros, é biocompatível, reabsorvível (Vainiopää et al., 1986; Gogolewski et al., 1993; Rezwan et al., 2006) e pode ser produzido por várias espécies bacterianas. No Brasil, ele é produzido comercialmente utilizando os resíduos da cana de açúcar. A espécie de bactéria utilizada no Brasil é a *Alcaligenes eutrophus* e produz um rendimento de PHB da ordem de 70 a 80% de seu peso seco (Nascimento, 2001). Em sua forma natural, o PHB é um poliéster linear formado pela polimerização de cadeias abertas de diésteres cíclicos (An et al., 2000; Wang, 2003). A degradação desse polímero depende de uma série de fatores como o tamanho do implante, a fase do material (cristalina ou amorfa), presença de aditivos ou impurezas, das características físico-químicas do local de implantação, do

estresse a que o implante será submetido, e das características individuais de cada hospedeiro (Oréface, 2006). De modo geral, esse material é lentamente degradado. A degradação ocorre inicialmente por hidrólise inespecífica catalisada pelos próprios grupos carboxílicos terminais do polímero. Em seguida, os metabólitos intermediários são quebrados por enzimas do ciclo do ácido tricarbóxico, produzindo no final da cadeia água e dióxido de carbono (Doyle et al., 1991; An et al., 2000). O PHB é descrito como material provido de resistência para ser utilizado como matéria prima para a fabricação de enxertos ósseos, principalmente quando reforçados com partículas de cerâmica bioativa como a hidroxiapatita e o biovidro (Konwles et al., 1992; Konwles e Hastings, 1992; Zhao et al., 2002; Luklinska e Schluckwerder, 2003; Wang, 2003; Li et al., 2005; Liu e Wang, 2005; Shishatskaya et al., 2006). Os biopolímeros são especialmente favoráveis à fabricação de compósitos biodegradáveis, pois permitem a osteointegração por substituição do polímero (Doyle et al., 1991; Luklinska e Bonfield, 1997; Liu e Wang, 2005). Outras vantagens podem ser evidenciadas como a possibilidade de serem combinados com outros compostos terapêuticos como drogas para o tratamento de infecções, fatores que estimulam o crescimento ósseo e biocerâmicas que contribuem para a osteointegração e favorecem a proliferação óssea (Wang, 2003; Hu et al., 2004; Vallet-Regí, 2006).

Os compósitos constituídos por polímeros e cerâmicas bioativas são alternativas viáveis para a fabricação de implantes ósseos, pois possuem características físicas e químicas semelhantes ao osso (Doyle et al., 1991; Boerre et al., 1993; Luklinska e Schuckwerder, 2003). Suas propriedades mecânicas podem ser modificadas para prover rigidez durante a reparação óssea, degradando-se numa velocidade que permita a transferência gradual da tensão do implante para o osso em consolidação, prevenindo assim o acúmulo de tensão no

implante e o estresse de proteção (Bergsma et al., 1995; Elias et al., 1997; An et al., 1998; Wang, 2003).

Doyle et al., (1991) reportam que a HA quando adicionada ao PHB aumenta o módulo de elasticidade do compósito para um valor próximo ao do osso cortical (7-25GPa), no entanto, a ductibilidade do compósito decresce proporcionalmente ao aumento da quantidade de HA presente no material. Em um estudo de avaliação da reação tecidual ao compósito de polihidroxibutirato e hidroxiapatita (PHB/HA) Luklinska e Schluckwerder (2003) citam aumento significativo na formação de osso lamelar na superfície dos implantes ósseos e a presença de osteoblastos e osteócitos uniformemente distribuídos em torno do implante. Isso indica uma forte interação do compósito ao tecido ósseo adjacente o que é desejável em implantes ortopédicos.

Todos os implantes ortopédicos precisam ser esterilizados e para isso vários processos físicos e químicos podem ser utilizados. O uso de temperatura e pressão elevadas, de ondas eletromagnéticas de alta energia como raios x e raios gama e o uso de gases como óxido de etileno são rotineiramente empregados para esse fim. No entanto, os polímeros são passíveis de degradação quando submetidos a situações de alta energia. Pressões hidrotérmicas e temperaturas elevadas podem levar a degradação térmica ou hidrolítica desses materiais. Ondas eletromagnéticas também podem causar a clivagem das cadeias poliméricas. Assim, o uso do óxido de etileno é o método mais recomendado para esterilização desses materiais (Oréfice, 2006).

2.2 Fisiologia óssea

O osso é um tecido duro com a função mecânica que permite a locomoção e o posicionamento do animal em vários decúbitos e adicionalmente exerce a função de proteção de órgãos vitais como o

encéfalo, coração e pulmões (Rahn, 2002; Roe, 2003; Piermattei et al., 2006). Além disso, o osso exerce a função metabólica no equilíbrio da homeostasia dos íons cálcio e fósforo, que representam aproximadamente dois terços do peso total do osso (Rahn, 2002; Stiffler, 2004; Thompson, 2007). Sua outra importante função está relacionada com a hematopoiese. As linhagens precursoras das células sanguíneas estão presentes na medula óssea dos ossos de animais jovens e nas epífises dos ossos longos de animais adultos, constituindo o reservatório de tecido hematopoiético mais importante em quantidade e atividade no animal adulto (Rahn, 2002).

Existem múltiplos mecanismos homeostáticos que atuam sobre o tecido ósseo para regular suas funções de formação e reabsorção óssea. Dentre eles destacam-se os mecanismos hormonais ligados à calcitonina, ao paratormônio, aos andrógenos, aos estrógenos, ao cortisol, ao hormônio do crescimento e à tiroxina, bem como os mediadores químicos como as prostoglandinas, os leucotrienos, as citocinas [Interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral (FTN)] e os fatores de crescimento (epidermal, fibroblástico, derivado de plaquetas). As vitaminas D, E e C também são importantes no metabolismo ósseo principalmente a vitamina D (Rahn, 2002;Thompson, 2007).

As forças mecânicas também têm ação na remodelação óssea e influenciam a reparação de fraturas (Ocarino et al., 2007; Skerry, 2008). É importante ressaltar que a imobilização de uma fratura é um dos fatores que mais interfere no período de recuperação. A ausência completa de força sobre o tecido ósseo pode produzir osteoporose não só no osso acometido pela fratura, mas também em todo o membro (Perren, 2002; Uthhoff et al., 2006).

Na presença de uma fratura a circulação medular é frequentemente interrompida e a irrigação dos fragmentos é feita pelas artérias metafisárias e pela irrigação extra-óssea proveniente principalmente, dos vasos

periosteais (Rahn, 2002; Hulse e Hyman, 2003; Stiffler, 2004). A utilização de placas e parafusos fornece maior estabilidade à fratura, permitindo o retorno precoce da circulação medular, no entanto, o suprimento sanguíneo do osso cortical sob a placa fica prejudicado (Perren, 2002; Sod et al., 2005; Piermattei et al., 2006). Para minimizar esse problema, novos modelos de placas com baixo contato têm sido propostos, bem como o uso de placas reabsorvíveis que permitem o retorno gradual da atuação das forças sobre o osso (Ganesh et al., 2005; Saikku-Bäckström et al., 2005; Uthoff et al., 2006).

2.3 Biomecânica e as Fraturas

Devido a sua composição (hidroxiapatita, colágeno, proteínas não colagênicas e elementos celulares) os ossos experimentam uma pequena deformação elástica (reversível) antes da deformação plástica (irreversível) que culmina com a fratura do osso. A resistência e a rigidez do osso dependem da sua composição, morfologia e porosidade. O colágeno tipo I compõe cerca de 90% da matriz óssea e é o principal responsável pela resistência óssea. Ele impede que a apatita, material rígido e quebradiço, se rompa originando uma fratura. Por outro lado, a hidroxiapatita é responsável pela rigidez óssea e impede a excessiva deformação do colágeno. A resistência também está associada à arquitetura e à porosidade do tecido ósseo. O osso cortical, mais resistente, possui baixa porosidade (5 a 30%) enquanto o osso esponjoso, menos rígido e menos resistente, é altamente poroso variando de 30 a 90%. As características físicas e estruturais como geometria, comprimento e curvatura também interferem na resistência e na distribuição das forças no tecido ósseo. Os parâmetros morfológicos mais relevantes são a área de corte transversal e o comprimento ósseo (Radasch, 1999; Husel e Hyman, 2003). A resposta do tecido ósseo à aplicação de cargas também está relacionada com fatores

mecânicos como velocidade e orientação das forças aplicadas (Husel e Hyman, 2003; Sod et al., 2006; Esenkaya et al., 2007).

Durante o caminhar de um cão a força de reação ao solo iguala-se a 30% do peso corpóreo em cada membro torácico e a 20% em cada membro pélvico. No entanto, devido à aceleração e ao impulso, essa força pode aumentar em cinco ou mais vezes em um trote mais rápido, na corrida ou na aterrissagem de um salto. A força fisiológica de reação ao solo é transmitida aos ossos através das superfícies articulares, podendo produzir forças de compressão axial, flexão e torção sobre eles (Radasch, 1999; Husel e Hyman, 2003). Durante o movimento essas forças são equilibradas pela contração da musculatura, permitindo assim a coordenação e o equilíbrio do movimento. Na presença de uma fratura, essas forças devem ser neutralizadas e transmitidas para o implante empregado na fixação do osso (Husel e Hyman, 2003; Saikku-Bäckström et al., 2005; Sod et al., 2006; Esenkaya et al., 2007). Quando a força é aplicada excêntrica, fora do eixo de neutralidade óssea, ocorre a sua decomposição em momentos de flexão e de compressão. A força concêntrica produz apenas compressão. Os ossos submetidos a cargas excêntricas como fêmur e úmero suportam maior força de flexão e os ossos submetidos a cargas concêntricas, como o metacarpo equino, suportam maior força compressiva. Outros fatores que também determinam a distribuição e decomposição das forças são a forma e a posição anatômica de cada osso (Radasch, 1999; Husel e Hyman, 2003; Hammel et al., 2006).

A força de tração atua sobre o eixo longitudinal do osso tentando alongá-lo, sendo mais importante nas fraturas por avulsão. A força de compressão também atua sobre esse mesmo eixo, mas no sentido oposto e é mais relevante nas fraturas por impactação ou com afundamento. As forças de cisalhamento estão relacionadas às direções oblíquas ou paralelas à superfície de corte transversa do osso e podem causar o

encurtamento e deslocamento lateral dos fragmentos ósseos. A força de flexão atua sobre um ponto focal específico do osso, gerada principalmente nas fraturas transversas e oblíquas curtas (linha de fratura com angulação menor que 45°). A flexão também pode ocorrer com a aplicação de uma força axial excêntrica e quando o osso apresenta uma anatomia curva que gera uma força de tensão em um lado (convexo) do osso e de compressão no lado oposto (côncavo). A força de torção promove a rotação em torno do eixo longitudinal do osso e geralmente leva a fraturas espirais. A rotação é classicamente considerada como o movimento mais deletério na consolidação de fraturas (Radasch, 1999; Hulsel e Hyman, 2003).

Didaticamente, as quatro forças fisiológicas primárias são separadas em compressão axial, tensão axial, flexão e torção. Entretanto, clinicamente essas forças atuam em combinação resultando em um padrão complexo de tensões e compressões internas nos ossos e nos implantes utilizados na fixação de fraturas. O conhecimento dessas forças bem como daquelas de cisalhamento geradas, é fundamental na seleção e aplicação dos implantes utilizados na estabilização de uma fratura (Cordey et al., 2000; Hulsel e Hyman, 2003; Roe, 2003).

2.4 Placas de fixação óssea

A fixação esquelética interna é utilizada há mais de 100 anos. O primeiro pesquisador a utilizar placas metálicas na fixação de fraturas foi Lane, em 1895, e desde então vários estudos foram e continuam sendo realizados na tentativa de encontrar o melhor método de fixação óssea (Van Frank Haasnoot et al., 1995; Perren, 2002). As placas metálicas sofreram modificações ao longo dos anos, bem como o conceito de imobilização de fraturas. As placas de compressão dinâmica (DPC) por exemplo, representaram uma revolução na ortopedia, mas a osteoporose observada após seu emprego levou ao desenvolvimento de

placas de compressão de baixo contato (LC-DPC), com redução de 50% na área de contato placa-osso (Uthoff et al., 2006). Em 1995, Van Frank Haasnoot et al. observaram que a presença de calo ósseo é um sinal de resposta orgânica favorável à regeneração óssea, contrariando todos os princípios da fixação rígida sendo introduzidos então, os princípios da osteossíntese biológica com ênfase não apenas na estabilidade dos fragmentos, mas também na preservação da vascularização e das necessidades biológicas de cada segmento ósseo (Perren, 2002; Roe, 2003; Piermattei et al., 2006). Entretanto, os implantes metálicos possuem módulo de elasticidade (190GPa) muito superior ao do osso cortical (20GPa) (Cordey et al., 2000). Essa diferença faz com que o implante absorva a maior parte das forças atuantes no osso, prevenindo o estresse mecânico sobre o mesmo. A força mecânica é importante no metabolismo ósseo, pois produz sinais endógenos que interferem nos processos de remodelação óssea. Esses sinais são captados por um sistema mecanossensorial no qual o osteócito é a principal célula responsável por transformar o estímulo mecânico em sinais bioquímicos que regulam a remodelação óssea. A força mecânica moderada, quando aplicada sobre o tecido ósseo, favorece a atividade osteoblástica e com isso a síntese de matriz óssea (Ocarino e Serakides, 2006; Ocarino et al., 2007; Skerry, 2008). Em busca de implantes que neutralizem as forças de flexão e torção, mas que permitam a micromovimentação no foco de fratura no eixo axial, novos modelos de placa foram desenvolvidos. Um deles consiste em uma placa que permite a micromovimentação axial (AFP) e é composta por uma parte rígida de metal com orifícios ovais onde se encaixa uma parte com menor módulo de elasticidade, de polimetilmetacrilado com encaixes circulares que permitem a micromovimentação do foco de fratura apenas no sentido axial (Foux et al., 1997). O outro modelo é uma placa de compressão

axial (ACP) composta de uma placa metálica rígida com orifícios parcialmente recobertos por ácido polilático (PLA) que é lentamente reabsorvido pelo organismo, permitindo a transmissão parcial de carga para o osso, reduzindo o estresse de proteção. No entanto, em um estudo piloto em cães, houve a rápida reabsorção do ácido polilático (duas semanas) com instabilidade precoce e retardo na consolidação (Backman et al., 2004).

O foco atual dos estudos sobre métodos de fixação óssea é o desenvolvimento de um sistema de fixação que seja capaz de prover rigidez durante a regeneração óssea, mas que permita a transferência gradual da tensão do implante para o osso em consolidação, minimizando assim o acúmulo de tensão no implante e o estresse de proteção (Bergsma et al., 1995; Elias et al., 1997; An et al., 1998; Wang, 2003; Uthoff et al., 2006).

3. Material e Métodos

3.1 Preparação dos implantes

As placas constituídas por compósito de Poli- β -hidroxi-butilato¹ 70% e hidroxiapatita² 30% foram confeccionadas no laboratório JHS³. Os implantes apresentavam forma retangular com 85mm de comprimento por 10mm de largura e espessura variando de 3mm no centro da placa para 5mm nas extremidades. Uma superfície era plana e a outra côncava que foi justaposta ao fêmur (Fig.1). Todas as placas foram acondicionadas individualmente em embalagens comerciais⁴ produzidas com papel cirúrgico e filme laminado de poliéster e polipropileno e esterilizadas em óxido de etileno. Imediatamente antes da cirurgia, as placas foram raspadas com uma lâmina de bisturi, cortadas no tamanho de 60mm de

comprimento e foram feitos seis orifícios equidistantes entre si (Fig.1). Para sua fixação no fêmur foram utilizados parafusos⁵ de aço inoxidável ASTM-F138 de 2mm de diâmetro, do tipo bicortical com comprimento variável de acordo com a espessura do osso.

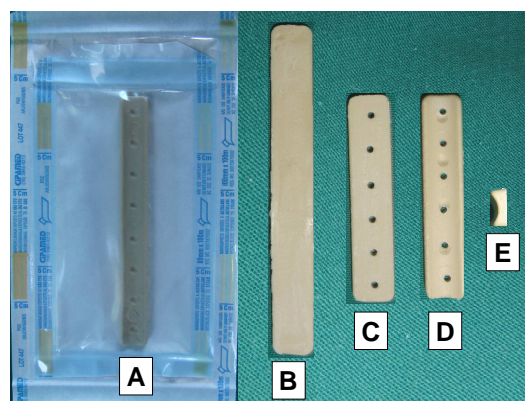


FIGURA 1: Placa de fixação óssea composta de PHB (70%) e HA (30%). A - placa estéril dentro da embalagem de papel cirúrgico e filme laminado de poliéster e polipropileno. B - placa estéril após ser retirada da embalagem, vista da superfície plana. C - superfície plana da placa com os orifícios. D - superfície côncava da placa com orifícios. E - espessura e forma da placa.

3.2 Testes de resistência mecânica da placa

Para melhor padronização dos testes mecânicos, foi necessária a confecção de modelos de fêmur em acrílico (metilmetacrilato⁶). Para a produção dos modelos confeccionou-se um molde (Fig.2) em gesso de secagem rápida devido à facilidade de manipulação do material e ao seu baixo custo. Os moldes foram feitos a partir de um único osso fêmur de gato, recolhido na sala de necropsia e preparado para esse fim. A produção do molde se deu em duas etapas. Iniciou-se com a confecção de meio molde imergindo-se a metade caudal do osso fêmur de gato em uma massa

¹ Biocycle (PHB Industrial) Serrana, São Paulo

² HAP-91[®] (JHS Laboratório Químico S/A), Sabará, Minas Gerais.

³ JHS Laboratório Químico S/A, Sabará, Minas Gerais

⁴ Embalagem para esterilização (Cipamed Embalagens Médico-Hospitalares), Ribeirão Preto, São Paulo.

⁵ Ortovet-Ortopedia veterinária comercial Ltda, São Paulo, São Paulo.

⁶ JET acrílico auto-polimerizante (Artigos odontológicos clássicos Ltda), São Paulo, São Paulo.

densa de gesso localizada em uma caixa proporcional ao tamanho do fêmur. Após a secagem desta, foi aplicada uma camada de óleo mineral na superfície do molde para facilitar sua separação após a adição da segunda metade da massa de gesso. Após a secagem, as duas metades do gesso foram separadas e o osso foi cuidadosamente desprendido do molde e mantido à parte. Em seguida foi feito um orifício, com cerca de 1cm de diâmetro, na extremidade do molde correspondente a epífise distal do fêmur. O orifício localizou-se nas duas metades do molde de gesso e sua confecção foi feita manualmente, com o auxílio de uma lâmina cortante. Após a perfuração do molde, as duas metades foram unidas com fita adesiva e foi introduzida a resina acrílica, por gravidade imediatamente após a mistura dos co-polímeros pó⁷ e líquido⁸ na proporção de 60% por 40% respectivamente. Após a secagem do acrílico, cerca de 10 minutos, o modelo acrílico foi retirado do molde e foram confeccionados os corpos de prova. Para isso, o modelo foi seccionado no terço médio com serra manual⁹ e fixado com placas de aço ou de compósito. Foram constituídos dois grupos, GA e GB. O grupo A foi constituído pelo modelo seccionado e fixado com microplacas¹⁰ de aço (ASTM-F138) 2,0, retas, com oito orifícios, com 60mm de comprimento por 5mm de largura e 1,2mm de espessura. O grupo B foi constituído pelo modelo seccionado e fixado com placas de compósito de polihidroxibutirato (70%) e hidroxiapatita (30%), com seis orifícios de 3mm de diâmetro equidistantes entre si. O tamanho da placa foi reduzido para 60 mm de comprimento, mantendo-se a espessura e a largura originais.

Para padronização dos tempos, forças e velocidades de deslocamento e também para

⁷ JET acrílico auto-polimerizante co-polímero pó (Artigos odontológicos clássicos Ltda), São Paulo, São Paulo.

⁸ JET acrílico auto-polimerizante co-polímero líquido (Artigos odontológicos clássicos Ltda), São Paulo, São Paulo.

⁹ Arco de serra (Tramontina), Macaé, Rio de Janeiro.

¹⁰ Microplaca reta 2mm 8 furos (Hexagon industria de aparelhos ortopédicos Ltda), Campinas, São Paulo.

conhecimento do momento da falha dos implantes, foi realizado um teste piloto empregando-se um exemplar de cada placa para cada teste mecânico. Após a padronização dos testes foram realizadas três repetições para cada teste no grupo A e cinco no grupo B. Todos os ensaios mecânicos foram realizados no laboratório de Biomateriais do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola de Engenharia da UFMG.



FIGURA 2: Fotografia do molde de gesso utilizado para confeccionar os modelos de fêmur esquerdo de gato em metilmetacrilato.

A metodologia utilizada para realização dos testes de flexão com quatro pontos de apoio e de torção foram adaptadas de estudos semelhantes realizados por Sod et al. (2005) e (2006). Para esses testes os modelos de osso foram seccionados transversalmente em seu ponto médio e fixados com as placas.

Para o teste de flexão com quatro pontos utilizou-se uma máquina universal de ensaios EMIC DL 3000¹¹ (Fig.3), com célula de carga de 2000N e velocidade de deslocamento de 10mm/s. A base de apoio foi fixada a uma distância de 80mm. Os pontos de aplicação de força eram equidistantes à linha de secção (ponto médio da diáfise femoral) e mantinham uma

¹¹ EMIC DL 3000 (EMIC equipamentos e sistemas de ensaio Ltda), São José dos Pinhais, Paraná.

distância de 20mm da mesma, totalizando 40mm entre os pontos de aplicação de força (Fig.3).

Foi considerada falha no teste de flexão com quatro pontos, a ruptura dos corpos de prova ou a diminuição da força de resistência dos mesmos. Foi registrado o evento que aconteceu primeiro.

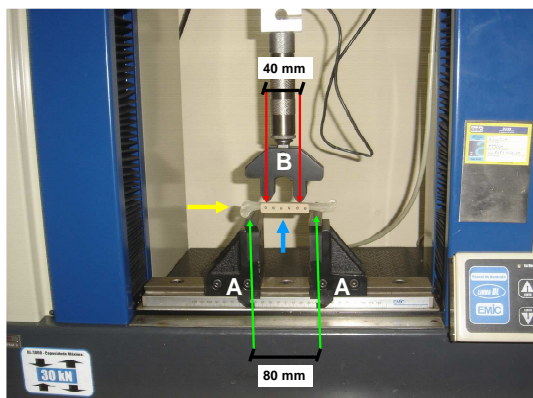


FIGURA 3: Fotografia mostrando a máquina utilizada no ensaio de flexão com quatro pontos utilizando corpo de prova constituído pelo modelo ósseo em acrílico, fixado pela placa de PHB (70%) e HA (30%) (indicado pela seta amarela). (A) constitui a base para realização do teste e seus pontos de apoio estão distantes 80mm (setas verdes). (B) mostra os pontos de aplicação de força e estão equidistantes da linha de secção (seta azul) e distantes 40mm entre si (setas vermelhas).

O equipamento utilizado no ensaio de torção consistiu basicamente de uma máquina hidráulica de torção¹² (Fig.4), uma unidade computadorizada MTS Teststar IITM com software Testware SXTM para controle hidráulico e aquisição de dados. Foi utilizada uma célula de torque de 250Nm e um taxa de deslocamento constante de 0,17rad/seg. O ensaio foi realizado até a ruptura do corpo de prova ou até o final do ciclo de uma volta completa. Para o encaixe dos corpos de prova à máquina de torção foi necessária a confecção de duas peças de adaptação. Essas peças foram confeccionadas com os sítios de encaixe dos corpos de prova em forma cilíndrica, com

¹² Máquina hidráulica de ensaios de torção MST modelo 66.11A.02

20mm de diâmetro interno e com dois orifícios por onde passava o parafuso de fixação (Fig.4). Os corpos de prova foram também confeccionados com as regiões epifisárias de forma cilíndrica, com 20mm de diâmetro externo, o que permitiu sua perfeita junção às peças de adaptação. Após o encaixe do corpo de prova às peças de adaptação o sistema foi levado à unidade de torção para o ensaio. Foi considerada falha no teste de torção, a ruptura dos corpos de prova ou a redução do torque dos mesmos. Foi registrado o evento que aconteceu primeiro.

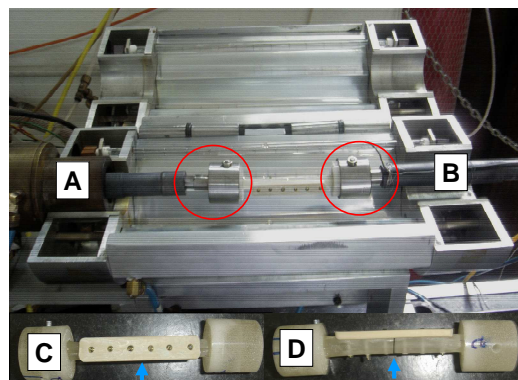


FIGURA 4: Fotografia mostrando a máquina de torção. Os círculos vermelhos evidenciam as peças de adaptação que permitiram o encaixe do corpo de prova à unidade de torção. A - peça responsável pela aferição do ângulo de deslocamento. B - peça responsável pela aferição do torque. C - corpo de prova em uma visão da superfície plana da placa. B - corpo de prova em uma visão lateral. A seta azul aponta a linha de secção do modelo.

A metodologia utilizada para realização do teste de compressão axial foi adaptada de um estudo semelhante realizado por Esenkaya et al. (2007). Para esse teste foi retirado um fragmento de 5mm de extensão no ponto médio da diáfise do modelo em acrílico. A fixação da placa no modelo foi feita mantendo-se este defeito. Empregou-se para esse teste uma máquina universal de ensaios EMIC DL 3000¹³ com duas bases (pratos) de compressão. A célula de carga

¹³ EMIC DL 3000 (EMIC equipamento e sistemas de ensaio Ltda), São José dos Pinhais, Paraná.

utilizada foi de 2000N com velocidade de deslocamento de 10mm/s. Para o apoio dos corpos de prova e para sua permanência na posição vertical (perpendicular às bases) as regiões correspondentes às epífises dos corpos de prova foram confeccionadas de forma cilíndrica com superfícies regulares e planas (Fig.5). Foi considerada falha no teste de compressão axial a ruptura dos corpos de prova ou a diminuição da força de resistência dos mesmos, registrando-se o que acontecesse primeiro.

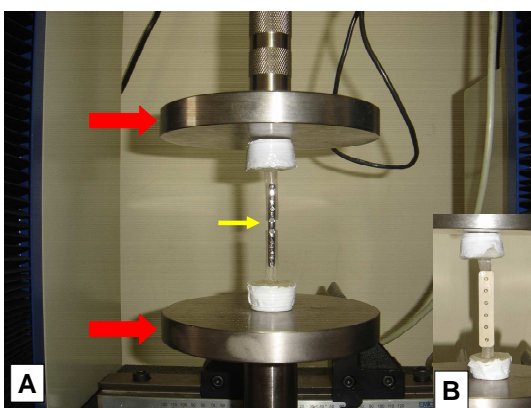


FIGURA 5: Fotografia da máquina universal de ensaios EMIC DL 3000 empregada no ensaio de compressão axial. A - modelo fixado com placa de aço. B - modelo fixado com a placa de compósito. A seta amarela aponta para o defeito de 5mm localizado no terço médio do modelo e as setas vermelhas apontam as bases de apoio utilizadas no teste.

3.3 Implantação do compósito no tecido subcutâneo e no tecido ósseo.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) segundo o protocolo n°. 125/2007 (Anexo-1). Foram utilizados 12 gatos adultos jovens sendo seis machos e seis fêmeas, sem raça definida, com massa corporal média de 3,5kg, provenientes do gatil do serviço de controle de zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Uberaba. Os animais foram inicialmente avaliados por meio do exame clínico geral e ortopédico, selecionando aqueles clinicamente saudáveis e que apresentavam deambulação normal e ausência de alterações ósseas aos exames

clínico e radiográfico. No período de quarentena os animais foram submetidos a exames laboratoriais (hemograma, pesquisa de hemoparasitas e urinálise), foram desverminados¹⁴, vacinados¹⁵ e receberam medicação ectoparasiticida¹⁶. Durante toda a fase experimental os gatos foram mantidos em gatis individuais com área de 0,42m², pertencentes ao Centro de Experimentação Animal do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, onde receberam ração comercial e água a vontade.

No pré-operatório os animais foram submetidos a jejum sólido de oito horas e hídrico de duas horas. Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico que constituiu da administração de xilazina¹⁷ (1mg/kg IM) e quetamina¹⁸ (15mg/kg IM), na mesma seringa, para indução anestésica. Após a tricotomia e cateterização da veia cefálica, os animais receberam propofol (3mg/kg IV) para complementação da anestesia e intubação. A manutenção anestésica foi realizada por meio da inalação espontânea de isoflurano¹⁹, diluído em oxigênio puro, em circuito semifechado de baixo fluxo. Como analgésico e antiinflamatório foi administrado meloxicam²⁰ (0,2mg/kg IM) imediatamente após a indução anestésica. A preparação para a cirurgia foi feita de maneira rotineira, com tricotomia da região dorso-lombar até a articulação tíbio-társica do membro pélvico direito. A antisepsia foi realizada após posicionamento do animal na mesa cirúrgica, com degermante à base de iodo²¹ e álcool iodado.

¹⁴ Endogard pour-on (Virbac do Brasil Industria e Comércio Ltda), Jurubatuba, São Paulo.

¹⁵ Nobivac Raiva e Nobivac Tricat (Intervet International B.V.), Arnhem, Gelderland.

¹⁶ Dropline pour-on gatos (Virbac do Brasil Industria e Comércio Ltda), Jurubatuba, São Paulo.

¹⁷ Kensol (König do Brasil Ltda) Indianópolis, São Paulo.

¹⁸ Vetanarcol (König do Brasil Ltda), Indianópolis, São Paulo.

¹⁹ Isoran (Instituto BioChimico Industria Farmacêutica Ltda), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

²⁰ Maxican 0,2% (Ouro Fino Saude Animal Ltda), Cravinhos, São Paulo.

²¹ Dermoidine (Gessy-Lever Ltda), São Paulo, São Paulo.

Com o animal em decúbito ventral realizou-se a antisepsia da região dorso-lombar, compreendida entre a 12^a vértebra torácica e a primeira coccígea. A área cirúrgica foi delimitada com panos de campo. Uma incisão cutânea, paralela à linha média dorsal e a cerca de 3,5cm dela, foi realizada na altura da 3^a a 5^a vértebras lombares. O tecido subcutâneo foi divulsionado com um pinça hemostática e um fragmento da placa de 10x10mm foi implantado. Após a colocação do implante a pele foi suturada com fio de nylon monofilamentar²² 4-0 padrão simples separado. O mesmo procedimento foi realizado na região contra lateral.

Após a implantação do compósito no tecido subcutâneo, o animal foi colocado em decúbito lateral esquerdo, a antisepsia foi realizada no membro pélvico direito, estendendo-se da articulação tíbio-társica até a linha média dorsal e a área operatória foi então delimitada com panos de campo. Uma incisão cutânea crânio-lateral de aproximadamente 3cm de comprimento foi realizada no terço distal do fêmur. O tecido subcutâneo e a fáscia lata foram incisados, seguindo-se o afastamento dos músculos bíceps femoral e vasto lateral segundo Piermattei e Johnson (2004), para exposição da região metafisária distal do fêmur direito (Fig.6). O periósteo foi seccionado longitudinalmente e suas margens afastadas. Um orifício foi realizado com uma broca de 4mm de diâmetro, utilizando-se furadeira pneumática²³ com rotação controlável e irrigação constante com solução fisiológica a 0,9% (Fig.6). Com o auxílio de uma trefina manual de 4mm de diâmetro interno, foi retirado um fragmento cilíndrico da placa de compósito. Esse fragmento foi introduzido no orifício ósseo sob pressão manual até o nivelamento do implante com a superfície óssea (Fig.6). O periósteo foi recolocado

sobre o material implantado, a fáscia lata foi suturada com pontos simples separados e a redução do espaço morto foi feita com sutura simples contínua, em ambos utilizando-se fio absorvível sintético à base de ácido poliglicólico²⁴ 3-0. A dermorrafia foi realizada com nylon²² 4-0 padrão simples separado. Após a cirurgia os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos (GI, GII e GIII) de quatro para avaliação clínica, radiográfica e histológica.

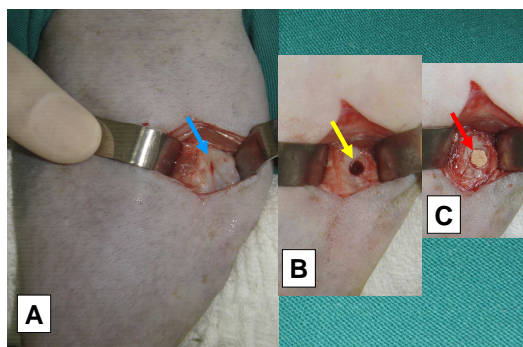


FIGURA 6: Fotografias mostrando a seqüência da cirurgia de implantação do compósito na metafise distal do fêmur direito de gato. A – Exposição cirúrgica da metafise distal do fêmur (seta azul). B - defeito ósseo realizado na metafise (seta amarela). C – defeito ósseo preenchido pelo compósito de PHB (70%) e HA (30%) (seta vermelha).

No pós-operatório foi administrado meloxicam²⁵ (0,2mg/kg por via oral), a cada 24 horas, durante três dias consecutivos (Gunew et al., 2008). Os pontos de pele foram retirados no oitavo dia após a cirurgia.

²² Mononylon (Ethicon divisão de Johnson e Johnson Ltda), São José dos Campos, São Paulo.

²³ Furadeira Pneumática (3M), Sumaré, São Paulo.

²⁴ Ácido Poliglicólico (Brasature indústria comércio importação e exportação Ltda), São Sebastião da Gama, São Paulo.

²⁵ Maxican 0,2% (Ouro fino Saúde Animal Ltda), Cravinhos, São Paulo.

Avaliação clínica e radiográfica

A avaliação clínica constou da observação diária da ferida cirúrgica, avaliando-se a presença de reação inflamatória, claudicação e sensibilidade dolorosa.

O fêmur distal foi radiografado nas posições crânio-caudal e médio-lateral, antes da cirurgia, imediatamente após e aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório. Nessa avaliação considerou-se todos os 12 gatos aos 30 dias, oito aos 60 e quatro aos 90. Para realização das radiografias foi utilizado um aparelho radiográfico de 500mA e filmes para raio-x²⁶ tamanho 24x30. Para a avaliação na projeção médio-lateral, o implante e a área circunvizinha foram divididos em quatro quadrantes constituindo cada um 25% da área analisada (Fig.7). Na projeção crânio-caudal a região correspondente ao implante e a área circunvizinha, foi dividida em quatro partes considerando-se cada uma 25% da área analisada (Fig.7). A interface osso-implante e o grau de radiopacidade do tecido adjacente foram avaliados com o auxílio de uma lupa. Na avaliação da interface osso-implante, a presença de radiolucência em algum dos quadrantes anularia o mesmo, sendo considerado apenas os demais na determinação do grau de densidade da interface osso-implante. Avaliou-se também a densidade óssea do tecido adjacente ao implante. Para esta avaliação considerou-se a soma das áreas que mostraram aumento de radiopacidade.

A avaliação macroscópica dos implantes subcutâneos foi realizada aos 15, 30 e 45 dias e do tecido ósseo aos 30, 60 e 90 dias, correspondendo respectivamente aos grupos GI, GII e GIII. Nessa avaliação foi considerada a textura e coloração de cada implante, o grau de fixação do mesmo ao tecido hospedeiro, a presença de secreção e de reação inflamatório no tecido hospedeiro, adjacente ao implante.

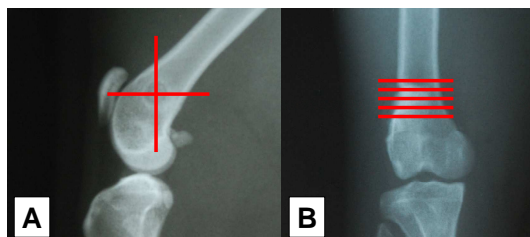


FIGURA 7: Esquema utilizado para mensuração do grau de radiopacidade na interface osso-implante e no tecido ósseo adjacente nas projeções radiográficas médio-lateral (A) e crânio-caudal (B). Cada divisão representa 25% de área analisada.

A avaliação histológica dos fragmentos de biópsia do tecido subcutâneo foi realizada aos 15, 30 e 45 dias e do tecido ósseo aos 30, 60 e 90 dias, correspondendo respectivamente aos grupos GI, GII e GIII. Ao final de cada período de avaliação, os animais foram novamente anestesiados e submetidos à cirurgia para remoção dos implantes e tecidos adjacentes. Para remoção dos implantes subcutâneos realizou-se uma incisão cutânea elíptica de cerca de 2x1cm, seguida da divulsão do tecido subcutâneo e excisão do implante e tecido adjacente. Seguiu-se a redução do espaço morto e a dermorrafia de forma rotineira. Após a biópsia o tecido envolvendo o implante foi seccionado e o implante removido do interior das amostras. O tecido foi fixado em formalina tamponada 10% durante 15 dias. Em seguida as amostras foram desidratadas em álcool 70%, 80% e 90% por duas horas cada e em álcool absoluto por seis horas, e diafanizadas em dois banhos de xilol por duas horas. Os fragmentos de tecido mole foram embebidos em parafina e mantidos em estufa à 58°C durante uma noite e depois incluídos. Cortes de 4µm de espessura, incluindo a região da interface subcutâneo-implante, foram obtidos em micrótomo e montados em lâminas de vidro. De cada bloco foram obtidas duas lâminas que foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina e avaliadas à microscopia de luz. Na avaliação foi caracterizado o grau de reação tecidual, levando-se em conta o tipo de resposta

²⁶ Filme Radiográfico T-Mat (Kodak), São José dos Campos, São Paulo.

tecidual, a espessura do tecido conjuntivo, presença de células inflamatórias, necrose e presença ou ausência de áreas de calcificação.

A biópsia óssea foi realizada com o auxílio de uma broca trefina com diâmetro interno de 8mm, acoplada a uma furadeira pneumática²⁷, com rotação controlável e irrigação constante com solução fisiológica a 0,9% (Fig.8). Após a remoção do fragmento, o orifício produzido pela biópsia foi preenchido com hidroxiapatita sintética²⁸ e a síntese tecidual foi realizada de forma rotineira já descrita anteriormente. As amostras obtidas foram fixadas em formalina tamponada 10% durante 15 dias e descalcificadas durante 21 dias, em solução de ácido fórmico a 10%, tamponada com citrato de sódio para pH4,5. Após essa etapa todos os implantes foram removidos para facilitar o corte da amostra com lâminas de aço. Os fragmentos ósseos foram lavados em água corrente, desidratados em álcool 70%, 80% e 90% por 12 horas cada e em álcool absoluto por seis horas, e então diafanizados em dois banhos de xilol por duas horas. Os fragmentos foram embebidos em parafina e mantidos em estufa à 58°C durante uma noite e depois incluídos. Cortes de 4µm de espessura incluindo a região da interface osso-implante foram obtidos em micrótomo e montados em lâminas de vidro. De cada bloco foram obtidas duas lâminas que foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina e analisadas à microscopia de luz. Foram caracterizados o grau de reação tecidual, levando-se em conta a presença de tecido conjuntivo, de células inflamatórias, necrose e presença ou ausência de áreas de crescimento ósseo na interface osso-implante.

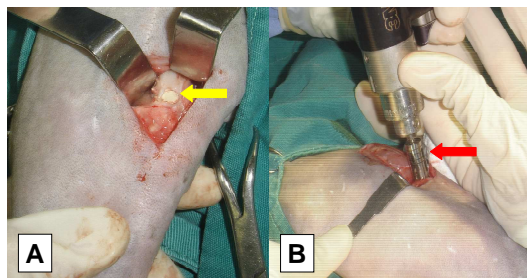


FIGURA 8: Fotografia da região metafisária distal do fêmur direito de gato. A - implante de composto PBH (70%) e HA (30%) (seta amarela) aos 30 dias após a cirurgia experimental. B - furadeira pneumática e broca trefina (seta vermelha) de 8mm de diâmetro no momento da biópsia óssea aos 30 dias.

Bacteriologia

Todas as amostras (subcutâneo-implante) que apresentaram secreção foram submetidas a cultura bacteriana. As amostras foram colhidas no momento da biópsia, por meio de “swabs” estéreis e imediatamente, encaminhadas ao laboratório para cultura bacteriana anaeróbica. As amostras foram inoculadas em ágar-sangue e cultivada segundo o protocolo sugerido por Quin et al. (2005).

²⁷ Furadeira Pneumática (3M), Sumaré, São Paulo.

²⁸ HAP-91® (JHS Laboratório Químico S/A), Sabará, Minas Gerais.

3.4 Emprego experimental da placa de compósito PHB/HA

Foram utilizados quatro gatos adultos jovens, machos castrados, sem raça definida, com massa corporal média de 3,5kg, provenientes do gatil do serviço de controle de zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Uberaba. Os animais foram avaliados por meio do exame clínico geral e ortopédico, selecionando aqueles clinicamente saudáveis e que apresentavam deambulação normal e ausência de alterações ósseas aos exames clínico e radiográfico. No período de quarentena os animais foram submetidos a exames laboratoriais (hemograma, pesquisa de hemoparasitas e urinálise), foram desverminados²⁹, vacinados³⁰ e receberam medicação ectoparasiticida³¹. Durante toda a fase experimental os gatos foram mantidos em gatis individuais com área de 0,42m² pertencentes ao Centro de Experimentação Animal do Hospital veterinário da Escola de Veterinária da UFMG, onde receberam ração comercial e água a vontade.

Os animais foram submetidos a jejum sólido de oito horas e hídrico de duas. Todos foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico que constituiu da administração de xilazina³² (1mg/kg IM) e quetamina³³ (15mg/kg IM), na mesma seringa, para indução anestésica. Após a tricotomia e cateterização da veia cefálica, os animais receberam propofol (3mg/kg IV) para complementação da anestesia e intubação. A manutenção anestésica foi realizada por meio da inalação espontânea de isoflurano³⁴, diluído em oxigênio puro, em circuito semifechado de

baixo fluxo. Como analgésico e antiinflamatório foi administrado meloxicam³⁵ (0,2mg/kg IM) imediatamente após a indução anestésica. A preparação para a cirurgia foi feita de maneira rotineira, com tricotomia estendendo-se da região sacral até a articulação tíbio-társica do membro pélvico esquerdo. A antisepsia foi realizada após o posicionamento do animal em decúbito lateral direito, com degermante à base de iodo³⁶ e álcool iodado.

Para acesso ao fêmur foi realizada uma incisão cutânea crânio-lateral de aproximadamente 8cm de comprimento, seguido da divulsão do tecido subcutâneo e secção da fáscia lata. Os músculos bíceps femoral e vasto lateral foram afastados para exposição do fêmur (Piermattei e Johnson, 2004). Com o auxílio de uma serra oscilatória, acoplada a furadeira pneumática³⁷ e sob irrigação constante, foi realizada uma osteotomia transversal no terço médio da diáfise femoral. Após a coaptação das extremidades ósseas, a placa de PHB/HA foi fixada na superfície lateral do fêmur, permanecendo três orifícios distais e três proximais à linha de osteotomia. As perfurações ósseas foram realizadas com broca de 1,5mm de diâmetro, utilizando-se uma furadeira pneumática com rotação controlável e irrigação constante com solução fisiológica 0,9%. O diâmetro do osso foi mensurado com auxílio de um medidor de profundidade, a rosca foi aberta com um preparador de rosca de 2,0mm, seguindo-se a colocação dos parafusos, inicialmente aqueles adjacentes à linha de osteotomia e os demais alternadamente. A fáscia lata e o tecido subcutâneo foram suturados por planos, com pontos simples contínuo, utilizando-se fio absorvível sintético à base de ácido poliglicólico³⁸ 3-0 e

²⁹ Endogard pour-on (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda), Jurubatuba, São Paulo.

³⁰ Nobivac Raiva e Nobivac Tricat (Intervet International B.V.), Arnhem, Gelderland.

³¹ Dropline pour-on gatos (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda), Jurubatuba, São Paulo.

³² Kensol (König do Brasil Ltda), Indianópolis, São Paulo.

³³ Vetanarcol (König do Brasil Ltda), Indianópolis, São Paulo.

³⁴ Isoran (Instituto BioChimico Indústria Farmacêutica Ltda), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

³⁵ Maxican 0,2% (Ouro Fino Saúde Animal Ltda), Cravinhos, São Paulo.

³⁶ Dermoidine (Gessy-Lever Ltda), São Paulo, São Paulo.

³⁷ Furadeira Pneumática (3M), Sumaré, São Paulo.

³⁸ Ácido Poliglicólico (Brasature indústria comércio importação e exportação Ltda), São Sebastião da Gama, São Paulo.

a hemorragia foi realizada com nylon³⁹ 4-0 padrão simples separado.

No pós-operatório foi administrado meloxicam⁴⁰ (0,2mg/kg por via oral), a cada 24 horas, durante três dias consecutivos. Os pontos de pele foram retirados no oitavo dia após a cirurgia.

Avaliação pós-operatória

A avaliação dos animais foi realizada mediante exame clínico e radiográfico. A avaliação clínica constou do exame clínico geral seguido pelo exame ortopédico com a observação diária da ferida cirúrgica, avaliação da presença de reação inflamatória, estabilidade do foco de osteotomia, presença de claudicação, atrofia muscular e sensibilidade dolorosa. Foram realizadas radiografias do fêmur esquerdo e direito, nas projeções crânio-caudal e médio-lateral de todos os animais, antes da cirurgia, imediatamente após a mesma e aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório. Foi utilizando um aparelho radiográfico de 500mA e filmes para raio-x⁴¹ tamanho 24x30.

3.5 Análise estatística

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Foram calculadas as médias, medianas, desvio padrão e coeficiente de variação das forças e torques. As medianas das forças máximas e dos torques máximos obtidos nos testes mecânicos foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. Adotou-se um nível de confiança de 95% (P-valor \leq 0,05 indica diferença significativa). Para as demais variáveis pesquisadas como avaliação clínico-cirúrgica, radiográfica, e histológica utilizou-se a análise descritiva.

³⁹ Mononylon (Ethicon divisão de Johnson e Johnson Ltda), São José dos Campos, São Paulo.

⁴⁰ Maxican 0,2% (Ouro Fino Sude Animal Ltda), Cravinhos, São Paulo.

⁴¹ Filme Radiográfico T-Mat (Kodak), São José dos Campos, São Paulo.

4. Resultados e discussão

4.1 Teste mecânico

O molde de gesso foi eficiente para a produção dos modelos de fêmur em acrílico, no entanto, alguns detalhes como encontrar a densidade ideal da massa de gesso, foram importante para se obter a apropriada imersão do exemplar de fêmur. O gesso de consistência muito mole permitia o afundamento completo do osso e o de consistência muito firme impedia a confecção do molde na forma anatomicamente correta. A posição crânio-caudal do osso na massa de gesso permitiu sua retirada sem danificação do molde. Outras posições também foram tentadas, mas não foram eficientes, pois ao se retirar o osso sempre havia quebra de parte do molde. A aplicação de uma camada de óleo mineral sobre a superfície da primeira metade do molde propiciou a separação das duas metades sem danos, após a secagem.

A proporção da mistura dos copolímeros de 60% pó e 40% líquido, diferente do recomendado pelo fabricante, permitiu a produção de modelos sem bolhas e com polimerização em torno de 10 minutos. A mistura sugerida pelo fabricante 75% pó e 25% líquido era muito densa e resultava na produção de modelos com bolhas e defeitos de preenchimento, e misturas menos densas do que a utilizada, prolongavam o tempo de polimerização. Foi necessária a produção de um molde de gesso para cada modelo, pois após a polimerização havia aderência do acrílico ao molde e ao se desprender o modelo sempre havia danificação do molde. Isso resultou na confecção de 24 modelos.

Os modelos desempenharam bem seu papel na transmissão de forças para as placas de fixação. Quatro modelos (16,67%) se romperam após a falha das placas de fixação, não interferindo portanto, nas avaliações. Duas rupturas ocorreram no teste de compressão axial em modelos fixados com placas de compósito PHB/HA e as outras duas, no teste de torção em modelos

fixados com placas de aço. Vários fatores afetam os resultados dos testes biomecânicos em ossos e devem ser considerados durante o procedimento. Os efeitos da variação entre os ossos quanto à idade, porosidade, tamanho, mineralização e geometria devem ser minimizados (Sod et al., 2005; Hammel et al., 2006). Para minimizar essa variação utilizou-se, no presente trabalho, modelos ósseos iguais, feitos de metilmetacrilato em todos os corpos de prova.

A escolha do metilmetacrilato como material para confecção dos modelos foi devido a suas propriedades mecânicas, módulo de elasticidade (2,9GPa) e resistência mecânica (70MPa) (Oréface, 2006), que apresentam valores próximos aos do osso cortical que varia de 7 a 30GPa para o módulo de elasticidade e de 50-150MPa para resistência mecânica a flexão (Pereira et al., 2006). A facilidade de manipulação do polímero e o custo acessível também contribuíram para eleição do metilmetacrilato como matéria prima para fabricação dos modelos.

Na literatura consultada (Knowles e Hastings, 1992; Knowles et al., 1992; Boerre et al., 1993; Gogolewski et al., 1993; Luklinska e Bonfield, 1997; Luklinska e Schluckwerder, 2003; Shishatskaya et al., 2006) não foram encontrados relatos sobre a resistência mecânica de implantes ortopédicos de compósitos PHB/HA. A placa metálica já é conhecida, padronizada e testada como meio eficiente de fixação de fraturas (Perren, 2002; Roe, 2003; Piermattei et al., 2006), motivo pelo qual foi utilizada como referência para avaliação mecânica das placas de PHB/HA.

Teste de flexão com quatro pontos

Os testes biomecânicos são amplamente utilizados e aceitos para avaliar a eficiência de dispositivos de fixação ortopédica e devem ser realizados antes dos testes *in vivo* (Hammel et al., 2006; Sod et al., 2006).

Os valores da força máxima suportada pelos corpos de prova e de deformação até a falha

do implante estão mostrados nas tabelas 1 e 2. A média da força máxima e da deformação até a falha foram, respectivamente de 352,33N e 3,00mm para os modelos fixados com placas de aço e de 323,20N e 2,46mm para os modelos fixados com placas de compósito PHB/HA. Os coeficientes de variação dos grupos aço (A) e compósito (B) apresentaram valores de 16,60% e 12,49% , respectivamente, o que indica pequena variação nos resultados. Não houve diferença no comportamento das medianas para as amostras fixadas com a placa de aço e com a placa de compósito (Mann-Whitney, P-valor=0,3711), o que sugere força de flexão semelhante nas placas de aço e de compósito.

Ossos submetidos a cargas excêntricas como o fêmur e úmero suportam maior força de flexão (Hulsel e Hyman, 2003), o que torna o teste de flexão indispensável na avaliação mecânica de placas utilizadas para fixação desses ossos.

Tabela 1: Valores de força máxima e de deformação até a falha dos modelos ósseos fixados com placas de aço e submetidos ao teste de flexão com quatro pontos utilizando uma máquina universal de ensaios EMIC DL3000 e célula de carga 2000N.

Corpo de prova com placa de aço	Força máxima (N)	Deformação até falha (mm)
CP1	294,00	3,00
CP2	411,00	3,00
CP3	352,00	3,00
Média	352,33	3,00
Mediana	352,00	3,00
Desvio padrão	58,50	0,00
Coefficiente de Variação	16,60%	0,00%

CP - corpo de prova; N – newton; mm – milímetro

Tabela 2: Valores de força máxima e de deformação até falha dos modelos ósseos fixados com placas de Compósito PHB (70%) HA (30%) e submetidos ao teste de flexão com quatro pontos utilizando uma máquina universal de ensaios EMIC DL3000 e célula de carga 2000N.

Corpo de prova com placa de compósito	Força máxima (N)	Deformação até falha (mm)
CP1	291,00	3,00
CP2	289,00	2,00
CP3	343,00	3,00
CP4	309,00	2,00
CP5	384,00	2,00
Média	323,20	2,46
Mediana	309,00	2,26
Desvio padrão	40,36	0,33
Coefficiente de Variação	12,49%	13,40%

CP - corpo de prova; N – newton; mm – milímetro

Os modelos fixados com as placas de aço apresentaram deformação elástica seguida de deformação plástica, ou seja, nos momentos iniciais do teste a placa deformase, mas quando a força é cessada a placa volta a sua forma inicial. Do ponto de vista clínico, a deformação elástica é importante, uma vez que ela permite que o sistema volte à forma original após a aplicação de força, desde que a força não supere o limite de deformação elástica. A deformação elástica pode permitir a micromovimentação no foco de fratura, o que beneficia a consolidação óssea (Foux et al., 1997; Backman et al., 2004; Saikku-Bäckström et al., 2005; Uthoff et al., 2006). No entanto, a amplitude de deformação elástica deve ser mínima, pois grandes movimentos no foco de fratura podem levar a ruptura das aderências fibrinosas e fibrosas que se estabelecem entre as extremidades. Além disso, podem romper os vasos neoformados que atuam como ponte para as células osteoprogenitoras, retardando assim o processo de regeneração óssea (Perren, 2002; Uthoff et al., 2006). A deformação elástica foi percebida ao final de cada teste de flexão quando ao se desligar a máquina de ensaio, o corpo de prova possuía uma angulação e imediatamente após ser retirado da máquina de ensaios, essa angulação

reduzia-se notavelmente. Nenhum corpo de prova fixado com a placa de aço apresentou ruptura, houve apenas a curvatura das placas (Fig.9) que é considerada falha do implante. Os corpos de prova fixados com a placa de compósito apresentaram deformação média de 2,46mm e se romperam, perdendo completamente a função de estabilização. A quebra da placa originou uma linha de ruptura que localizou-se, em 100% das amostras, na região adjacente a linha de secção do modelo. A localização da linha de ruptura nessa área já era esperada uma vez que há concentração de tensão nesse local associada à fragilização da placa pelos orifícios de passagem dos parafusos (Ganesh et al., 2005; Hammel et al., 2006). Todas as linhas de ruptura das placas foram transversas ao eixo longitudinal, sendo que na amostra três ela localizou-se exatamente no ponto médio da placa; na amostra dois, sobre o orifício distal, no segmento proximal, adjacente à linha de secção e nas amostras um, quatro e cinco, sobre o orifício proximal, no segmento distal, adjacente à linha de secção (Fig.10). Em todos os casos a ruptura ocorreu numa área de sobrecarga da placa, ou seja, nos orifícios ou na linha de secção, ponto de maior concentração de tensão (Sod et al., 2005; Sod et al., 2006; Esenkaya et al., 2007).



FIGURA 9: Fotografia dos corpos de prova constituídos do modelo ósseo seccionado no terço médio e fixado com microplaca de aço reta de 2mm, com oito orifícios, após os ensaios de flexão com quatro pontos realizado com uma máquina universal de ensaios EMIC DL 3000 com célula de carga de 2000N. Os corpos de prova estão enumerados de acordo com a ordem de realização dos ensaios. Observar a deformação da placa na região adjacente à linha de secção do modelo acrílico.

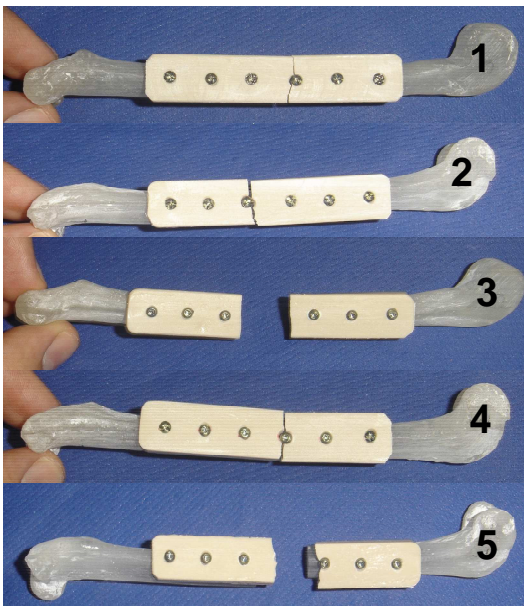


FIGURA 10: Fotografia dos corpos de prova constituídos do modelo ósseo seccionado no terço médio e fixado com placa de compósito PHB (70%) e HA (30%) após os ensaios de flexão com quatro pontos realizado com uma máquina universal de ensaios EMIC DL 3000 com célula de carga de 2000N. Os corpos de prova estão enumerados de acordo com a ordem de realização dos ensaios. Observar a ruptura da placa na região adjacente à linha de secção do modelo acrílico.

Teste de torção

Os valores do torque máximo suportado pelos corpos de prova e de deformação até a falha estão mostrados nas tabelas 3 e 4. A média do torque máximo e da deformação até a falha foram de 1,15Nm e 0,83rad para os modelos fixados com placas de aço e de 1,01Nm e 0,71rad para os modelos fixados com placas de compósito. Os coeficientes de variação dos grupos aço (A) e compósito (B) apresentaram os valores de 1,74% e 108,97%, respectivamente, o que indica pequena variação nos resultados apresentados pelo modelo fixado com placa de aço, mas grande variação nos resultados apresentados pelo modelo fixado com placa de compósito. Isso pode estar associado a defeitos estruturais das placas de compósito. Não houve diferença no comportamento das medianas para as amostras fixadas com placa de aço e com placa de compósito (Mann-Whitney, P-valor=0,7656), o que sugere que a placa de compósito possui resistência à torção semelhante à placa de aço. Esse resultado estimula a realização dos testes *in vivo* para verificação da eficiência prática das placas de compósito na fixação óssea.

A neutralização da força de torção durante a fixação de uma fratura é importante, pois essa força gera o movimento mais deletério para a consolidação da fratura, que é a rotação entre os fragmentos ósseos (Stiffler, 2004; Hulsel e Hyman, 2003; Piermattei et al., 2006). Essa rotação frequentemente causa a ruptura das aderências fibrosas e dos vasos neoformados nas extremidades ósseas fraturadas, retardando ou até mesmo impedindo o processo de reparação óssea (Roe, 2003; Piermattei et al., 2006).

Tabela 3: Valores de torque máximo e deformação até a falha dos modelos ósseos fixados com placas de aço e submetidos ao teste de torção utilizando uma máquina hidráulica de ensaios de torção MTS modelo 66.11A.02 com célula de torque 250Nm.

Corpo de prova com placa de aço	Torque máximo (Nm)	Deformação até falha (rad)
CP1	1,14	0,81
CP2	1,15	0,83
CP3	1,17	0,84
Média	1,15	0,83
Mediana	1,15	0,83
Desvio padrão	0,02	0,02
Coefficiente de Variação	1,74%	2,41%

CP - corpo de prova; Nm – newton por metro; rad – radianos

Tabela 4: Valores de torque máximo e deformação até a falha dos modelos ósseos fixados com placas de Compósito PHB (70%) HA (30%) e submetidos ao teste de torção utilizando uma máquina hidráulica de ensaios de torção MTS modelo 66.11A.02 com célula de torque 250Nm.

Corpo de prova com placa de compósito	Torque máximo (Nm)	Deformação a falha (rad)
CP1	2,24	0,76
CP2	0,38	0,83
CP3	0,14	0,65
CP4	2,18	0,58
CP5	0,11	0,74
Média	1,01	0,71
Mediana	0,38	0,71
Desvio padrão	1,10	0,10
Coefficiente de Variação	108,97%	14,08%

CP - corpo de prova; Nm – newton por metro; rad – radianos

No estudo piloto realizado para padronização do teste de torção, os modelos fixados com placas de aço atingiram a rotação de 0,84rad, considerado momento de falha do implante (Sod et al, 2005; Sod et al, 2006), apresentando apenas deformação elástica, ou seja após essa rotação as placas retornaram à forma original.

Nenhuma placa de aço se rompeu no teste de torção, elas apenas se deformaram. Nos ensaios de torção das amostras um e dois, fixadas com as placas de aço, verificou-se

ruptura do modelo acrílico na região distal do mesmo, correspondente à metáfise óssea, a uma angulação de 1,87rad e 4,17rad, respectivamente (Fig.11). É importante salientar que a falha do modelo ocorreu a uma rotação muito superior a 0,84 rad, considerado momento de falha das placas (Sod et al, 2005; Sod et al, 2006), ou seja a ruptura do modelo não interferiu com o estudo mecânico da placa.

Os corpos de prova fixados com placa de compósito praticamente não apresentaram deformação. Observou-se que na rotação média de um ângulo de 0,71rad, as placas se romperam, originando múltiplos fragmentos com várias linhas de ruptura, mas em todos os casos verificou-se um componente oblíquo longo associado. A localização da ruptura foi adjacente à linha de secção do modelo, o que já era esperado, uma vez que há concentração de tensão nesse local, tornando-o mais susceptível (Ganesh et al., 2005; Hammel et al., 2006; Esenkaya et al., 2007). As amostras um e quatro apresentaram linha de ruptura oblíqua longa simples, passando em uma delas pelo orifício distal do segmento proximal, adjacentes à linha de secção do modelo e na outra, pelos dois orifícios adjacentes à linha de secção do modelo. Nas amostras três e cinco houve múltiplas linhas de ruptura, mas sempre com um componente oblíquo adjacente à linha de secção. A amostra dois exibiu uma fratura longitudinal passando pelos três orifícios no segmento proximal e tornando-se oblíqua na região adjacente a linha de secção (Fig.12).

No teste de torção foi mais evidente a fragilização das placas pelos orifícios dos parafusos, uma vez que quase todas as linhas de ruptura (80%) passaram por pelo menos dois orifícios.

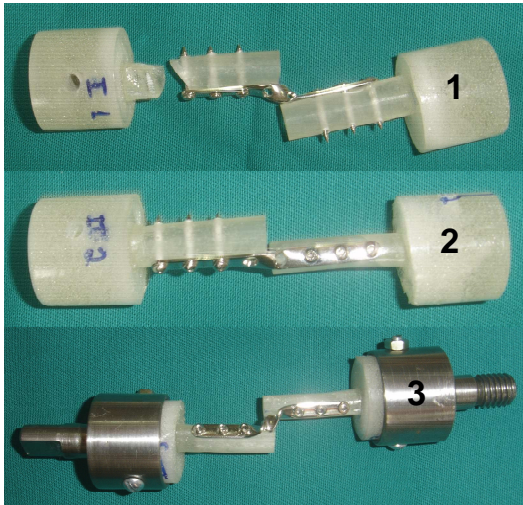


FIGURA 11: Fotografia dos corpos de prova constituídos do modelo ósseo seccionado no terço médio e fixado com microplaca de aço reta de 2mm com oito orifícios, após os ensaios de torção realizado em uma máquina hidráulica de ensaios de torção MTS modelo 66.11A.02 com célula de torque de 250Nm. Os corpos de prova estão enumerados de acordo com a ordem de realização dos ensaios. Observar a deformação da placa na região adjacente à linha de secção do modelo acrílico.

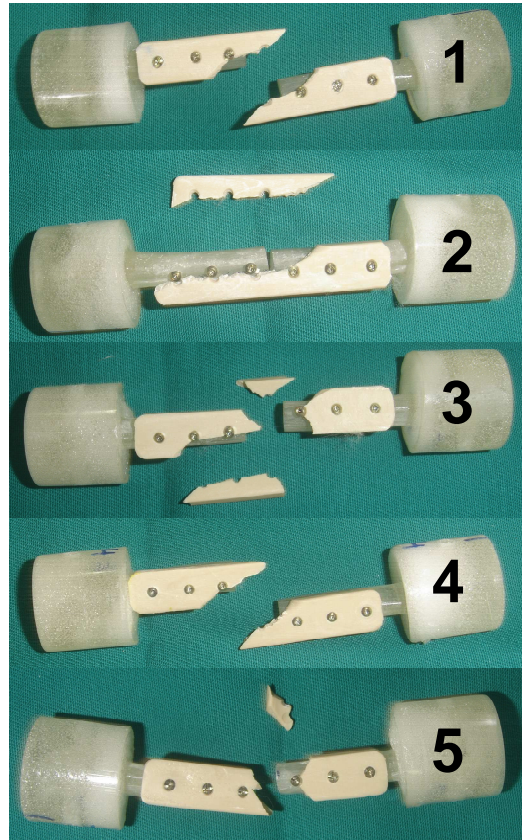


FIGURA 12: Fotografia dos corpos de prova constituídos do modelo ósseo seccionado no terço médio e fixado com placa de compósito PHB (70%) e HA (30%) após os ensaios de torção realizado em uma máquina hidráulica de ensaios de torção MTS modelo 66.11A.02 com célula de torque de 250Nm. Os corpos de prova estão enumerados de acordo com a ordem de realização dos ensaios. Observar a ruptura da placa por cisalhamento na região adjacente à linha de secção do modelo acrílico.

Teste de compressão axial

Os valores da força máxima suportada pelos corpos de prova e de deformação até a falha do implante estão mostrados nas tabelas 5 e 6. A média da força máxima suportada e da deformação até a falha foram, respectivamente, 547,70N e 2,30mm para os modelos fixados com as placas de aço e de 617,70N e 3,65mm para os modelos fixados com as placas de compósito, resultado inesperado, uma vez que as placas de compósito, consideradas mais frágeis, suportaram uma força de compressão média superior. No entanto, não houve diferença no comportamento das medianas para as amostras fixadas com placa de aço e com placa de compósito (Mann-Whitney, P-valor=0,7656). O resultado sugere resistência semelhante entre as placas de compósito e de aço para força de compressão axial. Os coeficientes de variação dos grupos aço (A) e compósito (B) apresentaram os valores de 25,33% e 41,17%, respectivamente, o que indica maior variação no grupo das placas de compósito. Isso pode ter ocorrido por defeitos estruturais nas placas de compósito. A maior resistência da placa de compósito em relação à placa de aço pode ser devido à diferença nas dimensões das placas. A placa de compósito apresenta mais do dobro da espessura da placa de aço o que reduz a tensão no material, uma vez que tensão é força/área (Pereira et al., 2006).

Nenhum corpo de prova fixado com a placa de aço apresentou ruptura, houve apenas a curvatura das placas (Fig.13). A deformação elástica das placas de aço não foi percebida no teste de compressão, já a deformação plástica foi clara e se deu na região correspondente aos orifícios adjacentes ao defeito do modelo, ponto mais frágil e com maior concentração de tensão (Ganesh et al., 2005; Hammel et al., 2006).

Tabela 5: Valores de força máxima e deformação até a falha dos modelos ósseos fixados com placas de aço e submetidos ao teste de compressão axial utilizando uma máquina universal de ensaios EMIC DL3000 e célula de carga 2000N.

Corpo de prova com placa de aço	Força máxima (N)	Deformação até falha (mm)
CP1	518,04	2,61
CP2	426,21	1,73
CP3	352,00	2,54
Média	547,70	2,30
Mediana	518,00	2,54
Desvio padrão	138,70	0,49
Coeficiente de Variação	25,33%	21,23%

CP - corpo de prova; N – newton; mm – milímetro

Tabela 6: Valores de força máxima e deformação até falha dos modelos ósseos fixados com placas de Compósito PHB (70%) HA (30%) e submetidos ao teste de compressão axial utilizando uma máquina universal de ensaios EMIC DL3000 e célula de carga 2000N.

Corpo de prova com placa de compósito	Força máxima (N)	Deformação a falha (mm)
CP1	739,28	4,30
CP2	426,36	3,52
CP3	360,95	2,37
CP4	571,03	3,39
CP5	990,71	4,68
Média	617,70	3,65
Mediana	571,00	3,53
Desvio padrão	254,30	0,90
Coeficiente de Variação	41,17%	24,51%

CP - corpo de prova; N – newton; mm – milímetro

Os corpos de prova fixados com a placa de compósito mostraram deformação média de 3,65mm e se romperam, assim como nos outros testes mecânicos. A quebra da placa originou uma linha de ruptura transversa localizada na região adjacente ao defeito do modelo, em todas as amostras. A linha de ruptura da placa passou pelo orifício distal no segmento proximal adjacente ao defeito (Fig.14).

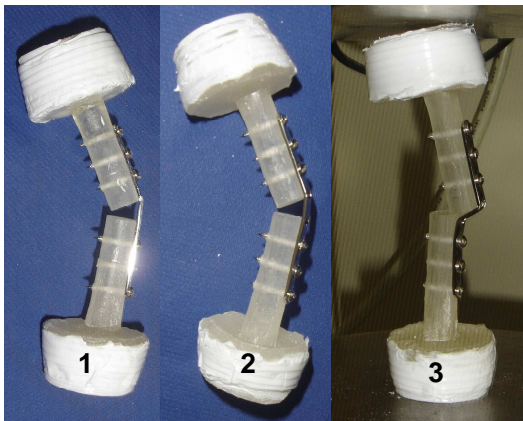


FIGURA 13: Fotografia dos corpos de prova constituídos do modelo ósseo apresentando um defeito de 5mm no ponto médio e fixado com microplaca de aço reta de 2mm com oito orifícios após os ensaios de compressão axial realizado em uma máquina universal de ensaios EMIC DL 3000 com célula de carga de 2000N. Os corpos de prova estão enumerados de acordo com a ordem de realização dos ensaios. Observar a deformação da placa na região adjacente à linha de secção do modelo acrílico.

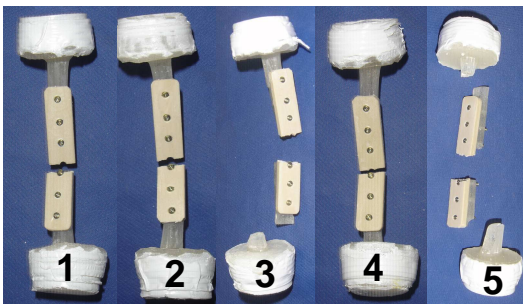


FIGURA 14: Fotografia dos corpos de prova constituídos do modelo ósseo apresentando um defeito de 0,5 cm no ponto médio e fixado com placa de compósito PHB (70%) e HA (30%) após os ensaios de compressão axial realizado em uma máquina universal de ensaios EMIC DL 3000 com célula de carga de 2000N. Os corpos de prova estão enumerados de acordo com a ordem de realização dos ensaios. Observar a ruptura da placa na região adjacente à linha de secção do modelo acrílico.

4.2 Avaliação do compósito no tecido subcutâneo e no tecido ósseo.

Os animais adaptaram-se bem aos gatis e não apresentaram intercorrências clínicas que pudessem comprometer os resultados da pesquisa. No presente estudo nenhum dos animais recebeu medicação antibiótica durante a fase experimental, visto que a

cirurgia foi realizada sob normas rígidas de assepsia e o pós-operatório transcorreu em ambiente limpo e controlado.

O protocolo anestésico utilizado foi adequado para realização de todas as intervenções cirúrgicas, no entanto houve dificuldade para intubação dos animais sendo necessária complementação anestésica com propofol (3mg/kg, IV) e lubrificação do tubo endotraqueal com gel de lidocaína. A dificuldade de intubação provavelmente ocorreu devido ao tempo transcorrido entre a aplicação da quetamina e xilazina e a intubação (tempo gasto com a tricotomia e cateterização da veia cefálica), associado ao fato de que nenhuma dessas drogas inibe o reflexo laríngeo que só é abolido, nos gatos, em planos profundos da anestesia. Das 36 anestésias realizadas verificou-se recuperação anestésica rápida, mas com discreta excitação em seis casos (16,67%). O fato de não se ter administrado antiinflamatório por mais que três dias no pós-operatório não representou desconforto, uma vez que todos os gatos deambularam sem claudicação após a cirurgia. Não foi observado aumento de volume nas regiões de implantação do compósito. Os animais apresentaram condição clínica satisfatória e ganho de peso ao longo da experimentação. A deambulação ocorreu num curto espaço de tempo (logo após a recuperação anestésica) sem claudicação, em função da pequena lesão causada na metáfise distal do fêmur direito e devido ao efeito analgésico e antiinflamatório do meloxicam (Gunew et al., 2008).

A divulsão entre o bíceps e o vasto lateral segundo Piermattei e Johnson (2004), permitiu fácil acesso à região metafisária do fêmur. A broca utilizada neste estudo foi eficiente na confecção do orifício ósseo com remoção da cortical lateral e parte da região medular. O procedimento de perfuração óssea realizado com concomitante irrigação da área com solução fisiológica a 0,9% , associado à rotação controlável da furadeira pneumática, contribuiu para minimizar o aquecimento ósseo que poderia interferir nos

resultados. Discreta hemorragia ocorreu após a perfuração, porém nada que comprometesse o procedimento cirúrgico. Esta hemorragia era esperada devido à penetração da broca no osso esponjoso vascularizado (Thompson, 2007). Todos os implantes foram firmemente adaptados ao defeito ósseo. O terço distal do fêmur foi eleito como modelo experimental neste estudo, devido às suas propriedades osteogênicas, (Rezende, 2006; Sá et al., 2007) e a sua constituição anatômica, que além de possibilitar o fácil acesso cirúrgico é a porção mais ampla do fêmur que permitiu a retirada de um fragmento (osso-implante) de 8mm de diâmetro com mínima fragilização do osso. Entretanto, três animais apresentaram fratura no segmento ósseo fragilizado pela biópsia e foram submetidos a uma nova intervenção cirúrgica para estabilização.

A região lombar foi selecionada para colocação dos implantes devido à facilidade da técnica e a mínima lesão tecidual (Matsusue et al., 1995; Manjubala et al., 2002). A incisão cutânea de cerca de 1cm, seguida da divulsão roma do tecido subcutâneo foi suficiente para introduzir os implantes com mínimo trauma local e mínima hemorragia, como já relatado por Sá et al. (2007). A pequena lesão tecidual leva à mínima formação de tecido fibroso na área do implante, diminuindo o risco de se atribuir ao implante, uma reação advinda do trauma cirúrgico. O pós-operatório transcorreu sem complicações com cicatrização cutânea por primeira intenção em todos os casos.

Avaliação radiográfica

Os exames radiográficos realizados no período pós-operatório possibilitaram verificar o grau de densidade óssea na interface osso-implante e no tecido ósseo adjacente, nos diferentes tempos estudados. No presente estudo as imagens obtidas do terço distal do fêmur logo após a cirurgia, mostraram áreas de radiolucência ao redor

dos implantes em oito animais (66,67%) (Fig.15). Essas áreas radiolucenentes foram atribuídas a pequenas falhas de preenchimento do defeito, uma vez que se utilizou uma broca para confecção dos orifícios ósseos e uma trefina para confecção dos implantes. Apesar de serem instrumentos de igual diâmetro, são diferentes na forma e podem produzir áreas de corte desiguais. Variações no posicionamento durante o exame radiográfico podem também ter contribuído para o aparecimento dessas áreas. Na região medular adjacente ao implante, verificou-se áreas de radiolucência em cinco animais (41,67%) e essas foram atribuídas à retirada de fragmentos de osso medular durante a confecção do defeito ósseo (Fig.15), achado já relatado por Manjubala et al. (2002) e Sá et al. (2007). Estes dados foram semelhantes para todos os grupos estudados.

A área de radiolucência em torno dos implantes reduziu-se nos tempos seguintes de avaliação, mas continuou presente, até o final do estudo em três animais, que corresponde a 75% do grupo GIII. Isso pode ser atribuído à presença de tecido conjuntivo na interface osso-implante e pode estar associado com o processo normal de reparação ou à encapsulação do composto e contribui para a diferença de radiopacidade (Cullun et al., 1988).

Aos 30 dias após a cirurgia foi evidenciado algum grau de reparação óssea caracterizado pela presença de radiopacidade ao redor de todos os implantes (Fig.16). A tabela 7 mostra os resultados da avaliação radiográfica da interface-osso implante e do tecido adjacente de cada animal aos 30 dias de pós-operatório. A média da área com aumento de radiopacidade do tecido adjacente ao implante foi de 72,92% na projeção médio-lateral (ML) e de 66,67% na projeção crânio-caudal (CC). Esse aumento de radiopacidade no tecido adjacente ao implante foi atribuído inicialmente à síntese de matriz óssea pelos osteoblastos para reparar o defeito ósseo criado cirurgicamente. No entanto, a osteosclerose

também leva ao aumento de radiopacidade e pode estar associado à morte de osteócito, que leva à redução da osteólise osteocítica, provocando aumento na densidade óssea (Thompson, 2007). A redução da extensão da área radiolúcida na interface osso-implante também é um dado que pode sugerir início da reparação óssea, já aos 30 dias (Tab.7). A média da área radiopaca foi de 72,92% na projeção ML e de 97,92% e na projeção CC. Nesse período, foi observada reação periosteal na região metafisária adjacente ao compósito em dois animais, 16,67% do total (Fig.17). Essa reação persistiu até aos 60 dias em um deles o qual também apresentou espessamento da cortical na mesma região aos 90 dias. A reação periosteal provavelmente ocorreu por uma maior manipulação tecidual nesses animais ou mesmo por uma reação individual.

Tabela 7: Grau de radiopacidae observado na interface osso-implante e no tecido ósseo adjacente ao compósito PHB/HA implantado na metáfise femoral distal de gatos 30 dias após sua implantação.

Avaliação aos 30 dias	Interface osso implante		Tecido ósseo adjacente	
	CC	ML	CC	ML
01	100%	50%	100%	50%
02	100%	75%	0%	75%
03	100%	50%	100%	75%
04	100%	100%	100%	100%
05	100%	100%	25%	50%
06	100%	100%	0%	75%
07	100%	50%	100%	75%
08	100%	75%	100%	75%
09	100%	50%	100%	100%
10	100%	100%	50%	75%
11	100%	75%	50%	50%
12	75%	50%	75%	75%
Média	97,92%	72,92%	66,67%	72,92%

CC- crânio-caudal; ML- médio-lateral

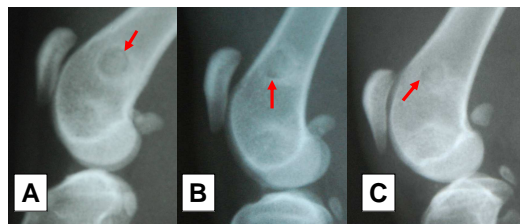


FIGURA 15: Exame radiográfico da região metafisária distal do fêmur direito de gatos onde foi implantado compósito PHB (70%) e HA (30%). Observar a redução da linha radiolúcida (setas vermelhas) em torno do implante ao longo do experimento. As imagens identificadas com as letras A, B e C correspondem aos períodos de avaliação de 30, 60 e 90 dias respectivamente.

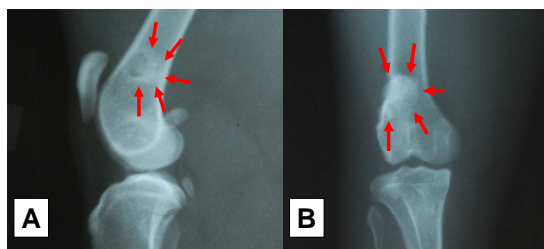


FIGURA 16: Exame radiográfico da região metafisária distal do fêmur direito de gatos onde foi implantado compósito PHB (70%) e HA (30%). Observar o aumento de radiopacidade no (setas vermelhas) tecido adjacente ao implante. “A” corresponde à projeção médio-lateral e “B” à crânio-caudal ambas realizadas aos 30 dias de implantação.

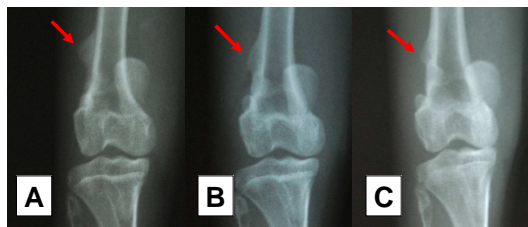


FIGURA 17: Exame radiográfico da região metafisária distal do fêmur direito de gatos onde foi implantado compósito PHB (70%) e HA (30%). Observar a reação periosteal (setas vermelhas) adjacente ao local de colocação do implantes. As imagens identificadas com as letras A, B e C correspondem às projeções crânio-caudais realizadas nos períodos de avaliação 30, 60 e 90 dias respectivamente.

Aos 60 dias de pós-operatório não foi observada nenhuma linha de radiolucência na interface osso-implante na projeção CC, o que sugere íntimo contato entre implante e tecido-hospedeiro. Na projeção ML verificou-se um aumento de 17,71% da área radiopaca na interface osso-implante, que pressupõe o crescimento ósseo e preenchimento parcial da interface osso-implante. Já a radiopacidade do tecido ósseo adjacente diminuiu em 10,42% na projeção CC e 22,92% na projeção ML, o que indica redução da inflamação e organização da resposta tecidual ao implante ao longo do tempo de observação. A tabela 8 mostra as porcentagens da área de radiopacidade na interface osso-implante e do tecido ósseo adjacente e suas médias aos 60 dias após a cirurgia.

Tabela 8: Grau de radiopacidade observado na interface osso-implante e no tecido ósseo adjacente ao compósito PHB/HA implantado na metáfise femoral distal de gatos, 60 dias após a cirurgia.

Avaliação aos 60 dias	Interface osso implante		Tecido ósseo adjacente	
	CC	ML	CC	ML
01	100%	100%	50%	50%
02	100%	100%	0%	75%
03	100%	75%	100%	25%
04	100%	100%	50%	75%
05	100%	100%	50%	100%
06	100%	100%	50%	25%
07	100%	75%	50%	25%
08	100%	75%	100%	25%
Média	100%	90,63%	56,25%	50%

CC- crânio-caudal; ML- médio-lateral

Aos 90 dias de pós-operatório verificou-se o mesmo quadro de 60, na interface osso-implante na projeção CC e observou-se também a redução da área radiolucida na interface osso-implante na projeção ML. No entanto, houve uma diminuição na intensidade de resposta tecidual, pois o aumento na área de radiopacidade da interface osso-implante reduziu de 17,71% para 3,12% durante o mesmo período de avaliação (30 dias). No tecido ósseo adjacente ao implante, os achados foram semelhantes aos dos 60 dias, com

diminuição da radiopacidade e retorno da densidade normal do tecido ósseo. A tabela 9 mostra as porcentagens da área de radiopacidade na interface osso-implante e do tecido ósseo adjacente ao implante de cada animal, bem como as médias aos 90 dias após a cirurgia.

Tabela 9: Grau de radiopacidade observado na interface osso-implante e no tecido ósseo adjacente ao compósito PHB/HA implantado na metáfise femoral distal de gatos 90 dias após a cirurgia.

Avaliação aos 90 dias	Interface osso implante		Tecido ósseo adjacente	
	CC	ML	CC	ML
01	100%	100%	50%	25%
02	100%	100%	50%	0%
03	100%	75%	75%	25%
04	100%	100%	100%	50%
Média	100%	93,75%	68,75%	25%

CC- crânio-caudal; ML- médio-lateral

Avaliação macroscópica do implante nos tecidos subcutâneo e ósseo

Todos os implantes subcutâneos apresentaram-se recobertos por uma fina cápsula fibrosa que permitia a visualização do material no seu interior. Após sua abertura para retirada dos implantes foi observada uma secreção mucosa de coloração acastanhada, inodora, envolvendo o implante. Essa secreção foi observada em 16 implantes (66,67%), sendo quatro (25,00%) do grupo GI (15 dias), quatro (25,00%) do grupo GII (30 dias) e oito (50,00%) do grupo GIII (45 dias). O resultado da cultura e isolamento dessa secreção foi negativo em todos os casos, o que sugere ser uma reação inflamatória asséptica. A intervenção cirúrgica e a presença de um implante induzem a uma resposta inflamatória, bem como o reparo do tecido e a regeneração. A composição microestrutural e topográfica da superfície do material influencia também a resposta biológica (Davies, 2000; Jones e Hench, 2003; Hench et al., 2006).

Após a retirada dos fragmentos de compósito do tecido subcutâneo, esses

apresentavam a mesma forma e consistência de antes da implantação, o que sugere a manutenção das características macroscópicas do compósito. Esse resultado não descarta todavia, a possibilidade de início da degradação molecular do compósito. A degradação do PHB foi relatada a partir do 30º dia de implantação em tecido subcutâneo de ratos (Gogolewski et al., 1993) e sua reabsorção, bem como da HA ocorrem principalmente por osteoclasia (Murphey et al., 1992; Shishatskaya et al., 2006).

No osso, a avaliação macroscópica revelou os implantes firmemente aderidos e recobertos pelo perióstio, sugerindo a integração do compósito. Nenhum dos animais submetidos à biópsia aos 30, 60 e 90 dias apresentaram sinais macroscópicos de degradação do implante como mudança de forma, consistência e textura (Fig.19 e 20). Isso entretanto, não exclui a possibilidade de degradação molecular do compósito. Dois animais (50%) do grupo GIII (90 dias) apresentaram o implante recoberto por uma delgada camada de tecido denso, esbranquiçado, semelhante ao osso cortical que impediu a visibilização dos implantes no momento da biópsia (Fig.18 e 20). A localização do implante foi feita pelo exame radiográfico. Após a biópsia foi confirmada sua localização por visibilização de sua superfície na região medular do osso. O recobrimento do implante por tecido sugere resposta de biocompatibilidade do implante. Isso pode ter ocorrido pelo maior tempo de permanência do implante (90 dias), tempo suficiente para permitir a colonização da superfície do compósito por tecido hospedeiro. Outra hipótese é a presença de uma maior concentração de hidroxiapatita nos fragmentos implantados nesses dois animais, devido à falha de homogeneização na fabricação das placas de compósito. A colonização de compósitos de PHB/HA por osteoblastos já foi observada em experimentos “*in vitro*” com cultura celular (Doyle et al., 1991; Shishatskaya et al., 2006) e “*in vivo*” com coelhos (Doyle et al.,

1991; Luklinska e Bonfield, 1997; Luklinska e Schluckwerder, 2003) e com ratos (Shishatskaya et al., 2006). No presente estudo, não foram observadas reações macroscópicas que sugerissem processo inflamatório ou necrótico nos tecidos adjacentes aos implantes ósseos, pelo contrário, o aspecto macroscópico era de integração entre o implante e o osso hospedeiro, inclusive com crescimento de tecido semelhante ao ósseo na superfície do implante em contato com a medular, na maioria das amostras (66,67%) (Fig.19 e 20).

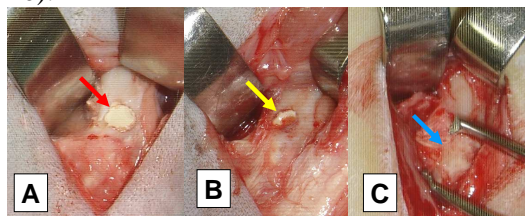


FIGURA 18: Fotografia do fêmur direito de gato no momento da biópsia. A - mostra o aspecto macroscópico do compósito de PHB/HA (seta vermelha) aos 30 dias após implantação. B - mostra o implante (seta amarela) aos 60 dias. C - mostra a região metafisária com o implante recoberto por tecido conjuntivo fibroso (seta azul) aos 90 dias.

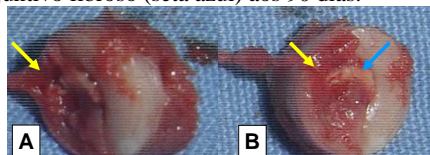


FIGURA 19: Fotografia da amostra osso-implante retirada por biópsia aos 60 dias após sua implantação. A - mostra uma visão oblíqua (a seta amarela aponta o perióstio). B - mostra uma visão da superfície periosteal do osso com o implante (seta azul) recoberto pelo perióstio (seta amarela).

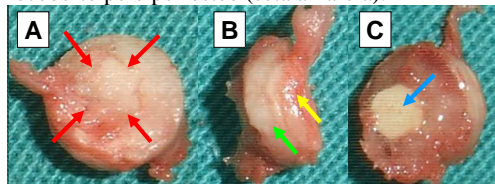


FIGURA 20: Fotografia da amostra osso-implante retirada por biópsia aos 90 dias após sua implantação. A - mostra uma visão da superfície periosteal do osso que não permite a visibilização do implante (setas vermelhas), pois encontra-se recoberto por uma camada de tecido denso. B - mostra uma visão lateral que permite avaliar a espessura da cortical (seta verde) e perióstio (seta amarela). C - visão da superfície medular do osso com o implante no seu interior (seta azul).

Avaliação histológica

A análise microscópica da cápsula e do tecido adjacente ao implante no tecido subcutâneo revelou uma resposta tecidual inflamatória granulomatosa em todas as amostras (Fig.21, 22 e 23). Verificou-se, em todos os casos, a formação de uma cápsula fibrosa e vascularizada em torno do implante e uma resposta inflamatória com infiltrado misto. Áreas focais de necrose foram observadas nos quatro animais (100%) do grupo GI (15 dias) (Fig.21). Em meio às fibras colágenas e aos fibroblastos foi observado infiltrado inflamatório misto caracterizado principalmente pela presença de macrófagos epitelióides, plasmócitos e linfócitos dispostos sobre as fibras conjuntivas (Fig.21, 22 e 23). A presença de neutrófilos foi mais evidente nos animais do grupo GI, o que já era esperado, uma vez que esse é um dos primeiros tipos celulares a atuar no processo inflamatório agudo (Gogolewski et al., 1993). Um grande número de macrófagos e de células gigantes foram observados em todos os tempos estudados e alguns possuíam vacúolos em seu citoplasma, contendo substância amorfa birrefringente semelhante ao compósito, o que sugere fagocitose já aos 15 dias após sua implantação no tecido subcutâneo do gato (Fig.22 e 23). Uma das maneiras de se avaliar os compósitos PHB/HA como biomaterial consiste na observação de sua resposta quando implantado no tecido. A biocompatibilidade, característica desejada no compósito PHB/HA, consiste na habilidade de desempenho satisfatório quando em contato com meio biológico numa dada aplicação (Davies, 2000; Jones e Hench, 2003; Hench et al., 2006).

A formação de cápsula fibrosa e a presença de infiltrado de macrófagos e de células gigantes aos 45 dias após a implantação subcutânea do compósito PHB/HA em ratos é relatada na literatura (Shishatskaya et al., 2006). A reabsorção do PHB, aos 30 dias após sua implantação no tecido subcutâneo de ratos, foi citada por Gogolewski et al.

(1993), que observaram uma redução da ordem de 9,47%, no peso dos implantes neste tempo.

A resposta tecidual subcutânea obtida no presente trabalho pode ter sido potencializada pelo pequeno movimento local dos implantes (Rezende, 2006) e foi semelhante em todos os grupos estudados, mas com tendência de redução do infiltrado inflamatório e predomínio de células mononucleares, ao longo do tempo. Também foi evidente o aumento de células gigantes no grupo GII (30) e mais acentuado no GIII (45 dias). Houve um gradual e discreto aumento do tecido conjuntivo fibroso e organização das fibras colágenas ao longo do tempo (Fig.22 e 23), quadro que sugere cronificação do processo inflamatório (Gogolewski et al., 1993). Acredita-se que a proliferação de tecido conjuntivo seja gradual nos estágios iniciais do processo inflamatório com atuação de neutrófilos, monócitos e macrófagos. Os macrófagos estimulam o recrutamento de fibroblastos oriundos dos vasos periféricos, formando uma cápsula fibrosa ao redor dos corpos estranhos (Davies, 2000).

A interface subcutâneo-implante foi constituída por tecido conjuntivo fibroso em 100% dos animais com encapsulação do compósito (Fig.21, 22 e 23). Além disso, não foi observada formação óssea na interface subcutâneo-implante em nenhum dos tempos estudados. Este comportamento também era esperado, pois nenhum dos constituintes do compósito possui propriedade de osteoindução (Knowles et al., 1992; Giannousdis et al., 2005; Duarte et al., 2006; Habibovic et al., 2006; Shishatsha et al., 2006; De Long Jr et al., 2007).

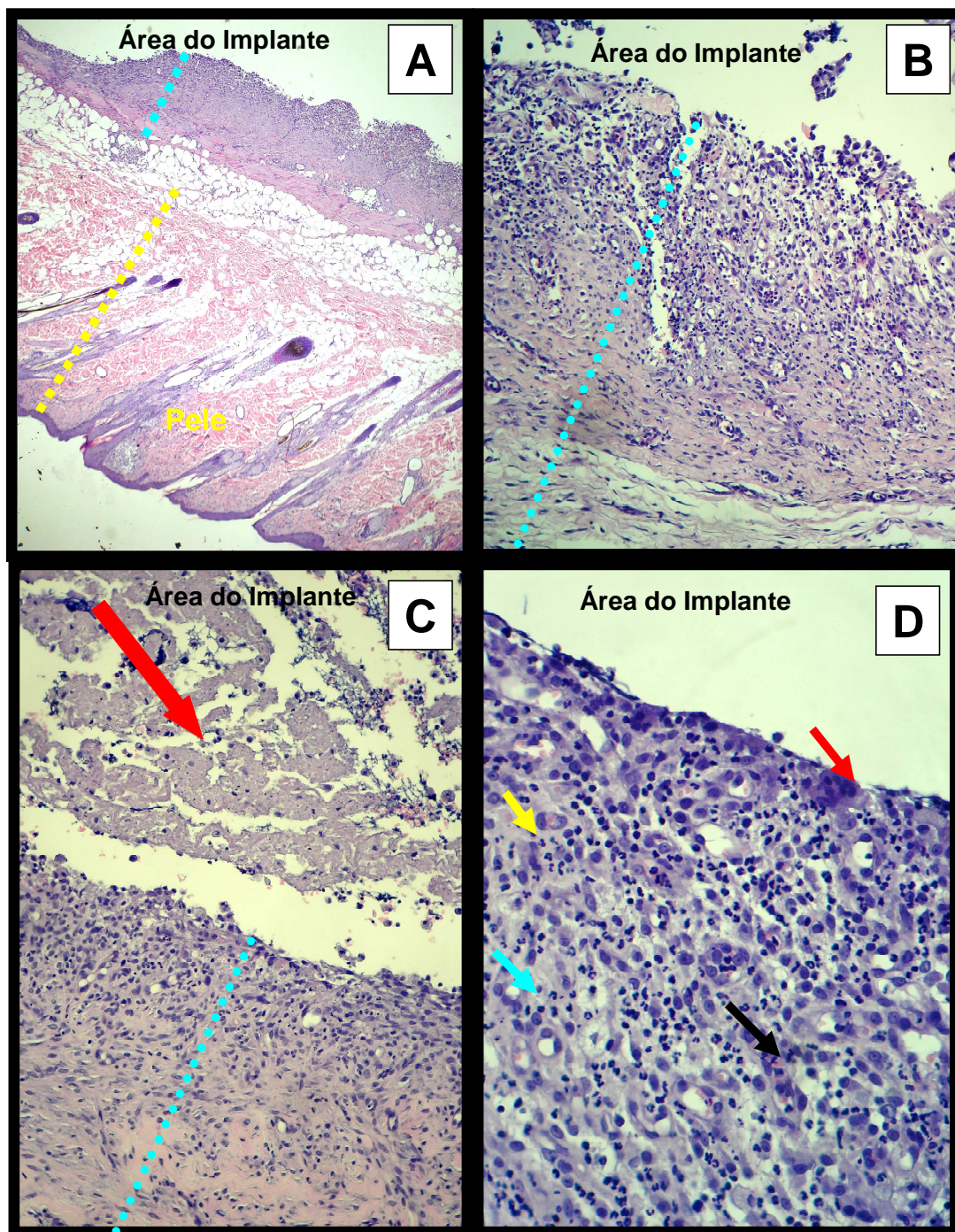


FIGURA 21: Fotomicroscopia da interface subcutâneo-implante 15 dias após a cirurgia experimental de implantação de composto PHB 70% e HA 30% no tecido subcutâneo de gatos. A – Pele (linha pontilhada em amarela), tecido subcutâneo e cápsula fibrosa sobre o implante (linha pontilhada em azul) (HE, 515,9X). B – Cápsula fibrosa em maior aumento (linha pontilhada em azul) mostrando infiltrado infamatório intenso (HE, 2733,5X). C – Área de necrose (Seta vermelha) e cápsula (linha pontilhada em azul) (HE, 3450,5X). D – Cápsula fibrosa: maior aumento mostrando os tipos celulares: células gigantes multinucleadas (seta vermelha), neutrófilo (seta amarela), linfócito (seta azul) e macrófago (seta preta) (HE, 7416X).

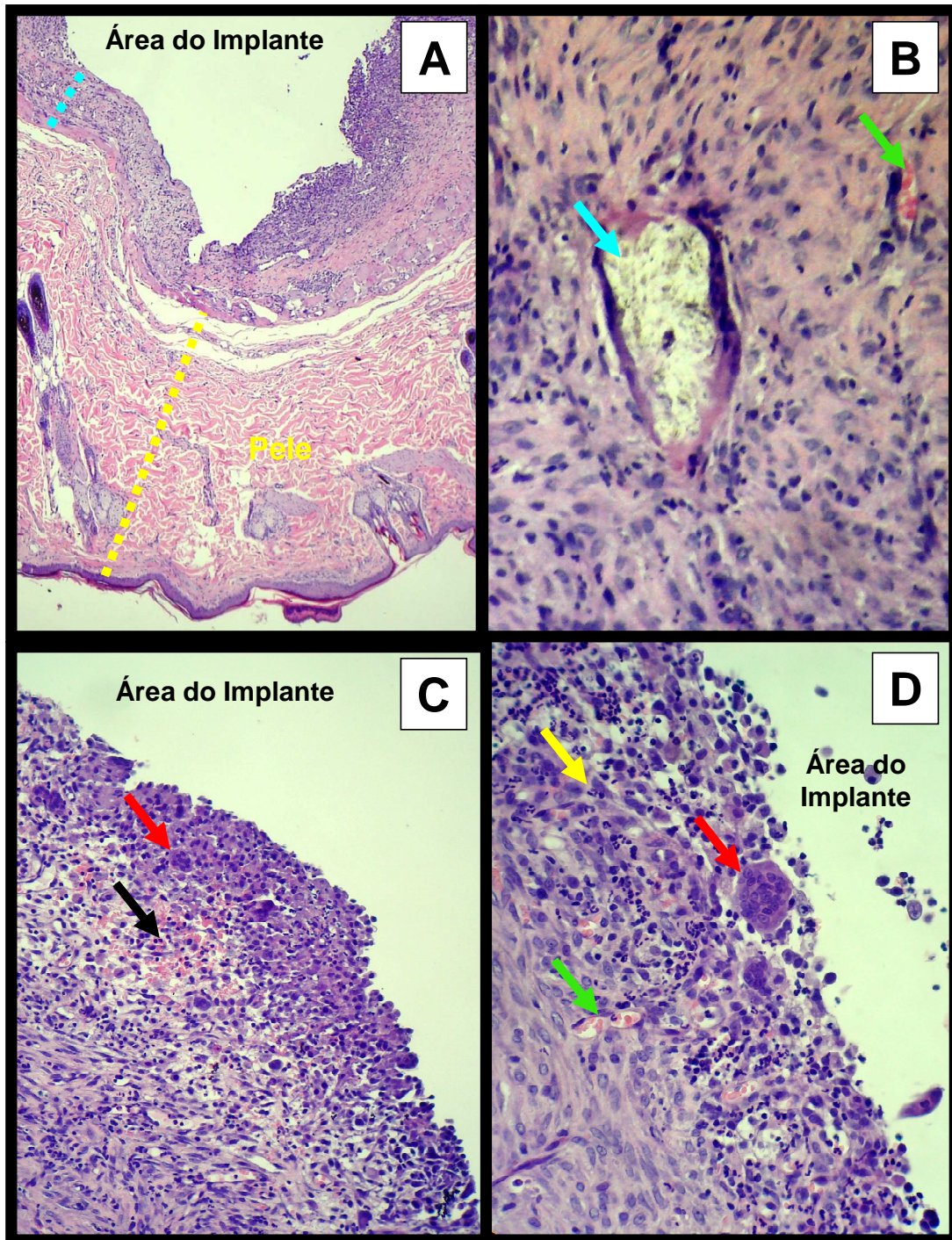


FIGURA 22: Fotomicroscopia da interface subcutâneo-implante 30 dias após cirurgia experimental de implantação de compósito PHB 70% e HA 30% no tecido subcutâneo de gatos. A – Pele (linha pontilhada em amarela), tecido subcutâneo e cápsula fibrosa sobre o implante (linha pontilhada em azul) (HE, 598,4X). B – Cápsula fibrosa em maior aumento mostrando o biomaterial (aspecto birrefringente) no interior de uma célula gigante (seta azul), a seta verde aponta um vaso (HE, 4752X). C – Cápsula fibrosa com infiltrado inflamatório intenso, células gigantes (seta vermelha) e área de hemorragia (seta preta) (HE, 2856X). D – Cápsula fibrosa: maior aumento mostrando células gigantes multinucleadas (seta vermelha), neutrófilo (seta amarela) e vaso (seta verde) (HE, 6048X).

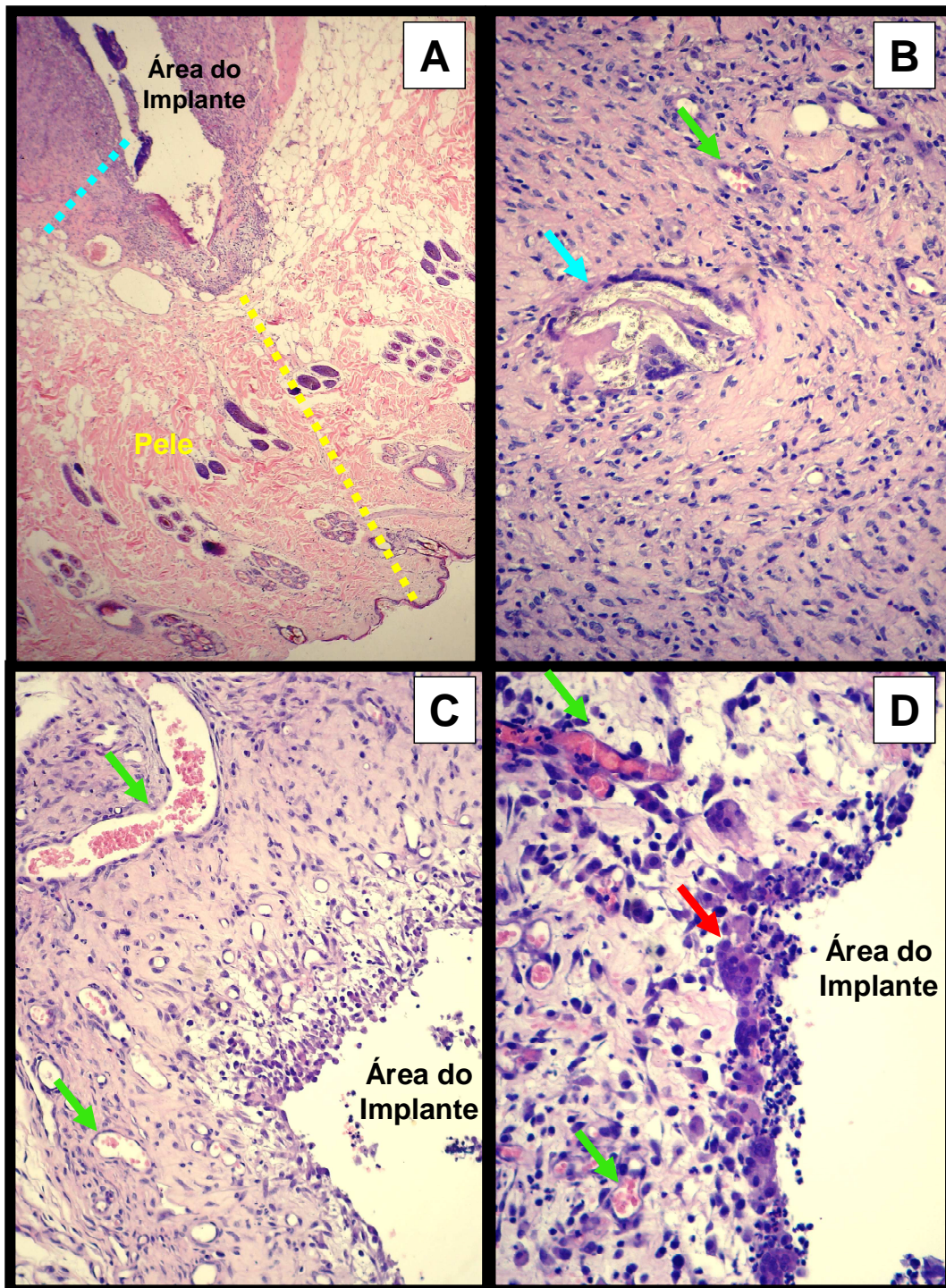


FIGURA 23: Fotomicroscopia da interface subcutâneo-implante 45 dias após cirurgia experimental de implantação de composto PHB 70% e HA 30% no tecido subcutâneo de gatos. A – Pele (linha pontilhada em amarela), tecido subcutâneo e cápsula fibrosa sobre o implante (linha pontilhada em azul) (HE, 658X). B – Cápsula fibrosa em maior aumento mostrando o biomaterial (aspecto birrefringente) no interior de uma célula gigante (seta azul), a seta verde aponta um vaso (HE, 6204X). C – Cápsula fibrosa com intensa neovascularização (setas verdes) (HE, 5414,5X). D – Cápsula fibrosa: maior aumento mostrando neovascularização (setas verdes) e células gigantes (seta vermelha) (HE, 6097X).

A avaliação histológica dos fragmentos ósseos, neste estudo, possibilitou a análise e caracterização dos diferentes tipos celulares na interface osso-implante (Fig.24, 25 e 26). Esta informação é fundamental quando se prevê o emprego clínico do material (Davies, 2000; Li et al., 2005; Rezende, 2006).

A remoção cuidadosa dos implantes para realização do processamento histológico não comprometeu a avaliação das amostras. Entretanto, fragmentos de tecido da interface podem ter ficado aderidos aos implantes e terem sido removidos junto com os mesmos, conforme já relatado na literatura (Sá et al, 2007), o ideal seria a avaliação da interface com a presença do implante, mas sua permanência nas amostras impediu o corte no micrótomo, devido à dureza do compósito.

As observações microscópicas revelaram resposta tecidual semelhante para todos os grupos avaliados GI, GII e GIII. A interface osso-implante foi constituída por tecido conjuntivo fibroso em todas as amostras ósseas e em todos os tempos verificou-se infiltrado inflamatório mononuclear, de intensidade discreta a moderada, caracterizado principalmente pela presença de macrófagos, linfócitos e células gigantes dispostos sobre as fibras conjuntivas e em torno do implante (Fig.24, 25 e 26). Este resultado mostra que a retirada do implante para inclusão em parafina não interferiu na avaliação da interface, pois ela foi constituída por tecido conjuntivo fibroso. Áreas focais de necrose óssea foram observadas no tecido adjacente ao implante e provavelmente estão relacionadas com reação inflamatória granulomatosa (tipo corpo estranho) o que sugere a rejeição dos implantes (Fig.26). Entretanto, durante a confecção dos orifícios há o aquecimento da broca e conseqüentemente do osso que pode levar a morte celular e necrose tecidual.

No presente estudo não foi observada a formação óssea em contato direto com o compósito. Outros estudos entretanto, com

material de composição semelhante mostraram efeito osteocondutor do compósito com formação de osso lamelar na interface osso-implante (Doyle et al., 1991; Luklinska e Bonfield, 1997; Luklinska e Schluckwerder, 2003). A resposta óssea a ambos os componentes do compósito PHB/HA já foi estudada, mas os resultados ainda são controversos (Blitterswijk et al., 1985; Oguchi et al., 1995; Hu et al., 2004; Duarte et al., 2006; Vallet-regi et al., 2006; Mygind et al., 2007). Alguns trabalhos relatam efeito osteocondutor da HA com colonização da sua superfície por osteoblastos e crescimento de osso lamelar (Hu et al., 2004; Duarte et al., 2006; Mygind et al., 2007) no entanto, outros relatam efeitos negativos da HA como resposta inflamatória exacerbada (Blitterswijk et al., 1985) e até mesmo rejeição dos implantes (Oguchi et al., 1995). Acredita-se que a eficiência biológica da HA esteja associada a diversos fatores como sua origem, pureza e arquitetura dos implantes (Rezende, 2006). A influência da arquitetura do implante na sua capacidade de osteocondução já foi estudada e é consenso entre os pesquisadores, a importância do diâmetro dos poros e da interconectividade entre eles (Chen et al., 2001; Eppley et al., 2005; Habibovic et al., 2006). O tamanho do poro da matriz deve ser semelhante ao do osso esponjoso (Watson, 2005), para permitir a invasão vascular, colonização celular e substituição por tecido ósseo (Geissler, 2006). O diâmetro do poro deve ser de 150 a 500µm (Chen et al., 2001; De Long Jr. et al., 2007), mas poros muito amplos podem enfraquecer o implante (Geissler, 2006). A interconectividade entre os poros é tão importante quanto o tamanho, pois influencia diretamente na tensão de oxigênio que está diretamente relacionada com a diferenciação das células tronco mesenquimais em células osteoprogenitoras e dessas em osteoblastos (De Long Jr. et al., 2007).

A resposta encontrada no presente trabalho pode ser devido à alta densidade (ausência de poros) do material utilizado e a baixa quantidade de HA, componente osteocondutor do compósito (Duarte et al., 2006; Mygind et al., 2007). O PHB, outro componente do compósito utilizado no presente trabalho, é um polímero conhecido por ser biocompatível, reabsorvível e pelas suas propriedades mecânicas favoráveis para produção de implantes ortopédicos (Vainionpää et al., 1986; Gogolewski et al., 1993; Zhao et al., 2002) principalmente quando reforçado com HA (Doyle et al., 1991; Knowles et al., 1992; Boerre et al., 1993; Luklinska e Bonfield, 1997; Luklinska e Schluckwerder, 2003; Shishatskaya et al., 2006). Entretanto, o PHB incita uma resposta inflamatória crônica por períodos superiores a 12 meses, produzindo geralmente encapsulação do implante e reabsorção gradual do mesmo (Doyle et al.,

1991; Gogolewski et al., 1993; Rezwan et al., 2006), o que justifica os resultados encontrados no presente trabalho. A proposta do material deste estudo é ser reabsorvida lentamente, razão de sua alta densidade.

A presença de macrófagos e de células gigantes com citoplasma repleto de vacúolos, contendo substância amorfa birrefringente semelhante ao compósito, foi evidente em todos os grupos estudados e sugere reabsorção do compósito já aos 30 dias de implantação óssea (Fig.24 e 25), diferente de Doyle et al. (1991) que não encontraram indícios de reabsorção do compósito PHB/HA antes dos três meses de implantação em fêmur de coelhos.

Ao exame histológico do tecido denso, esbranquiçado e firme que recobria duas amostras aos 90 dias, verificou-se tratar de tecido conjuntivo fibroso e não ósseo, como pareceu à macroscopia.

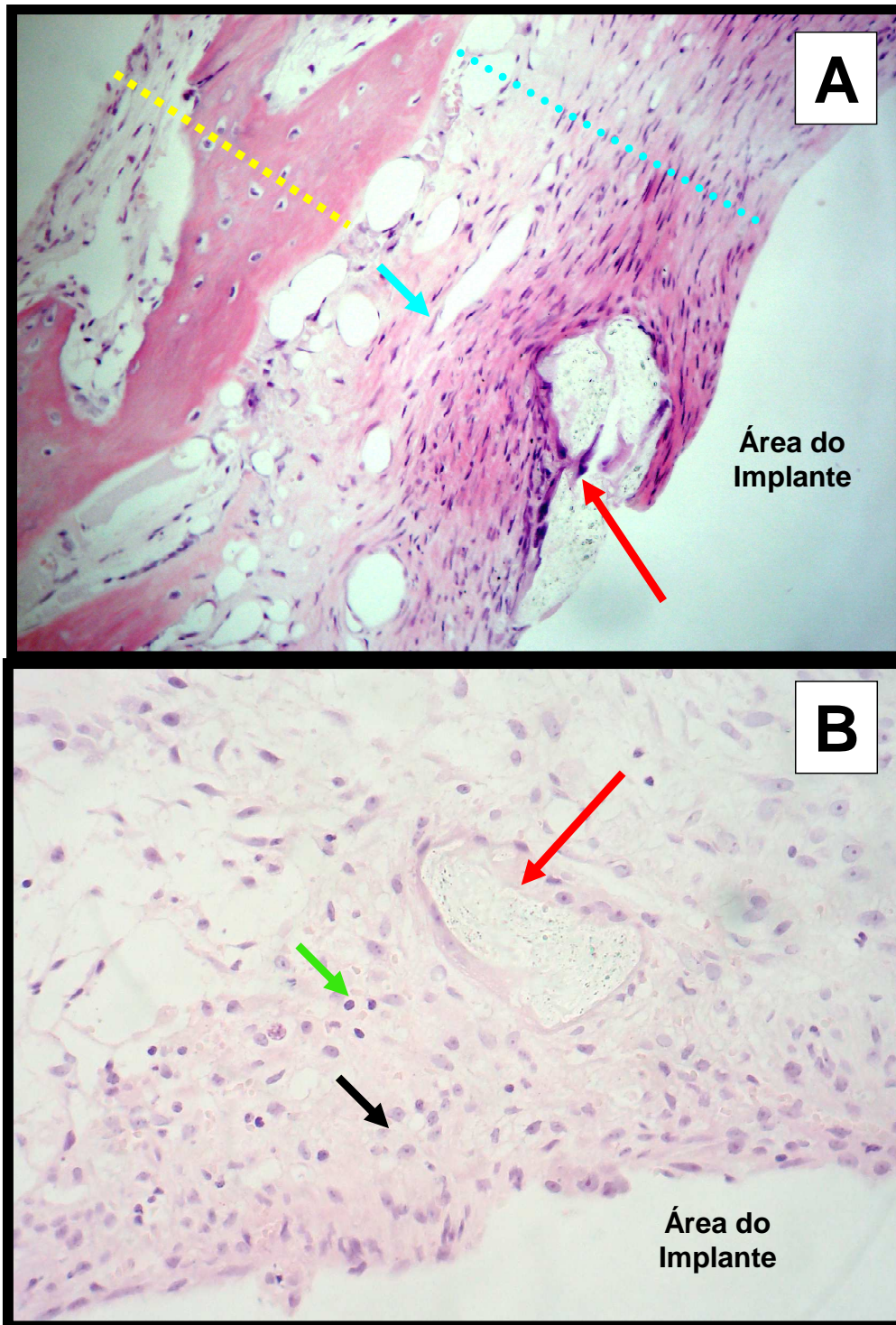


FIGURA 24: Fotomicroscopia da interface osso-implante na metáfise distal de fêmur de gatos aos 30 dias. A – Osso trabecular adjacente ao implante (linha pontilhada em amarela), cápsula fibrosa sobre o implante (linha pontilhada em azul), a seta azul aponta fibroplasia e a vermelha o biomaterial (aspecto birrefingente) parcialmente envolvido pela cápsula fibrosa (HE, 119,21X). B – Cápsula fibrosa mostrando infiltrado inflamatório formado principalmente por macrófagos (seta preta) e linfócitos (seta verde). A seta vermelha aponta o biomaterial (aspecto birefingente) no interior de uma célula gigante (HE, 13068X).

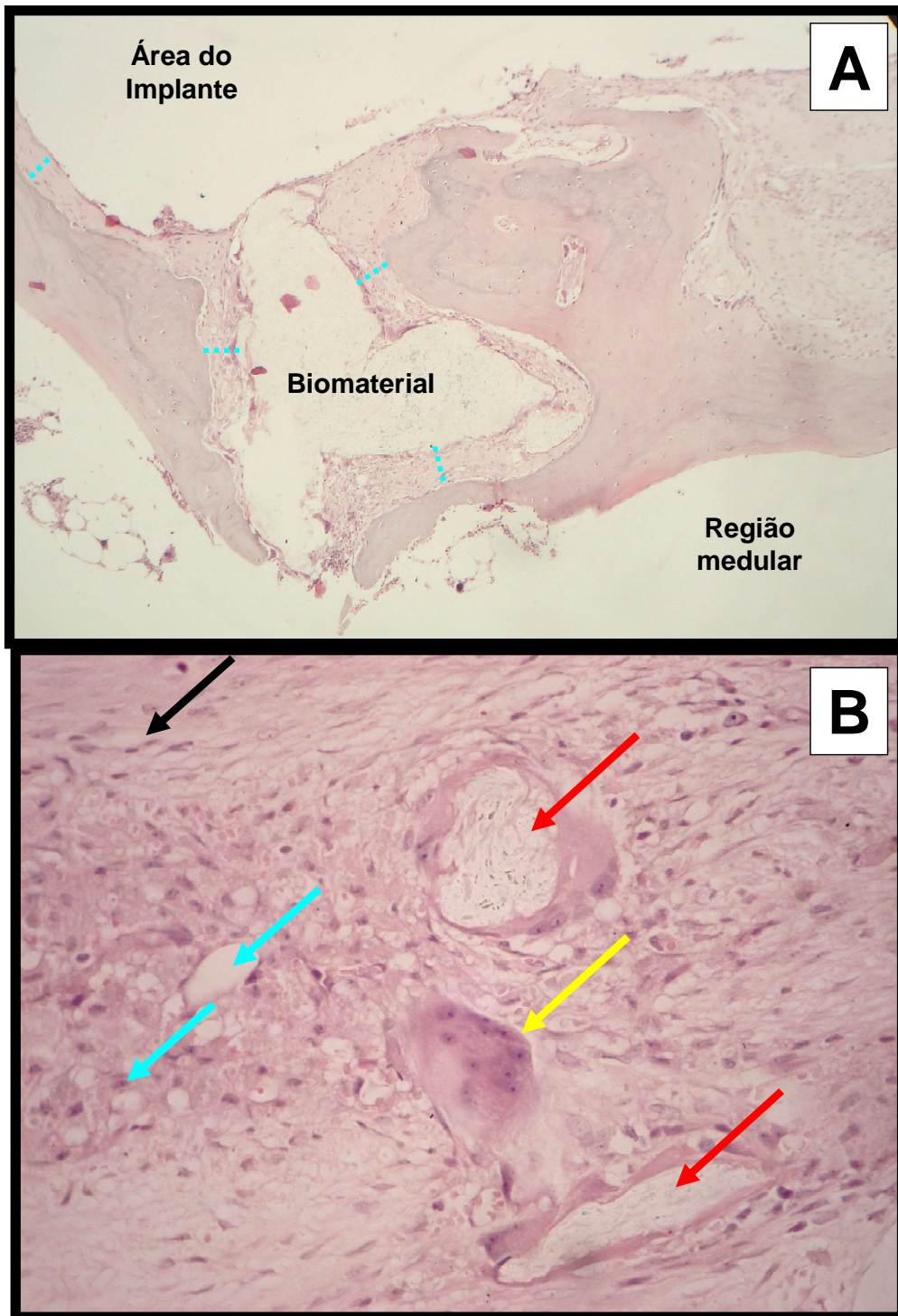


FIGURA 25: Fotomicroscopia da interface osso-implante na metáfise distal de fêmur de gatos aos 60 dias. A – biomaterial (aspecto birefringente) circundado por tecido conjuntivo (linha pontilhada em azul) e por tecido ósseo (HE, 3350X). B – Cápsula fibrosa em maior aumento mostrando infiltrado inflamatório formado principalmente por macrófagos (seta azuis) e células gigantes (seta amarela). A seta vermelha aponta o biomaterial (aspecto birefringente) no interior de uma célula gigante e a preta mostra um fibroblasto (HE, 22324,4X).

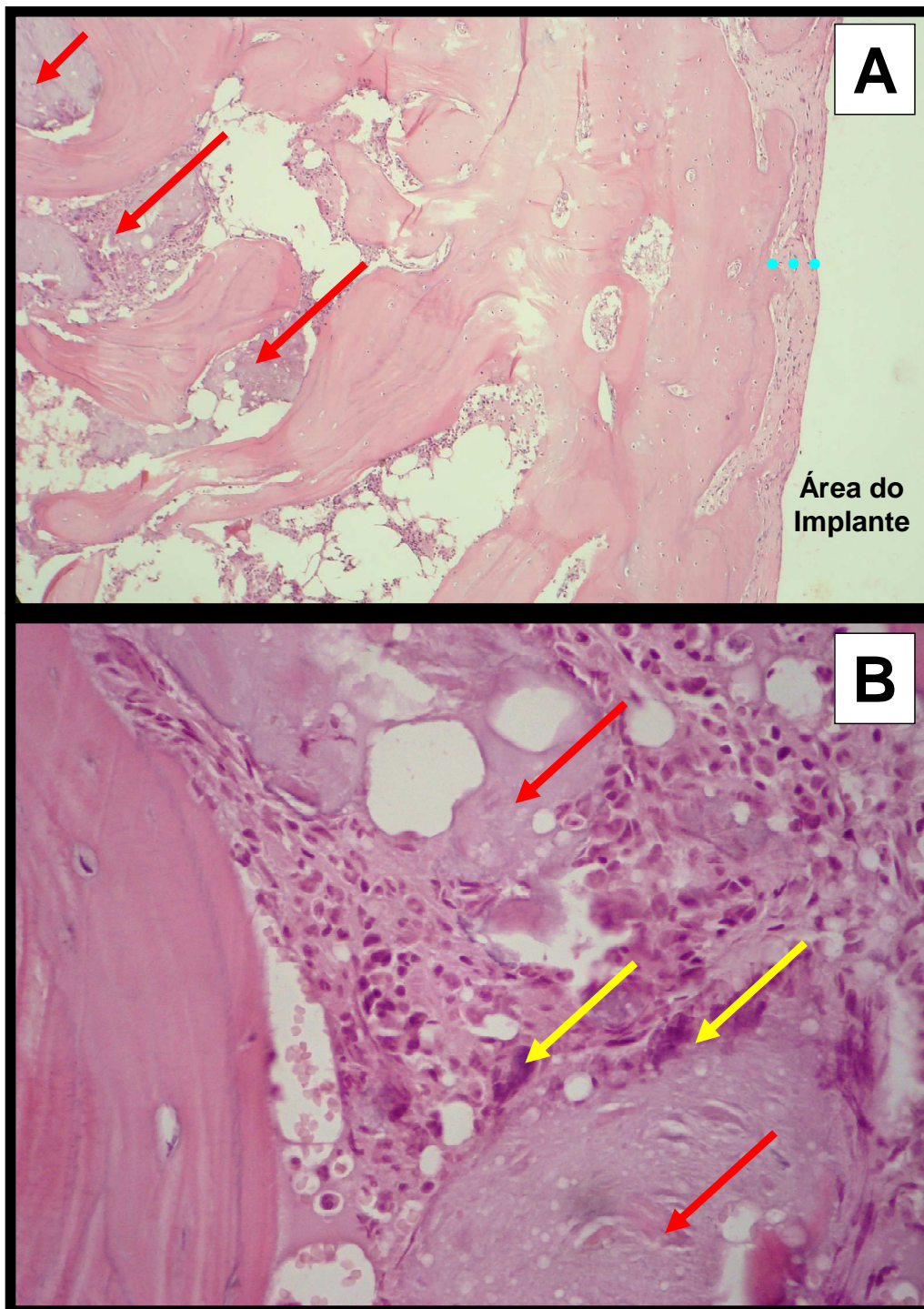


FIGURA 26: Fotomicroscopia da interface osso-implante na metáfise distal de fêmur de gatos aos 90 dias. A – Área focal de necrose óssea próxima área de implantação do biomaterial (setas vermelhas). Notar a cápsula (linha pontilhada em azul) (HE, 3420X). B – Área focal de necrose óssea (setas vermelhas). As setas amarelas apontam osteoclastos (HE, 32832X).

4.3 Emprego experimental da placa de compósito na fixação do fêmur

Os testes mecânicos apresentaram resultados semelhantes quanto à força máxima e ao torque máximos das amostras fixadas com placas de aço e com as de compósito. Esse resultado estimulou a realização do teste “*in vivo*” como placa de fixação de fraturas. Os resultados levavam a crer que as placas compostas de PHB (70%) e HA (30%) fossem capazes de prover rigidez suficiente durante a regeneração óssea (Doyle et al., 1991; Knowles et al., 1992; Boerre et al., 1993; Luklinska e Bonfield, 1997; Luklinska e Schluckwerder, 2003; Shishatskaya et al., 2006), e ao mesmo tempo permitir a transferência gradual da tensão do implante para o osso em consolidação, prevenindo assim o acúmulo de tensão no implante e o estresse de proteção (Bergsma et al., 1995; Elias et al., 1997; An et al., 1998; An et al., 2000; Cordey et al., 2000; Wang, 2003; Uthoff et al., 2006), com conseqüente favorecimento da consolidação óssea (Ocarino e Serakides, 2006; Ocarino et al., 2007; Skerry, 2008).

Foram operados quatro gatos num total de seis intervenções. No trans-operatório verificou-se mínimo sangramento, fato já esperado devido à espécie utilizada. O acesso ao fêmur segundo Piermattei e Johnson (2004) foi fácil e permitiu exposição do osso, sem dificuldades, o que assegurou a realização da osteotomia com segurança e com mínima lesão dos tecidos adjacentes. No primeiro caso operado verificou-se, no momento da fixação final do último parafuso, a fissura longitudinal da placa no segmento proximal. Isso ocorreu devido à excessiva pressão dos parafusos sobre a placa, que foi imediatamente substituída, tomando-se o cuidado de não apertar excessivamente os parafusos, justapondo-os firmes às placas, mas sem excessivo torque. Esse animal apresentou, a partir do 15º dia de pós-operatório, um aumento de volume progressivo de consistência firme, na região femoral

correspondente ao foco de osteotomia. À palpação, verificou-se estabilidade local que manteve-se até aos 21 dias, quando foi percebido discreto movimento no foco de osteotomia, caracterizando a ruptura do implante. Procedeu-se ao exame radiográfico que além de confirmar a ruptura da placa, mostrou uma imagem característica de calo cartilaginoso exuberante com áreas de ossificação (Fig.27). O surgimento do calo exuberante no foco de osteotomia indica instabilidade dos fragmentos ósseos, que geralmente está associada à falha na fixação óssea (Van Frank Haasnoot et al., 1995; Rahn, 2002; Stiffler, 2004; Piermattei et al., 2006; Thompson, 2007). Como havia calo e o animal apoiava o membro, manteve-se o gato sob observação. Aos 28 dias de pós-operatório já havia estabilidade do foco de osteotomia e os fragmentos ósseos apresentavam-se alinhados axialmente, não se justificando nova intervenção. Embora a placa não tenha resistido pelo tempo desejado, ela também não impediu a consolidação óssea que se deu com a formação de um calo exuberante devido à instabilidade do foco de osteotomia (Rahn, 2002; Roe, 2003; Stiffler, 2004; Piermattei et al., 2006).

No segundo animal houve quebra do implante 24 após a cirurgia, sendo novamente operado para a substituição do mesmo. No entanto, quatro dias após a segunda intervenção o novo implante também se rompeu, fazendo-se necessária nova cirurgia para fixação da fratura por outros métodos. Após a ocorrência consecutiva da ruptura desses três exemplares, interrompeu-se temporariamente o seu emprego experimental.

A ruptura dessas placas mostrou a existência de bolhas no seu interior, levando à proposição de se avaliar radiograficamente as demais, que revelou a presença de várias áreas de radioluscência no interior dos implantes, correspondentes a bolhas (Fig.28). A ruptura da placa portanto,

poderia estar associada a um defeito estrutural decorrente possivelmente da injeção não mecanizada com baixa pressão, que poderia ocasionar o surgimento de bolhas no interior da placa e o seu enfraquecimento. Verificou-se também que algumas placas mostravam discreta variação na densidade radiográfica. Essa diferença de densidade radiográfica observada em algumas áreas das placas sugeriu ausência de homogeneidade no material. A maior concentração de hidroxiapatita em alguma parte do implante poderia levar à fragilidade dessa área (Doyle et al., 1991; Knowles et al., 1992; Boerre et al., 1993; Liu e Wang, 2005) predispondo a ruptura, assim como evidenciado por Oliveira (2005). Após a identificação das possíveis causas de falha, as placas foram substituídas por um novo lote, fabricado com todos os cuidados necessários para adequada homogeneização do material e injeção mecanizada sob alta pressão, para certificar a produção de placas homogêneas e sem bolhas no interior. No entanto, o novo lote de placas, confeccionado de forma melhorada, também apresentou alguns exemplares com defeito, detectado ao exame radiográfico e foram descartadas (Fig.29). Uma vez garantida a qualidade dos implantes retomou-se o emprego experimental da placa em outros dois animais. Um permaneceu com o implante íntegro por 24 horas e o outro por quatro dias (Fig.30). A imagem radiográfica do fêmur após a falha do implante está ilustrada na figura 31. O animal que apresentou a ruptura do implante nas primeiras 24 horas foi novamente operado e teve o fêmur estabilizado pela associação da placa com uma haste bloqueada com 4mm de diâmetro. Esta combinação entretanto, não foi suficiente para impedir a quebra de ambos os implantes, observada também 24 horas após a cirurgia. Todos os animais que apresentaram ruptura do implante e necessitaram de uma nova intervenção cirúrgica para estabilização femoral foram submetidos a novo tratamento e

encaminhados à adoção, após a completa reparação óssea.

O osso está sujeito às forças de compressão e tensão axiais, flexão e torção, denominadas forças primárias (Roe, 2003; Stiffler, 2004; Piermattei et al., 2006). Na prática, entretanto, essas forças podem agir isoladamente ou em conjunto, resultando num padrão complexo de tensões e deformações sobre osso e o implante (Radasch, 1999; Hulse e Hyman, 2003), o que pode justificar a falha das placas de compósito no teste “*in vivo*”, apesar do resultado semelhante entre as placas de aço e de compósito nos testes mecânicos. Outro fator a se considerar é o osso empregado, fêmur, que está fisiologicamente submetido à carga excêntrica suportando por isso uma maior força de flexão (Hulsel e Hyman, 2003), o que poderia ocasionar sobrecarga no implante nesse sentido. Talvez a utilização de outro osso como modelo experimental ocasionasse um resultado diferente, como o relatado por Saikku-Bäckström et al. (2005) após o emprego de placas de ácido polilático em rádio de cães, associado à imobilização externa, que reduz o estresse e possibilita a permanência do implante até a cura, na maioria dos casos. No presente estudo, além de se utilizar um osso diferente, o fêmur, não se empregou a imobilização externa para auxiliar a estabilização óssea. O rádio não foi utilizado como modelo experimental devido a grande largura e espessura da placa em relação ao osso, o que impediria sua adequada cobertura pelo tecido mole.

Outra razão para falha das placas de compósito no seu emprego “*in vivo*” é a baixa ductibilidade do material, que permite mínima deformação antes de sua ruptura. Ao atingir o limite de sustentação de força, a placa quebra sem se deformar, fato já evidenciado nos testes mecânicos. “*In vivo*” tem-se um conjunto de ossos e músculos que associados à biomecânica locomotora podem exigir certa adaptação plástica e elástica do material utilizado nos implantes de fixação óssea (Hulse e Hyman, 2003).

Durante os testes mecânicos e “in vivo” essa capacidade adaptativa não foi observada no compósito utilizado no presente estudo, e foi considerada uma das causas de falha do implante. A fadiga ocasionada pela aplicação repetida de carga no implante durante o apoio do membro no pós-operatório (Hammel et al., 2006) também pode ter ocasionado a falha daquele que permaneceu 21 dias. Esse tempo é ainda curto, o implante reabsorvível deve ser capaz de manter sua resistência pelo menos por 60 dias.

Diante dos resultados obtidos decidiu-se encerrar o emprego experimental da placa de PHB/HA, na metodologia proposta, uma vez que o material não mostrou resistência suficiente para ser utilizado como placa para fixação óssea em fêmur de gato.

As placas fraturadas foram guardadas e posteriormente analisadas com o objetivo de se identificar as forças responsáveis pela falha do implante. Das seis placas fraturadas, cinco (83,33%) apresentaram uma linha de fratura oblíqua curta localizada entre os orifícios centrais da placa e sempre passando por um deles (Fig.32) e em apenas uma placa (16,67%) a linha de fratura foi transversal localizada entre os orifícios centrais. Isso ocorreu provavelmente pela maior concentração de tensão nessa área e pela fragilização da placa pelos orifícios dos parafusos adjacentes à linha de osteotomia, como evidenciado por Elmaraghy et al. (2001), Ganesh et al. (2005) e Hammel et al. (2006).

A osteotomia transversal no terço médio de diáfise femoral, como utilizado no presente trabalho, não é uma situação simples de neutralização de forças. Neste caso tem-se atuante no foco, os três esforços principais de flexão, torção e compressão (Radasch, 1999; Hulse e Hyman, 2003). Esses esforços são transferidas do osso para placa e há uma concentração de tensão no implante, adjacente à linha de osteotomia (Hammel et al., 2006; Esenkaya et al., 2007). Esse implante deve apresentar resistência suficiente para neutralizar a estas forças por

um período mínimo de cerca de três semanas, quando a presença do calo ósseo já oferece certa estabilidade como ocorreu no primeiro caso operado. O local de ruptura de todos os implantes deste estudo foi o terço médio, que segundo a literatura é, geralmente, o ponto mais freqüente de falha das placas de fixação óssea (Elmaraghy et al., 2001; Ganesh et al., 2005; Hammel et al., 2006).

No modelo de fratura utilizado no presente estudo, o esforço de compressão axial é sustentado parcialmente pela placa de fixação, uma vez que parte dele é sustentado pelo próprio osso que se encontra justaposto. Já os esforços de flexão e de torção são sustentados quase que exclusivamente pela placa de fixação. Muito embora os valores de força suportados pelas placas de aço e de compósito não tenham apresentado diferença significativa nos testes mecânicos, as placas de compósito se romperam quando empregadas “in vivo”, originando um tipo predominante de linha de fratura da placa (Fig.32) como observado nos testes de flexão e torção com os modelos. Isso leva a inferir que essas forças foram as mais relevantes no estudo “in vivo”. Durante os testes mecânicos as fraturas oriundas da torção apresentaram predominantemente uma linha de ruptura oblíqua longa. Já as fraturas obtidas pelo teste de flexão apresentaram linha de ruptura transversal também localizada entre os orifícios centrais. Devido a isso, pode-se inferir que os esforços responsáveis pela falha do implante foram os de torção e de flexão, associados à baixa ductibilidade da placa de compósito. Diante dos resultados obtidos no emprego experimental da placa pode-se afirmar que a placa de fixação óssea composta de PHB (70%) e HA (30%) não possui resistência mecânica suficiente para fixar fraturas de fêmur em gatos.

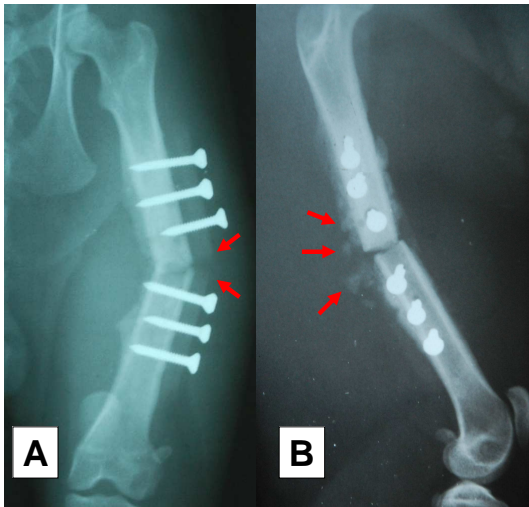


FIGURA 27: Imagem radiográfica do fêmur esquerdo de gato 21 dias após osteotomia transversal no terço médio e fixação com placa de compósito PHB (70%) e HA (30%). A - projeção crânio-caudal, notar a ruptura da placa (setas vermelhas). B - projeção médio-lateral, notar os focos de ossificação do calo (Setas vermelhas)

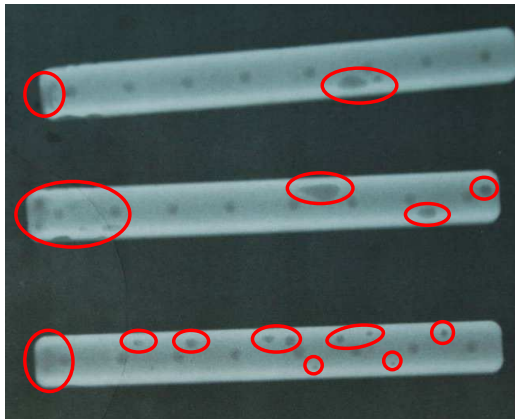


FIGURA 28: Imagem radiográfica de três placas de compósito de PHB (70%) e HA (30%) pertencentes ao primeiro lote. Os círculos vermelhos evidenciam manchas radiolúcidas que correspondem a bolhas de ar no interior do material.



FIGURA 29: Imagem radiográfica de duas placas de compósito de PHB (70%) e HA (30%) pertencentes ao segundo lote. A - placa sem bolhas selecionada para utilização no experimento. B - placa com bolha (circulo vermelho) que foi descartada.

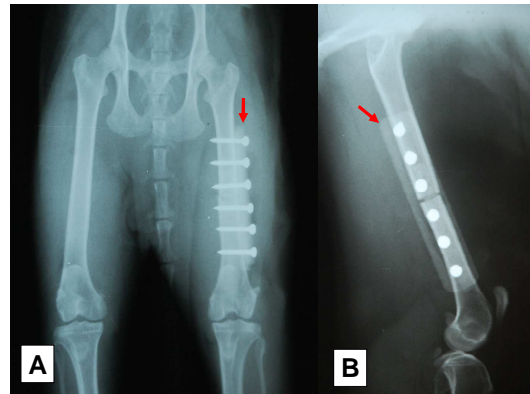


FIGURA 30: Imagem radiográfica do fêmur esquerdo de um gato imediatamente após a fixação da osteotomia transversal no terço médio com placa de compósito PHB (70%) e HA (30%) (setas vermelhas). A - projeção crânio-caudal. B - projeção médio-lateral.

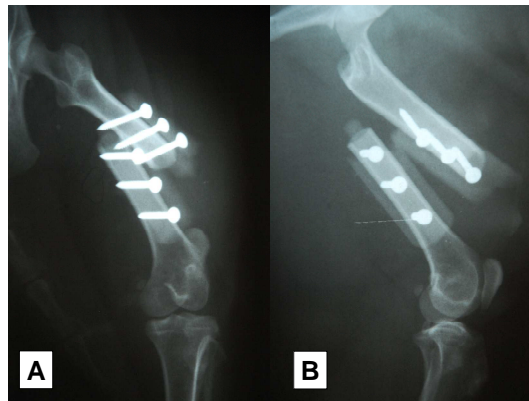


FIGURA 31: Imagem radiográfica do fêmur esquerdo de um gato 24 horas após a cirurgia para fixação óssea apresentando ruptura da placa de compósito PHB (70%) e HA (30%). A - projeção crânio-caudal. B - projeção médio-lateral.



FIGURA 32: Fotografia de duas placas de compósito de PHB (70%) e HA (30%) uma íntegra (B) e outra após ser retirada do animal, apresentando ruptura oblíqua curta passando por um dos orifícios centrais (A).

5. Conclusão

Nas condições em que foi realizada essa pesquisa e diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O compósito PHB (70%) e HA (30%) não possui resistência suficiente para ser utilizado como placa de fixação óssea em fêmur de gatos devido a falha por ruptura do implante.
- O compósito PHB (70%) e HA (30%) não é osteocondutor e não permite a invasão vascular.
- A ductibilidade do material é tão importante quanto a força máxima e o torque máximo, pois permite que a placa se deforme sem se romper, e por isso deve ser considerada na proposição de compósitos para utilização em fixação de fraturas.

6. Perspectivas futuras

Uma alternativa para melhorar as propriedades elásticas e plásticas da placa de compósito PHB (70%) e HA (30%) pode estar na incorporação de fibras biocompatíveis ao compósito, o que poderia aumentar sua resistência quanto à ruptura, permitindo certo grau de elasticidade e plasticidade ao implante. Para isso, são necessários mais estudos com o objetivo de identificar o material mais adequado para a confecção dessas fibras e o teste desse novo compósito.

7. Referências Bibliográficas

AN, Y.H.; FRIEDMAN, R.J.; POWER, D.L. et al. Fixation of osteotomies using bioabsorbable screws in the canine femur. *Clin Orthop Relat Res*, n.355, p.300-311, 1998.

AN, Y.H.; WOOLF, S.K.; FRIEDMAN, R.J. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials*. v.21, n.24, p.2635-2652, 2000.

BACKMAN, D.; UHTHOFF, H.; POITRAS, P.; et al. Mechanical performance of a fracture plate incorporating bioresorbable inserts. *J Bone Joint Surg Proceed Br*. v.86, n.3, p.300, 2004.

BERGSMA, J.E.; BRUIJN, W.C.; ROZEMA, F.R. et al. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plate and screws. *Biomaterials*. v.16, n.1, p.25-31, 1995.

BLITERSWIJK, C.A.; GROTE, J.J.; KUYPERS, W.; et al. Bioreactions at the tissue/hydroxyapatite interface. *Biomaterials*. v.6, n.4, p.243-251, 1985.

BOERRE, N.R.; DOVE, J.J.; COOPER, J.; et al. Development of a degradable composite for orthopaedic use: Mechanical evaluation of an hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite material. *Biomaterials*. v.14, n.10, p.793-796, 1993.

CHEN, G.; USHIDA, T.; TATEISHI, T. Development of Biodegradable Porous Scaffolds for Tissue Engineering. *Mater Sci Eng C*. v.17, n.1-2., p.63-69, 2001.

CORDEY, J.; PERREN, S.M.; STEINEMANN, S.G. Stress protection due to plates: myth or reality? A parametric analysis made using the composite beam theory. *Injury*. v.31, n.1, supl.3, p.1-13, 2000.

CULLUM, P.E.; FROST, D.E.; NEWLAND, T.B.; et al. Evaluation of hydroxyapatite particles in repair of alveolar clefts in dogs. *J Oral Maxillofac Surg*. v.46, n.4, p.290-296, 1988.

DAVIES, J.E. *Bone Engineering*. Toronto: EM2, 2000 p.575-584.

- DE LONG JR, W.G.; EINHORN, T.A.; KOVAL, K.; et al. Bone Grafts and Bone Substitutes in Orthopaedic Trauma Surgery. A Critical Analysis. *J Bone Joint Surg.* v.89, n.3, p.649-658, 2007.
- DOYLE, C.; TANNER, K.E.; BONFIELD, W. *In vitro* and *in vivo* evaluation of polyhydroxybutyrate and polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite. *Biomaterials.* v.12, n.9, p.841-847, 1991.
- DUARTE, T.S.; BORGES, A.P.B.; LAVOR, M.S.L.; et al. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos histológicos. *Arq Bras Med Vet Zootec.* v.58, n.5, p.849-853, 2006.
- ELIAS, N. LEAL, D.T.N.; SANTOS, L.A.M. Fixação do tornozelo com parafusos biodegradáveis. *Rev Bras Ortop.* v.32, n.4, p.319-322, 1997.
- ELMARAGHY, A.W.; ELMARAGHY, M.W.; NOUSIAINEN, M.; et al. Influence of number of cortices on the stiffness of plate fixation of diaphyseal fractures. *J Orthop Trauma.* v.15, n.3, p.186-191, 2001.
- EPPLEY, B.L.; PIETRZAK, W.S.; BLANTON, M.W. Allograft and alloplastic bone substitutes: A review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg.* v.16, n.6, p.981-989, 2005.
- ESENKAYA, I.; MISIRLIOGLU, M.; KELESTEMUR, M.H.; et al. Biomechanical evaluation of different fixation plates in medial opening upper tibial osteotomy. *Knee.* v.14, n.1, p.46-50, 2007.
- FOUX, A.; YEADON, A.J.; UHTHOFF, H.K. Improved fracture healing with less rigid plates: A biomechanical study in dogs. *Clin Orthop.* v.339, p.232-245, 1997.
- GALVAO, S.R.; DEL CARLO, R.J.; VARGAS, M.I. et al. Avaliação das alterações ósseas após emprego de placas ortopédicas de aço inoxidável e placas confeccionadas a partir de policloreto de vinila (PVC) na mandíbula de cães. *Veterinária Notícias,* v.5, n.1, p.25-33, 1999.
- GANESH, V.K.; RAMAKRISHMA, K; GHISTA, D.N. Biomechanics of bone-fracture fixation by stiffness-graded plate in comparison with stainless-steel plates. *Biomed Eng Online.* v.2, n.44, p.1-15, 2005.
- GEISSLER, W.B. Bone Graft Substitutes in the Upper Extremity. *Hand Clin.* v.22, n.3, p.329-339, 2006.
- GIANNOUDIS, P.V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. *Injury.* v.36, n.3, p.20-27, 2005.
- GOGOLEWSKI, S.; JOVANOVIC, M.; PERREN, S.M.; et al. Tissue response *in vivo* degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly(3-hydroxibutirato) (PHB), and poly(3-hydroxibutirato-co-3-hidroxi valerato) (PHB/VA). *J Biomed Mater Res.* v.27, n.9, p.1135-1148, 1993.
- GUNEW, M.N.; MENRATH, V.H; MARSHALL, R.D. Long-term safety, efficacy and palatability of oral meloxicam at 0,01-0,03 mg/kg for treatment of osteoarthritic pain in cats. *J Feline Med Surg.* v.10, n.3 p.235-241, 2008.
- HABIBOVIC, P.; YUAN, H.; VAN DEN DOEL, M.; et al. Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthopaedic defect. *J Orthop Res.* v.24, n.5, p.867-876, 2006.
- HAMMEL, S.P.; PLUHAR, G.E.; NOVO, R.E. et al. Fatigue analysis of plates used for fractures stabilization in small dogs and cats. *Vet Sug.* v.35, n.6, p.573-578, 2006.

- HENCH, L.L.; PEREIRA, M.M.; ORÉFICE, R.L.; et al. Biocompatibilidade, Bioatividade e Engenharia de Tecidos. In: ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. (Ed) *Biomateriais Fundamentos e Aplicações*. 1ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2006. p.481- 506.
- HU, Q.; LI, B.; WANG, M.; et al. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials*. v.25, n.5, p.779-785, 2004.
- HULSE, D.; HYMAN, D. Fracture biology and biomechanics. In: SLATTER, D. (Ed). *Textbook of small Animal Surgery*. v.1. 3ed. Philadelphia:Saunders. 2003. p.1785-1792.
- JONES, J.R.; HENCHCH, L.L. Regeneration of Trabecular Bone Using Porous Ceramics. *Curr Opin Solid State Mater*. v.7, n.4-5, p.301-307, 2003.
- KNOWLES, J.C.; HASTINGS, G.W. *In vivo* degradation of polyhydroxybutyrate/polyhydroxyvalerate copolymer. *J Mater Sci Mater Med*. v.3, n.5, p.352-358, 1992.
- KNOWLES, J.C.; HASTINGS, G.W.; OHTA, H.; et al. Development of a degradable composite for orthopaedic use: *in vivo* Biomechanical and histological evaluation of two bioactive degradable composites based on the polyhydroxybutyrate polymer. *Biomaterials*. v.13, n.8, p.491-496, 1992.
- LANE, W.A. Some remarks on the treatment of fractures. *BMJ*. v.1, p. 861-863, 1895.
- LI, H.; DU, R.; CHANG, J. Fabrication, characterization, and *in vitro* degradation of composite scaffolds based on PHBV and bioactive glass. *J Biomater Appl*. v.20, n.2, p.137-155, 2005.
- LIU, Y.; WANG, M. Manufacture and characterization of bioactive and biodegradable composite developed for bone tissue repair. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. v.4, n.1, p.4103-4106, 2005.
- LUKLINSKA, Z.B.; BONFIELD, W. Morphology and ultrastructure of the interface between hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite implant and bone. *J Mater Sci Mater Med*. v.8, n.6, p.379-383, 1997.
- LUKLINSKA, Z.B.; SCHLUCKWERDER, H. *In vivo* response to HA-polyhydroxybutyrate/polyhydroxyvalerate composite. *J Mycrosoc*. v.211, n.2, p.121-129, 2003.
- MACDONALD, D.J.; ENNEKING, W.F.; SUNDARAM, M. Metal-associated angiosarcoma of bone: report of two cases and review of literature. *Clin Orthop Relat Res*. v.1, n.396, p.206-214, 2002.
- MANJUBALA, I.; SIVAKUMAR, M.; SURESHKUMAR, R.V.; et al. Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. *J Biomed Mater Res*. v.63, n.2, p.200-208, 2002.
- MATSUSUE, Y.; HANAFUSA, S.; YAMAMURO, T.; et al. Tissue reaction of biodegradable ultra high strenght poly(L-lactide) rod. A long-term study in rabbits. *Clin Orthop Relat Res*. v.317, p.246-253, 1995.
- MURPHEY, M.D.; SCHWAPPACH, J.R.; SARTORIS, D.J. Imaging methods assess success of bone grafts. *Diagn Imaging (Sant Franc)*. v.14, n.4, p.94-99, 1992.
- MYGIND, T.; STIEHLER, M.; BAATRUP, A.; et al. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*. v.28, n.6, p.1036-1047, 2007.

- NASCIMENTO, J. F. Estudo da processabilidade e da caracterização do poli(ácido 3-hidroxibutírico)- PHB obtido a partir da cana-de-açúcar. Campinas, 2001. 58p. Tese (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas.
- NIIMI, R.; HASEGAWA, M.; SUDO, A.; et al. A large metallic cyst caused by wear particles after total knee arthroplasty. *Arch Orthop Trauma Surg.* v.127, n.1, p.51-54, 2007.
- OCARINO, N.M.; MARUBAYASHI, U.; CARDOSO, T.G.; et al. Physical activity in osteopenia treatment improved the mass of bones directly and indirectly submitted to mechanical impact. *J Musculoskeletal Neuronal Interac.* v.7, n.1, p.84-93, 2007.
- OCARINO, N.M.; SERAKIDES, R. Efeito da atividade física no osso normal e na prevenção e tratamento da osteoporose. *Rev Bras Med Esporte.* v.12, n.3, p.164-168, 2006.
- OGUCHI, H.; ISHIKAWA, K.; MIZOUE, K.; et al. Long-term Histological evaluation of hydroxiapatite ceramic en humans. *Biomaterials.* v.16, n.1, p.33-38, 1995.
- OLIVEIRA, P.M. Desenvolvimento e Caracterização de Biocompósito de Matriz Polimérica de PHB Reforçada com HAP-91[®]. 2005. 148p. Tese (Mestrado em Engenharia de Materiais)-Rede Temática em Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG.
- ORÉFICE, R.L. Materiais Poliméricos – Ciência e aplicações como biomateriais. In: ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. (Ed) *Biomateriais Fundamentos e Aplicações.* 1ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2006. p.83- 156.
- PEREIRA, M.M.; VASCONCELOS, W.L.; ZAVAGLIA, C.A.C. Materiais cerâmicos – Ciência e aplicações como biomateriais. In: ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. (Ed) *Biomateriais Fundamentos e Aplicações.* 1ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2006. p.39- 58.
- PERREN, S.M. Evolution of the internal fixation of long bone fractures. *J Bone Joint Surg Br* v.84, n.8, p.1093-1110, 2002.
- PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L.; DECAMP, C.E. *Handbook of small animal orthopedics and fracture repair.* 4ed. St. Louis:Saunders, 2006. 832p.
- PIERMATTEI, D.L.; JOHNSON, K.A. *Atlas of surgical approaches to the bones and joints of the dog and cat.* 4.ed. Philadelphia:Saunders, 2004. 400p.
- QUINN, P.J. MARKEY, B.K.; CARTER, ME.; et al. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.* Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.
- RADASCH, R.M. Biomechanics of bone and fractures. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* v.29, n.5, p.1045-1082, 1999.
- RAHN, B.A. Bone healing: Histologic and physiologic concepts. In: Sumner-Smith, G: *Bone in clinical orrtopedics,* 2.ed, Stuttgart:Thieme, 2002, p.287-325.
- REZENDE, C.M.F. Teste *in vivo* de Biomateriais e Histotécnicas. In: ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. (Ed) *Biomateriais Fundamentos e Aplicações.* 1ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 2006. p.299- 314.
- REZWAN, W.; CHEN, Q.Z.; BLAKER, J.J; et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* v.27, n.18, p.3413-3431, 2006.

- ROE, S. Internal fracture fixation. In: SLATTER, S. Textbook of *small animal surgery*. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 2003. p.1798-1818.
- SÁ, M.J.C. REZENDE, C.M.F.; SILVA JUNIOR, V.A.G. et al. In vivo behavior of zirconia-hydroxyapatite (ZH) ceramic implants in dogs: clinical, radiographic, and histological study. *J Biomaert Appi*. v.22, n.1, p.5-31, 2007.
- SAIKKU-BÄCKSTRÖM, A.; RÄIHÄ, J.E.; VÄLIMAA, T.; et al. Repair of radial fractures in toy breed dogs with self-reinforced biodegradable bone plates, metal screws, and light-weight external coaptation. *Vet Sug.*, v.34, n.1, p.11-17, 2005.
- SAKATA, M.M; RINCON, M.C.A.; DUEK, E.A.R. Estudo da interação polímero /cartilagem/osso utilizando poli(ácido láctico co-co-ácido glicólico) e poli(P-dioxanona) em cômulo de fêmur de coelho. *Polímeros*. v.14, n.13, p.176-180, 2004.
- SHISHATSKAYA, E.I.; KHULUSOV, I.A.; VOLOVA, T.G. A hybrid PHB-hydroxyapatite composite for biomedical application: production, in vitro and in vivo investigation. *J Biomater Sci Polymer Edn*. v.17, n.5, p.481-498, 2006.
- SKERRY, T.M. The response of bone to mechanical loading and disuse: fundamental principles and influences on osteoblast/osteocyte homeostasis. *Arch Biochem Biophys*. v.473, n.2, p.117-123, 2008.
- SOD, G.A.; HUBERT, J.D.; MARTIN, G.S.; et al. An in vitro biomechanical comparison between prototype tapered shaft cortical bone screw and AO cortical bone screws for an equine metacarpal dynamic compression plate fixation of osteotomized equine third metacarpal bones. *Vet Surg*. v.35, n.7, p.634-642, 2006.
- SOD, G.A.; HUBERT, J.D.; MARTIN, G.S.; et al. An in vitro biomechanical comparison of a limited-contact dynamic compression plate fixation with a dynamic compression plate fixation of osteotomized equine third metacarpal bones. *Vet Surg*. v.34, n.6, p.579-586, 2005.
- STIFFLER, K.S. Internal fracture fixation. *Clin Tech Small Anim Pract*. v.19, n.3, p.105-113, 2004.
- SUKHIANI, H.R.; HOLMBERG, D.L. *Ex vivo* biomechanical comparison of pin fixation techniques for canine distal femoral physeal fractures. *Vet Sug*. v.26, n.5, p.398-407, 1997.
- THOMPSON, K. Bone and joints. In: MAXIE, M.G. (Ed) *Pathology of domestic animals*. 5ed. London:Saunders. 2007. p.2-23.
- UHTHOFF, H.K.; POITRAS, P.; BACKMAN, D.S. Internal fixation of fractures: short history and recent developments. *J Orthop Sci*. v.11, n.2, p.118-126, 2006.
- VAINIONPÄÄ, S.; VIHTONEN, K.; MERO, M.; et al. Biodegradable fixation of rabbit osteotomies. *Acta Orthop Scand*. v.67, n.3, p.237-239, 1986.
- VALLET-REGI, M. Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Trans*. v.28, n.44, p.5211-5220, 2006.
- VAN FRANK HAASNOOT, E.; MÜNCH, T.W.H.; MATTER, P.; et al. Radiological sequences of healing in internal plates and splints of different contact surface to bone (DCP, LC-DCP and PC-Fix). *Injury*. v.26, n.2 p.28-36, 1995.
- WANG, M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*. v.24, n.13, p.2133-2151, 2003.

WATSON, J.T. Overview of Biologics, *J Orthop Trauma*. v.19, n.10, p.14-16, 2005.

ZHAO, K.; DENG, Y.;CHEN, J.C.; et al. Polyhydroxialkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical proprieties and biocompatibility. *Biomaterials*. v.24, n.6, p.1041-1045, 2002.