

JESSICA ALEJANDRA CASTRO VARÓN

**BIOCERÂMICA DE FOSFATO DE CÁLCIO
NANO-ESTRUTURADO MICRO-MACRO POROSA EM
GRÂNULOS DE ABSORÇÃO RÁPIDA NO PREENCHIMENTO
DE DEFEITO CRÍTICO EM RÁDIO DE COELHOS
(*Oryctolagus cuniculus*).**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

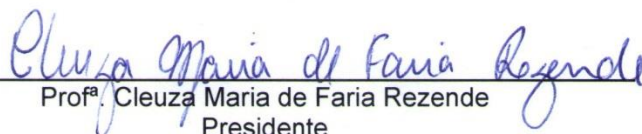
Orientadora: Prof^a Cleuza Maria de Faria Rezende

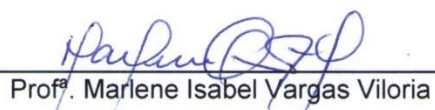
Belo Horizonte, MG

Escola de Veterinária-UFMG

2013

Dissertação defendida e aprovada em 25 de janeiro de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof.^a Cleuza Maria de Faria Rezende
Presidente


Prof.^a Marlene Isabel Vargas Vitoria


Prof.^a Eliane Gonçalves de Melo

Agradecimentos

A meus pais que tem me oferecido as ferramentas adequadas para meu crescimento ao longo da minha vida e ser a pessoa que sou hoje, seus ensinamentos e carinho. A meus pais e irmão Felipe, pelo apoio incondicional sempre presentes, mesmo distantes.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Cleuza, pela imensa paciência no meu aprendizado desde o momento em que cheguei no Brasil, pelos ensinamentos e orientação em todo momento fortalecendo meu crescimento profissional.

Ao laboratório Einco pelo fornecimento do material de análise e material cirúrgico utilizado no estudo.

Ao laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Especialmente à professora Marlene Isabel Vargas Vitoria pela ajuda e orientação.

Ao Professor Mario Jefferson Quirino Louzada do laboratório de Biofísica da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba / UNESP, pela ajuda nas avaliações densitométricas.

Ao Professor Walter Motta pela disponibilização do espaço no Laboratório de Metabolismo animal.

À ótima equipe anestésica e cirúrgica que formamos ao longo do trabalho, e amizade em momentos de descontração, Isabel, Fabiola, Endrigo, Omar, Felipe, Bruno e Mariana sem eles teria sido impossível o sucesso no experimento.

A todo o pessoal da Escola de Veterinária e do Hospital da UFMG, por toda a ajuda, colaboração e apoio nestes três no Brasil.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS.....	5
RESUMO.....	10
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Tecidos ósseo.....	15
2.2 Enxertos ósseos	20
2.3 Estudo radiográfico.....	24
2.4Densitometria óssea	24
2.5Avaliação histológica	24
3. OBJETIVOS	25
3.1Objetivo geral.....	25
3.2Objetivos específicos	25
4. HIPÓTESES	25
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1 Implantações da biocerâmica micro macro porosa em grânulos de absorção rápida.....	26
5.2 Avaliação radiográfica	29
5.3 Avaliação de Densitometria Óssea	30
5.4Avaliação histológica	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ilustração esquemática da consolidação óssea secundária. (a) formação do hematoma no local da fratura. (b) substituição do hematoma pelo calo ósseo. (c) processo de remodelação óssea. (Fonte: Denny e Butterworth, 2000)..... 19
- Figura 2. Representação gráfica da ossificação intramembranosa. (Fonte: Human Anatomy e Physiology 7th. Edition) 19
- Figura 3. Fotografia das etapas de confecção do defeito crítico em rádio de coelhos e preenchimento com biocerâmica nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida. A) Exposição do rádio e mensuração da extensão osso. B) Osteotomia com uma serra pneumática. C) Falha óssea. D) Miniplaca fixada ao osso. E) Biocerâmica no defeito ósseo. F) Fechamento da ferida cirúrgica..... 28
- Figura 4. Densitometro ósseo de dupla emissão de raios X (DXA) 31
- Figura 5. A) Fotografia da bandeja com graticula empregada no posicionamento dos ossos na mesa do densitometro ósseo; B) fotografia dos ossos posicionados sobre a graticula para serem escaneados no densitometro ósseo..... 31
- Figura 6. Fotografias da tela do computador durante o processamento das análises densitométricas. A) Software empregado para a análise densitométrica. B) Fotografia com os dados obtidos depois das análises feitas pelo software. C) Imagem da densitometria: a área delimitada (quadro vermelho) no osso representa a área do defeito crítico com o preenchimento com biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturado micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida e ou autoenxerto..... 32
- Figura 7. Imagem radiográfica de defeito crítico em rádio de coelho aos zero (A) e oito (B) dias, mostrando defeito cortical preenchido com biocerâmica nano-

- estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida. Observa-se aumento da radiopacidade da biocerâmica (B)..... 35
- Figura 8. Imagem radiográfica médio-lateral, de rádio de coelhos aos zero (A), oito (B) e quinze dias (C), mostrando defeito crítico preenchido com biocerâmica nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida e autoenxerto em defeito crítico em rádio de coelho aos zero (D), oito (E) e quinze dias (F). Note-se o aumento da linha de osteotomia (quadro vermelho) (8C) e aumento da reação periostial caudal no segmento distal (chave vermelha) (8F)..... 36
- Figura 9. Imagem radiográfica, médio-lateral de rádio de coelho aos quinze e trinta dias mostrando defeito crítico preenchido com biocerâmica nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida (A, B) e autoenxerto (C, D). B) Observa-se formação de calo ósseo (setas vermelhas) no defeito com biocerâmica; D) Observa-se radiopacidade no canal medular (círculo vermelho) no defeito preenchido com autoenxerto..... 37
- Figura 10. Imagem radiográfica médio-lateral, de rádio de coelhos aos trinta e quarenta e cinco dias mostrando defeito crítico preenchido com biocerâmica nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida (A e B) e autoenxerto (C e D). Observa se continuidade cortical caudal (chave vermelha) nos dois grupos..... 38
- Figura 11. Imagem radiográfica médio-lateral, de rádio de coelho aos quarenta e cinco e sessenta, mostrando defeito crítico preenchido com biocerâmica nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida (A e B) e autoenxerto (C e D). Nota-se continuidade cortical com superfície regular do calo ósseo (linha vermelha) e persistência da linha de osteotomia parcial, pouco definida na cortical cranial (seta verde)..... 39
- Figura 12. Imagem radiográfica médio-lateral de rádio de coelho aos noventa e cento e vinte mostrando defeito crítico preenchido com biocerâmica nano estruturada micro macro porosa em grânulos de absorção rápida (A e B) e

- autoenxerto (C e D). Radiopacidade aumentada no enxerto (linha vermelha) e autoenxerto com remodelação e radiopacidade menor ao osso receptor (quadrado amarelo)..... 40
- Figura 13. Fotomicrografia de defeito crítico em rádio de coelho aos oito dias da implantação de biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida (A, B) e autoenxerto (C, D). A) Tecido de granulação (círculo verde), espaço ocupado pelas partículas de biocerâmica (seta azul), osso receptor (estrela amarela), (HE; 4X). B) Tecido de granulação. Presença de hemácias (círculo preto) e tecido blástico se formando em torno do material (HE; 40X). C) Interface osso-autoenxerto: nota-se o tecido de granulação na região da linha de osteotomia (HE; 10X). D) Formação de vasos sanguíneos com presença de hemácias (quadrado amarelo), infiltrado inflamatório com presença de mononucleares e células blásticas (HE; 40X)..... 44
- Figura 14. Fotomicrografia de defeito crítico em rádio de coelho aos 15 dias da implantação de autoenxerto. A) Interface osso-autoenxerto, formação endocondral no rádio (setas azuis), (HE; 4X). B) Matriz cartilaginosa formada na ulna adjacente à linha de osteotomia do rádio, (HE; 10X)..... 45
- Figura 15. Fotomicrografia da interface osso-biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida em rádio de coelho após trinta dias. A) Tecido blástico com acentuada vascularização e células osteoblásticas em torno do material a partir do osso receptor (estrela amarela) (HE; 4X). B) Formação de matriz óssea a partir da ulna (triângulo azul) para a região do defeito preenchido com biocerâmica (espaço ocupado pelas partículas de biocerâmica, seta preta) (HE; 10X)..... 46
- Figura 16. Fotomicrografia do defeito crítico em rádio de coelho preenchido com biocerâmica após 45 dias. Tecido osteóide com acentuada neovascularização (círculos azuis) e formação de trabéculas em volta e no

interior dos grânulos da biocerâmica (estrela preta) e fibras colágenas (seta amarela) (HE; 4X)..... 47

Figura 17. Fotomicrografia de defeito crítico em rádio de coelho preenchido com biocerâmica nano-estruturada macro-micro porosa em grânulos de absorção rápida aos sessenta dias. A) Tecido conjuntivo fibroso com invasão de células sanguíneas e células osteoblásticas na biocerâmica, fibras colágenas (setas pretas) (tecido osteóide no espaço ocupado pelo biomaterial (circulo azul) (HE; 10 X). B) Vasos sanguíneos com presença de hemácias no vaso (circulo vermelho) neoformado no espaço ocupado pela biocerâmica. C) Tecido osteóide, grande numero de células osteoblásticas (circulo verde) no espaço ocupado pela biocerâmica (HE; 40X)..... 48

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar por meio de radiografia, histologia e densitometria óssea o efeito da HA/ β TCP em grânulos de absorção rápida em defeito ósseo crítico em rádio de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Foram utilizados 35 coelhos nos quais foi realizado um defeito crítico nos raios direito e esquerdo. Os animais foram divididos em GI, enxerto autólogo e GII HA/ β TCP em grânulos de absorção rápida. Avaliações radiográficas foram feitas antes da cirurgia, imediatamente após, aos oito, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias. Ao fim de cada período os animais foram submetidos a eutanásia por sobredose anestésica e os raios foram colhidos para avaliação de densitometria e histológica. Verificou-se diferença significativa entre o grupo tratado e o controle ao se comparar a densidade mineral óssea obtida ao longo do tempo de estudo. Verificou-se histologicamente, formação de uma rede vascular entre os poros da biocerâmica desde o primeiro tempo de avaliação (oito dias). Formação de tecido ósseo primário e trabéculas a partir do tecido ósseo preexistente, foram identificados a partir dos 30 dias após a implantação. Aos 60 dias, último tempo de avaliação histológica, observou-se presença de matriz óssea a partir dos segmentos ósseos preexistentes, caracterizando a formação óssea centrípeta. A biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida permite a invasão e multiplicação celular e propicia assim, a regeneração óssea, constituindo-se em um implante apropriado para preenchimento de falhas ósseas críticas.

Palavras chaves: biocerâmica, radio, defeito crítico, coelho.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate by radiography , histology and bone densitometry the effect of HA / β TCP granules for rapid absorption in critical bone defect in radio rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) . 35 rabbits were used in which a critical defect was performed on left and right radios . The animals were divided into GI , GII autograft and HA / β TCP granules for rapid absorption . Radiographic examinations were made before surgery, immediately after the eighth , 15, 30 , 45, 60 , 90 and 120 days. At the end of each period, the animals were euthanized by anesthetic overdose and radios were harvested for histological assessment and densitometry . There was a significant difference between the treated and control groups when comparing bone mineral density obtained over the entire study period . It was verified histologically formation of a vascular network of the pores of bioceramic from the first time rating (eight days). Formation of primary bone tissue and trabeculae from preexisting bone tissue , were identified from the 30 days after implantation . At 60 days , the last time histological evaluation , we observed the presence of bone matrix from preexisting bone segments , featuring the centripetal bone formation . The bioceramic calcium phosphate nano - structured micro - macro porous granules for rapid absorption allows cell proliferation and invasion and thus promotes bone regeneration , thus becoming a suitable implant for filling bone defects criticism .

Key words : bioceramic , radio , critical defect rabbit.

Biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturado micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida no preenchimento de defeito crítico em rádio de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

Introdução:

O reparo de fraturas, seja no homem ou no animal, pode apresentar desafios não encontrados no dia a dia como grandes defeitos ósseos decorrentes de trauma, perdas ósseas por remoção de tumores ou infecções, sendo necessário o uso de enxertos ósseos ou aloplásticos para preenchimento da falha. O enxerto aloplástico é um material utilizado para implantação nos tecidos ósseos, tais como fosfato de cálcio, hidroxiapatita, biocerâmicas, dentre outros. As características biológicas de cada um destes enxertos são variadas e podem propiciar um ou mais componentes essenciais como osteogênese, osteoindução e osteocondução. A substituição óssea pode ser feita por enxerto autólogo ou autoenxerto, enxerto alógeno ou homoenxerto, xenoenxerto ou heterólogo e por implante de material aloplástico (Garrido e Sampaio, 2010).

O osso autólogo é considerado a melhor opção por suas propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras, além de não causar reação imunológica ou transmissão de doenças.

Pode ser obtido do osso esponjoso, cortical ou córtico-esponjoso (Goldberg e Akhavan, 2005), mas tem disponibilidade limitada (Volkmer, 2006).

O uso do autoenxerto é limitado por ter fonte esgotável e causar sequelas no sítio doador como, dor (alteração de sensibilidade) e cicatrizes (Ahlmann et al., 2002; Zabeu e Mercadante, 2008). Alternativas para emprego dos enxertos biológicos seria então, o uso de biomateriais que favoreçam a reparação óssea (Volkmer, 2006).

O fator importante que distingue um biomaterial de qualquer outro material é a sua capacidade de permanecer em contato com os tecidos do organismo vivo sem provocar rejeição. É um material desenhado para tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo durante um período de tempo indeterminado podendo ser de origem sintética ou natural (Williams, 2008). Esses materiais devem ser, portanto, biocompatíveis. Segundo Williams (2008), a biocompatibilidade de um material ou matriz refere-se à habilidade de atuar como um suporte à atividade

celular. Como suporte inclui os sistemas de sinalizações molecular e mecânica que otimizam a regeneração dos tecidos sem provocar nenhuma resposta indesejável sistêmica ou local no hospedeiro, para o qual foram projetados.

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

Os biomateriais para enxerto ósseo são classificados como osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores. Os osteogênicos são capazes de estimular a formação de osso diretamente a partir de células precursoras. Os osteoindutores induzem a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas, aumentando a formação óssea local, ou mesmo estimulando a formação de osso em um sítio heterotópico (Urist, 1980; Aristizabal et al., 2008; Fardin et al., 2010). Os osteocondutores, geralmente inorgânicos, permitem a aposição de tecido novo na sua superfície, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras (Olsson et al., 2008). Na osteocondução tem-se a adesão, migração,

distribuição e infiltração de células osteogênicas, assim como de vasos sanguíneos no biomaterial (Helm et al., 2001).

A biocerâmica fosfofocálcica bifásica micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida HA/ β TCP, (Osteosynt) é um produto com características e propriedades físico-químicas semelhantes à matriz mineral do tecido ósseo. É composta principalmente de substâncias fosfofocálcicas mais estáveis, com arquitetura porosa intercomunicante e é substituída naturalmente pelo organismo no processo de reposição óssea continuada. Esta biocerâmica é usada como arcabouço para reconstrução e/ou formação de novo tecido ósseo, permitindo os eventos naturais do processo de reparação a partir das estruturas e substâncias orgânicas do próprio indivíduo (Pataro, 2005). Segundo o mesmo autor, quando usada para reconstrução óssea o material deve apresentar granulometria variável entre 10 e 200 *mesh*. Partículas maiores podem levar a reações de corpo estranho e, acima de 200 *mesh* pode ser rapidamente fagocitado por processo inflamatório agudo que pode ser exacerbado.

Segundo Garrido et al. (2011), a estrutura físico-química do biomaterial é um fator importante no processo de reparação óssea, a HA/ β TCP em grânulos de absorção

rápida, formada de fosfatos de cálcio, com porosidade apropriada, apresenta uma granulometria variada e não tem alteração das características físico-químicas quando implantada no organismo até ocorrer a formação óssea desejável e necessária, atuando, portanto, como arcabouço para o crescimento celular.

Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito da HA/ β TCP em grânulos de absorção rápida em defeito crítico do rádio de coelho por meio de avaliações clínica, radiológica, densitométrica e histopatológica.

O coelho é usado frequentemente como modelo experimental em diferentes tipos de pesquisa, principalmente para estudo da consolidação de fraturas. É um animal dócil, de fácil manejo e o custo da pesquisa é menor (An et al., 1999). Ao longo do tempo tem-se adaptado a espécie animal ao jejum pre-cirúrgico, eliminando-o (Lipman et al., 2008) ou reduzindo-o. Mason (1997), Harcourt-Brown (2002), Rich (2002), Lipman et al. (2008) consideram benéfico o jejum alimentar de 1-12 horas, o que evita o alimento na boca no momento da intubação, reduz o volume gástrico e facilita assim, a respiração durante a anestesia. A intubação endotraqueal também não é prática rotineira nesta espécie. É difícil de se realizar devido à anatomia de animal,

causando muitas vezes, laringoespasmos e danos iatrogênicos à laringe e/ou faringe (Richardson, 2000; Harcourt-Brown, 2002; Percy e Barthold, 2007). A técnica de intubação orotraqueal as cegas requer prática e cuidados (Mason, 1997) para evitar lesões iatrogênicas.

Literatura consultada

Em pesquisa, o coelho oferece vantagens quando comparado com outras espécies animais. Segundo Norris et al. (2001), sua anatomia e fisiologia ósseas apresentam semelhanças com as dos seres humanos, sugerindo desta forma, a possibilidade de extrapolação de resultados. Contudo, devido ao metabolismo da espécie, verifica-se um tempo mais curto de consolidação óssea, quando comparado com outras espécies animais (An et al. 1999; Richardson 2002; Hankenson et al. 2003), o que não interfere na extrapolação de resultados e facilita a realização dos estudos em termos de custo e disponibilidade de espaço.

Tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo duro, especializado e que possui importantes funções estruturais e metabólicas (Doblare et

al. 2004). Possibilita a ação mecânica da musculatura, protege órgãos vitais e contém a medula óssea hematopoiética. É uma reserva de cálcio, fosforo e outros íons, possui pequenos espaços formando canais onde circulam os vasos sanguíneos e ocorre o intercâmbio de nutrientes (Roach, 2000).

O osso cortical ou compacto constitui a maior parte da diáfise dos ossos longos e de todos os ossos do organismo, oferece proteção e suporte. A cortical possui uma estrutura de anéis ou lâminas ao redor de canais centrais denominados canais de *Havers*, os quais se estendem longitudinalmente. Estes canais encontram-se interconectados com os canais de *Volkman*, através dos quais passam os vasos sanguíneos, linfáticos e nervos que se localizam ao longo do tecido ósseo (Molina, 2008).

Entre os anéis concêntricos da matriz mineralizada existem pequenas lacunas de forma elíptica onde se localizam os osteócitos. Cada uma destas lacunas contém uma série de canalículos por onde se estendem os osteócitos, conectando-se entre si e eventualmente com os canais de *Havers* para o intercâmbio de nutrientes do líquido intersticial (Molina, 2008). Quando a estrutura microscópica destas lâminas é madura, o conjunto do canal central, as lâminas concêntricas e as lacunas,

canalículos e osteócitos recebem o nome de osteon secundário ou sistema de Havers. As demais lâminas entre os osteons são denominadas lâminas intersticiais, e as que estão em contato com o perióstio e endóstio, lâminas circunferenciais (Hollinger et al., 1999).

O *osso esponjoso* não possui osteons, mas as lâminas intersticiais são superpostas, não concêntricas, formando tabiques ou placas chamadas trabéculas. Estas trabéculas formam uma estrutura esponjosa na qual se encontra a medula óssea vermelha. Assim os vasos sanguíneos penetram diretamente no osso esponjoso e permite o intercâmbio de nutrientes com os osteócitos. O osso esponjoso é o principal componente das epífises dos ossos longos e do interior da maior parte dos ossos curtos e planos (Molina, 2008).

Perióstio e endóstio: O perióstio reveste a superfície externa de todos os ossos exceto as superfícies articulares. É um tecido especializado, organizado em um revestimento interno rico em células osteoblásticas e preosteoblásticas, e o externo, rico em fibras colágenas e em vasos sanguíneos que penetram nos canalículos intraósseos (Molina, 2008). Allen e Hock (2004), Shapiro (2008) e Dwek (2010) chamam a atenção para a importância do

papel do periósteo na reparação óssea, já que a camada do periósteo é composta de células progenitoras mesenquimais diferenciadas, células progenitoras osteogênicas, osteoblastos e fibroblastos em uma matriz colagenosa. O endósteo é uma fina camada de tecido conjuntivo que reveste a cavidade medular dos ossos longos, os condutos de Volkmann e de Havers do osso compacto e os espaços medulares do osso esponjoso. As células mesenquimais indiferenciadas no seu interior, tem potencial osteogênico e hematopoiético (Soleri, 1995; Bostrom, 2000; Roch, 2000).

O osso apresenta elevado potencial de reparação através de um processo dinâmico de remodelação que envolve a formação de tecido novo e a reabsorção óssea, caracterizando a total ausência de cicatriz. Nos estudos de regeneração óssea se distinguem dois tipos de defeitos, os que carecem de capacidade de regeneração espontânea, isto é, não ocorre o reparo do tecido ósseo sem a utilização de enxerto formando-se um tecido fibroso, denominado defeito crítico; e os que são capazes de regenerar sem a utilização de enxertos ou implantes, denominados de tamanho não crítico (Ochandiano, 2007; Serra e Silva et al., 2006).

No momento da lesão óssea inicial (fratura, osteotomia cirúrgica) ocorre ruptura dos vasos sanguíneos junto com liberação de líquido e proteínas plasmáticas (edema) e a formação imediata de um coágulo de fibrina após a cascata de coagulação e vasoconstricção. No coágulo inicial, os produtos de degradação resultantes da necrose das bordas da fratura e os fatores de crescimento, atraem células polimorfonucleares (PMNs neutrófilos), linfócitos e monócitos (que se transformam em macrófagos, os quais podem permanecer vários meses na zona de regeneração), que iniciam a fagocitose dos produtos de necrose (Glowacki, 1998; Hollinger, 1999; Molina, 2008). Após três a cinco dias do trauma inicial, a rede de fibrina vai desaparecendo e forma-se um tecido de granulação que permanece aproximadamente por 15 dias. Ocorre vascularização, vários tipos de colágeno formam uma nova rede e surgem outras células como fibroblastos, linfócitos, monócitos e macrófagos, aumentando também a proporção de células mesenquimais indiferenciadas (Glowacki, 1998; Hollinger, 1999).

Os fatores de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador (TGF) liberados na fase inicial da inflamação induzem a expressão de outros fatores como o fator de

crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que promoverão a angiogênese pela migração e proliferação de células endoteliais e seus precursores. Durante a segunda semana ocorre uma maior densidade de fibras colágenas (Glowacki, 1998; Hollinger, 1999). Adriens (1999) mostrou que a partir das 48 horas após a lesão, ocorrem hemólise central do coágulo sanguíneo e início da formação do tecido de granulação (migração de polimorfonucleares neutrófilos, monócitos e fibroblastos para o foco). Ao final da primeira semana, já existe um tecido com plexo vascular organizado, fibroblastos e fibras colágenas. Esse tecido de granulação se mantém até aproximadamente 14 dias. As plaquetas desaparecem como fonte principal dos fatores de crescimento e outros fatores, como o fator de crescimento fibroblástico e o fator de crescimento endotelial vascular promoverão a angiogênese (migração e proliferação de células endoteliais e seus precursores) (Glowacki, 1998; Hollinger, 1999, Molina, 2008).

A proporção das células mesenquimais indiferenciadas presentes nos canais ósseos, endóstio, perióstio e medula óssea é variável ao longo da vida. Estas células podem chegar ao foco da fratura a partir do perióstio, da medula óssea e do sangue. O ciclo celular de qualquer célula

progenitora segue cinco etapas de comportamento (Borges, 1998; Muschler e Midura, 2002; Molina, 2008):

- *Ativação:* Saída do estado quiescente das células mesenquimais indiferenciadas pela ação dos fatores reguladores.

- *Proliferação:* originada por fatores mitogênicos.

- *Migração:* facilitada por diferentes fatores reguladores e influenciada por fatores biomecânicos e geométricos da matriz extracelular.

- *Diferenciação:* progressão na linhagem em que aparecem as diferenças morfológicas e moleculares específicas da linhagem, terminando na diferenciação celular que uma vez formado o tecido, indica a maturação dessas células. Entre as variáveis biológicas que vão determinar a linhagem celular das células mesenquimais indiferenciadas encontram-se a tensão de oxigênio, o pH do fluido intersticial, a concentração de nutrientes, os estímulos mecânicos, a composição química da matriz extracelular e a concentração de determinados fatores reguladores.

O osso inicialmente formado após uma fratura ou osteotomia é um tecido osteóide e posteriormente, o osso imaturo entrelaçado ou reticular, forma o calo, cuja função é estabilizar os fragmentos da fratura, sendo que se há mobilidade entre fragmentos a cartilagem será predominante no osso neoformado. Existem dois tipos de formação óssea (Hollinger et al., 1999; Bostrom, 2000; Doblare et al. 2004): a endocondral e intramembranosa.

Formação endocondral (Fig. 1.): acontece nos ossos das extremidades, vértebras e na região pélvica. As células mesenquimais se diferenciam em condrócitos devido a uma diminuição do aporte vascular. Posteriormente esta cartilagem é invadida por novos vasos e as células mesenquimais indiferenciadas se diferenciam diretamente em osteoblastos e a cartilagem é reabsorvida e substituída por osso.

Marx (1999) observou em estudos experimentais de regeneração em defeitos maxilofaciais preenchidos com autoenxertos ósseos, que o ambiente produzido é de diminuição do pH (4-6) e da tensão de oxigênio (5-10 mm Hg) decorrente da

redução do aporte vascular que atrai macrófagos e polimorfonucleares ao foco devido ao gradiente de tensão em relação ao osso adjacente (45-50 mm Hg). Mas esta diminuição de pH favorece também a diferenciação das células mesenquimais em células condroblásticas (Gotcher, 1998).

Ossificação intramembranosa (Fig. 2): Esse tipo de ossificação normalmente ocorre quando existe estabilidade da fixação (Mattioli-Belmonte et al., 1997). É observada nos ossos do crânio, ílio, escápula e em ossos maxilares. A ossificação se produz diretamente a partir das células mesenquimais indiferenciadas e o tecido conectivo estromal, sem necessidade da fase intermediária de cartilagem. Produz uma concentração de células mesenquimais indiferenciadas que se concentram ao redor de uma rede de capilares profusa. A diferenciação em osteoblastos e a produção de certas proteínas originam deposição de cristais de hidroxiapatita nas vesículas da matriz, seguindo-se a orientação das fibras de colágeno. Inicialmente forma-se um labirinto de osso entrelaçado que evolui para o sistema lamelar maduro (Garces, 1999).

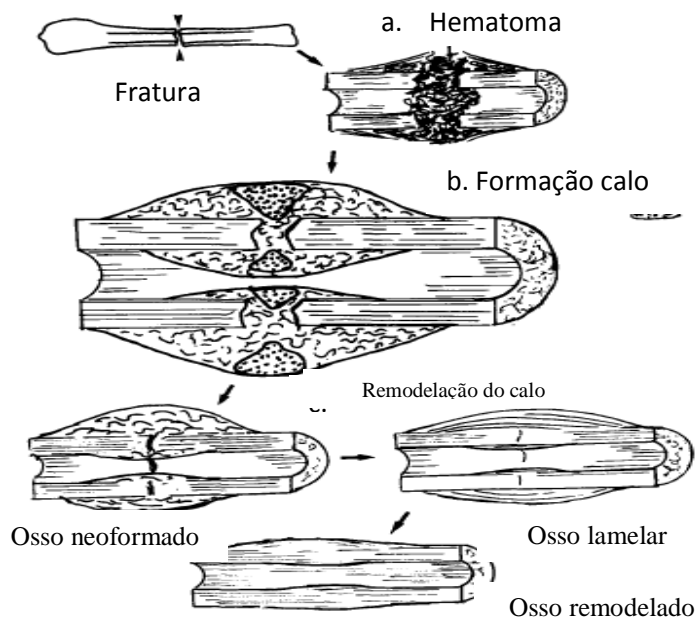


Figura 1. Ilustração esquemática da consolidação óssea secundária. (a) formação do hematoma no local da fratura. (b) substituição do hematoma pelo calo ósseo. (c) processo de remodelação óssea. (Fonte: Denny e Butterworth, 2000).

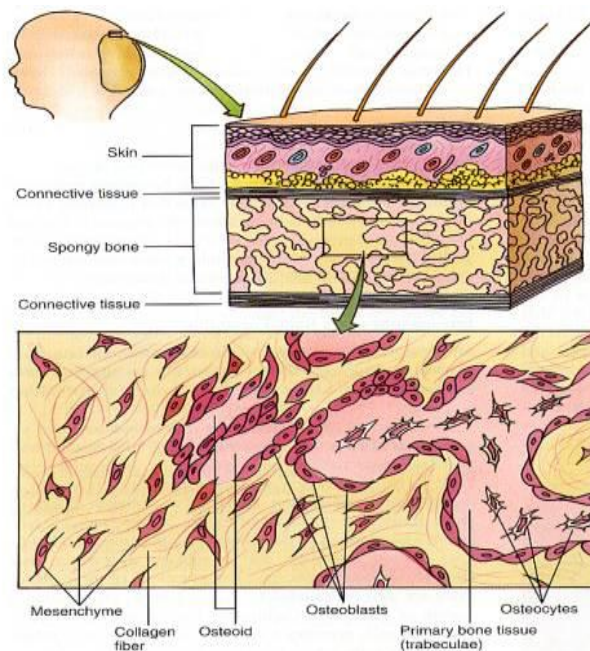


Figura 2. Representação gráfica da ossificação intramembranosa. (Fonte: Human Anatomy e Physiology 7th. Edition)

Enxertos Ósseos

O primeiro indício do emprego de enxertos para a reconstrução de defeitos ósseos data de 1668, quando Van Meekren transplantou osso heterólogo de um cão para o homem para restaurar um defeito no crânio. Já em 1809, Merrem realizou com êxito o primeiro transplante de enxerto autólogo ósseo. Em 1891, Bardenheuer foi o primeiro a realizar um enxerto de osso autólogo na mandíbula. Em 1908, Payr descreveu o uso de transplantes de tíbia e de costela. Em 1938, Orell produziu enxerto de osso bovino por meio do uso de Álcalis e, em 1942, Wilson criou um banco de ossos usando técnicas de congelamento (Molina, 2008).

O enxerto autógeno é o osso obtido do próprio receptor e é considerado o padrão ouro nas reconstruções ósseas, já que apresentam as propriedades de osteoindução (proteínas não colagênicas da matriz óssea, incluindo fatores de crescimento), osteogênese (células osteoblásticas derivadas da medula óssea e células osteoblásticas precursoras), e osteocondução (mineral ósseo e colágeno). Porém sua principal desvantagem é a necessidade de um sítio doador, aumentando a morbidade do procedimento. Pode ser obtido do osso esponjoso, cortical ou córtico-esponjoso

(Goldberg e Akhavan, 2005), mas tem disponibilidade limitada por ser fonte esgotável e causar sequelas no sítio doador como, alteração de sensibilidade e cicatrizes (Ahlmann et al., 2002; Zabeu e Mercadante, 2008).

Para superar esses problemas, alternativas biológicas, principalmente homoenxertos e xenoenxertos têm sido utilizados, mas a limitação da pronta disponibilidade, o alto custo, a transmissão de doenças e problemas de imunogenicidade são os fatores limitantes desta alternativa. Os enxertos alógenos são tecidos enxertados entre indivíduos da mesma espécie com genes não idênticos, como o osso fresco, ou conservado em banco de ossos (Ahlmann et al., 2002).

Estes enxertos são tratados por congelamento-secagem, autoclave, preservação química ou irradiação para eliminar ou reduzir a atividade celular.

As limitações do emprego do enxerto biológico têm impulsionado as pesquisas com biomateriais capazes de favorecer o crescimento ósseo por condução e, se possível, por indução (Ahlmann et al., 2002; Fossum, 2002).

Os enxertos ou implantes de materiais aloplásticos são a alternativa para o tratamento de grandes perdas ósseas. Um

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

As características, dependentes das propriedades físicas e químicas do material, devem ser compatíveis com a fisiologia óssea (Aristizabal et al., 2008). O biomaterial deve ser degradável, para não interferir nas propriedades mecânicas da formação de osso novo (Rumpel et al., 2006), e possuir poros de diâmetro entre 100 e 500 μm que sejam interconectados (Gil et al., 2003). A conexão entre os poros facilita a invasão de células e vasos sanguíneos. Entretanto, as desvantagens do material poroso é sua dificuldade de uniformidade dos poros e a susceptibilidade de desintegração e consequente perda de função (Aristizabal et al., 2008).

Dentre os biomateriais para reconstrução óssea encontram-se, os trifosfatos de cálcio na forma porosa do fosfato cálcico. A proporção de cálcio e fosfato são similares à do osso. É um material de preenchimento parcialmente reabsorvível que também permite sua substituição por osso novo. A hidroxiapatita, um componente mineral do osso, é comercializada em forma porosa e não porosa, e reabsorvível ou não,

segundo o processo de obtenção (Molina, 2008). Dentre estes biomateriais para reconstrução óssea, as biocerâmicas de fosfatos de cálcio, materiais obtidos por sintetização a temperaturas acima de 1000°C, ocupam posição de destaque não apenas por sua similaridade com o tecido ósseo, mas também por sua biocompatibilidade, segurança, previsibilidade, ilimitada disponibilidade, ausência de morbidade para o paciente, custo-benefício favorável e possibilidade por serem obtidas com propriedades distintas, podendo assim atender às necessidades de cada paciente (Legeros, 1988; Legeros, 2008).

Os biomateriais são inicialmente classificados dentre os grandes grupos representados pelos biomateriais cerâmicos, poliméricos, metálicos e compósitos.

Os cerâmicos podem ser subdivididos em biomateriais de fosfatos de cálcio, sulfatos de cálcio, carbonatos de cálcio e silicatos. Os de fosfatos de cálcio podem ainda ser subdivididos em hidroxiapatitas $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, beta-tricálcio fosfato (β -TCP) $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$, alfa-tricálcio fosfato (α -TCP), octacálcio fosfato, dentre outros, além dos biomateriais bifásicos de fosfatos de cálcio (BCP), que são uma mistura de HA e β -TCP (Legeros, 1988).

As cerâmicas são biomateriais empregados cujos poros devem permitir a invasão vascular e favorecer o crescimento e adesão celular (Safdar et al., 2005). As cerâmicas utilizadas como biomateriais são consideradas biocompatíveis, porém frágeis. Em alguns casos, são duras, com alta resistência à compressão, ao desgaste e pequeno coeficiente de atrito, o que é interessante para aplicação em articulações – principalmente no caso de próteses de quadril (Volkmer, 2006). Este baixo coeficiente de atrito está relacionado ao fato de que cerâmicas à base de óxidos são hidrofílicas e podem ser altamente polidas, o que permite suportar altos carregamentos, seja em contato consigo mesma ou com materiais poliméricos em meios fisiológicos (Ben-Nissan, 2003; Volkmer, 2006).

Em termos gerais, as biocerâmicas podem ser classificadas como bioinertes ou bioativas. O material bioinerte é aquele tolerado pelo organismo, com mínima formação de envoltório fibroso, não libera nenhum tipo de componente ou, o faz em quantidades mínimas não detectáveis. A quantidade de células fagocitárias na interface é mínima. A resposta fagocitária é passageira e uma fina cápsula se forma ao

redor do implante. Os materiais bioinertes mais utilizados são alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono (Volkmer, 2006).

O bioativo é aquele material no qual ocorrem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo (osteointegração), em função da similaridade entre estes materiais e o componente mineral ósseo. Assim o colágeno e a parte mineral do osso (matriz orgânica mineralizada) são depositados diretamente sobre as superfícies do implante, dando origem a uma ligação resistente à tração entre o material bioativo e o osso. Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio (Pilliar et al., 2001; Volkmer, 2006).

A biocerâmica fosfocálcica bifásica micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida (trifosfatos de cálcio e hidroxiapatita) HA/ β TCP (Osteosynt) é um produto com características e propriedades físico-químicas semelhantes à matriz mineral do tecido ósseo. É composta principalmente por substâncias fosfocálcicas mais estáveis, com arquitetura porosa intercomunicante e é substituída naturalmente pelo organismo no processo de reposição óssea continuada.

A estrutura mineral orgânica tem características arquitetônicas próprias com

micro e macro poros intercomunicantes com espaços necessários para a penetração e deposição de substâncias e estruturas orgânicas que caracterizam o tecido ósseo (Garrido et al., 2011).

A HA/ β TCP possui poros intercomunicantes, com limitações máximas de 400 μm e topografia de superfície rugosa que permite a deposição de células e substâncias orgânicas essenciais.

A HA/ β TCP possui micro poros com até 10 μm de diâmetro, e macro poros de até 400 μm que permitem a deposição das células e a condução do processo por haptotaxia (movimentações das células na superfície do material). Esse processo favorece a formação óssea dentro dos poros e na superfície do material, resultando em uma ótima aderência devido à liberação de substância cimentante amorfa produzida pelo osteoblasto para dar estrutura e resistência mecânica ao sistema (Pataro, 2005).

As respostas orgânicas diferem de acordo com o material utilizado, o que significa que diferentes cerâmicas podem provocar respostas orgânicas diferenciadas. Essas respostas são diretamente relacionadas a estrutura físico-química e arquitetônica do material usado para reconstrução óssea. A HA/ β TCP granulada com peso específico de 1,2 g/cm^3 tem a concentração de fosfatos de

cálcio necessária para sua finalidade, com porosidade e resistência mecânica imprescindível. Permite sua mixagem com sangue e outras substâncias do paciente sem perdas de suas características. O número excessivo de poros ou o aumento do diâmetro além de 500 μm leva a perda da resistência mecânica, do volume de fosfatos de cálcio necessários e, evidentemente, à diminuição do peso específico (Pataro, 2005).

Cada grama do material granulado tem a capacidade de absorção de aproximadamente 0,7ml de substâncias ou, cada cm^3 tem a capacidade de absorção de mais ou menos 0,84 cm^3 de substâncias, como sangue medular e seus componentes, por exemplo (Biocerâmica, 2011).

A HA/ β TCP em grânulos de absorção rápida mostra ser um material promissor na reconstrução óssea com vantagens clínico-cirúrgicas que pode ser usada em diferentes áreas da medicina, odontologia e medicina veterinária, mostrando-se como alternativa viável para emprego em traumatologia, neurocirurgia, cirurgia geral, traumatologias buço-maxilo-facial, cirurgias plásticas reconstrutoras, cirurgias crânio faciais, oftalmologia para o tratamento de lesões e perdas ósseas, recomposições como perdas segmentares, afundamentos, pseudoartroses, processos infecciosos ósseos, osteomielites, osteólises, cistos e tumores, artrodeses,

inclusive vertebrais, osteotomias, reparações estéticas, entre outras (Biocerâmica, 2011).

Aspectos radiográficos

O exame radiográfico possibilita acompanhar a regeneração óssea por meio de avaliação da interface implante-osso e observação da diferença de densidade entre o osso novo, osso circunvizinho e implante. Observações em diferentes planos radiográficos são importantes para se avaliarem os enxertos ósseos ou implantes quando introduzidos em órgãos e tecidos (Manjubala et al., 2002).

Em estudos com implantes de fosfatos de cálcio bifásico na diáfise femoral de cão, Manjubala et al., (2002) relataram que um mês após cirurgia, haviam áreas de radiolucência ao redor do implante e áreas radiopacas indicando cicatrização óssea. Aos 60 dias foram observadas áreas de maior radiopacidade com características de osteointegração e aos 90, verificou-se completa integração osso-implante caracterizado pela radiopacidade nas margens da cerâmica.

A diminuição da radiopacidade é atribuída à invasão de tecido conjuntivo no local da lesão (Cullun et al., 1988). Bucholz et al., (1987) relataram que a utilização de

material cerâmico pode, eventualmente, prejudicar a interpretação radiográfica durante o processo de regeneração óssea. Os autores acreditam que esta dificuldade se deve à radiopacidade das cerâmicas, que impediria as avaliações mais precisas dos fenômenos ao redor dos implantes.

Densitometria

Nas medicinas humana e veterinária, diferentes técnicas têm sido utilizadas para a determinação da densidade mineral óssea. A densitometria é um parâmetro biofísico de grande importância experimental e clínica, podendo auxiliar o profissional da área da saúde a compreender e avaliar melhor o processo de mineralização óssea (Louzada et. al., 1997). Algumas doenças, tais como osteoporose, osteopenia e osteocondrose foram estudadas por meio da densitometria óssea em cães, coelhos, bovinos, cavalos, e seres humanos (Louzada et al, 1997; Kastl et al, 2002).

Avaliação histológica

Molist (2008) faz descrição do processo histológico como uma série de métodos e técnicas, empregados para poder estudar as características morfológicas dos tecidos. Existem diversos métodos para estudar os tecidos e diferentes técnicas que se empregam dependendo de quais são as características celulares e histológicas que se desejem avaliar.

Lobo et al., (2009) e Lobo e Arinze (2010) no tratamento de defeitos ósseos com biocerâmica de fosfato de cálcio observou aos 15 dias, tecido ósseo em volta e no interior dos grânulos de cerâmica, em regiões corticais e medulares. Aos 30 dias, as amostras apresentaram um padrão de tecido ósseo compacto mais organizado na região cortical. No canal medular, o tecido ósseo se manteve com o mesmo padrão de distribuição (na periferia e dentro dos grânulos). Aos 90 dias, observou-se mais tecido adiposo na região medular, mas, foi observado também tecido ósseo bem organizado ao redor e dentro dos grânulos inteiros da biocerâmica.

Objetivos:

Objetivo geral: estudar o emprego da biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa em

grânulos de absorção rápida no preenchimento de defeito ósseo crítico experimental em rádio de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

Objetivo específico:

Avaliar o efeito do implante óssea da HA/ β TCP em grânulos de absorção rápida em defeitos ósseos críticos experimentais, mediante avaliações clínicas, radiográficas, histológicas e por densitometria óssea.

Hipótese:

O emprego da HA/ β TCP nano-estruturada micro macro porosa em grânulos de absorção rápida favorece o reparo de defeito ósseo crítico experimental em rádio de coelhos.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, conforme protocolo N° 263/2011

Implantação da biocerâmica nano-estruturada micro macro porosa em grânulos de absorção rápida

Foram utilizados 35 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) adultos da raça Nova Zelândia brancos, com massa corporal média de 3,5 Kg, clinicamente saudáveis, adquiridos da fazenda experimental HÉLIO BARBOSA de Universidade Federal de Minas Gerais, localizada no município de Igarapé-MG.

Os animais foram mantidos por duas semanas em gaiolas individuais de arame galvanizado medindo 60x60x37 cm, no Laboratório de Metabolismo Animal do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG, em Belo Horizonte. Foram avaliados mediante o exame clínico e submetidos a avaliações radiográficas de controle. Após este período foram submetidos à cirurgia para osteotomia do rádio e implante da biocerâmica.

No pré-operatório, os coelhos receberam, pela via intravenosa, 30mg/Kg de cefalotina¹ como antibióticoterapia profilática e 0,2 mg/Kg meloxicam², via intramuscular, 30 minutos antes do procedimento, com repetição após duas horas de cirurgia. A medicação pré-anestésica foi realizada por meio de injeção intramuscular, na região glútea, de midazolam³ 2 mg/Kg e morfina⁴, 5 mg/Kg (Quesenberry e Carpenter, 2004). Logo após, foi feita a tricotomia ampla dos membros torácicos direito e esquerdo, desde a região da escápula até a articulação metacarpofalangeana.

Para a indução da anestesia, foi administrado propofol⁵, 15 mg/ Kg, via endovenosa. Para a manutenção anestésica foi utilizada anestesia inalatória com isoflurano⁶, na dose de manutenção de 1-3%, segundo a necessidade. Durante todo o período anestésico foram monitoradas as frequências cardíaca e respiratória. Fluidoterapia de apoio foi feita com solução de cloreto de sódio a 0,9%.

1. Ceflen®; Aspen PHARMA

2. Maxicam 0,2%, Ourofino, São Paulo

3. Dormium 15 mg/3 ml, União Química

4. Dimorf® 0,1 mg/ml, Cristália

5. Propovan®, Cristália

6. Isoforine, Cristália

Uma vez posicionados em decúbito esternal com os membros anteriores estendidos, foi realizada antissepsia simultânea de ambos os membros com solução de iodopolivinilpirrolidona (PVPI) degermante⁷, seguida por solução alcoólica de iodo⁸ a 2%, desde a articulação escapuloumeral até a articulação metacarpofalangeana, seguindo-se a colocação dos panos de campo. A abordagem ao rádio foi feita segundo preconizado por Piermattei & Johnson (2004). A ostectomia foi realizada com o emprego de uma serra pneumática sob irrigação constante com solução fisiológica estéril. Foram operados os rádios direito e esquerdo (70 membros), que constituíram os grupos experimentais, GI e GII. No grupo I (GI, membro direito) o defeito foi preenchido com a biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturado micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida com dimensão de 40-60 mesh, e no grupo II (GII, membro esquerdo), o defeito foi preenchido com enxerto autólogo constituindo o grupo controle positivo. Após a exposição do rádio, foi removido um fragmento ósseo de duas vezes o diâmetro do seu terço médio, cuja mensuração foi feita no momento da cirurgia, mediante o emprego de um paquímetro. No grupo controle positivo

(GII) o fragmento ósseo foi removido, sem periósteo, lavado com solução fisiológica e reintrodução para preenchimento do defeito. A ulna foi preservada. O defeito ósseo foi preenchido segundo o grupo experimental (Fig. 3). Para a fixação do rádio utilizou-se mini placas de 2,0 mm com seis furos, fixadas com dois parafusos de 2,0 mm de diâmetro, em cada fragmento. Os orifícios adjacentes à linha de ostectomia permaneceram vazios. Seguiu-se a sutura de cada um dos diferentes planos cirúrgicos (fáscia, subcutâneo e pele). A fáscia e o tecido subcutâneo foram aproximados com fios absorvíveis de ácido poliglicólico 5-0 em padrão contínuo simples. A dermorrafia foi realizada com pontos simples separados utilizando-se náilon monofilamentar 5-0. Em ambos os membros operados, foi feita uma bandagem de proteção com atadura cobam, por dois dias. Após as cirurgias, os animais foram mantidos em gaiolas individuais de 60x60x37 cm, no laboratório de metabolismo animal da Escola de Veterinária da UFMG. Realizaram-se avaliações clínicas diariamente durante os 10 primeiros dias, tempo no qual foram observados aumento de volume e temperatura local, estabilidade óssea e deambulação

7. Riodeine®, Rioquimicam

8. Álcool Iodado, Rioquímica

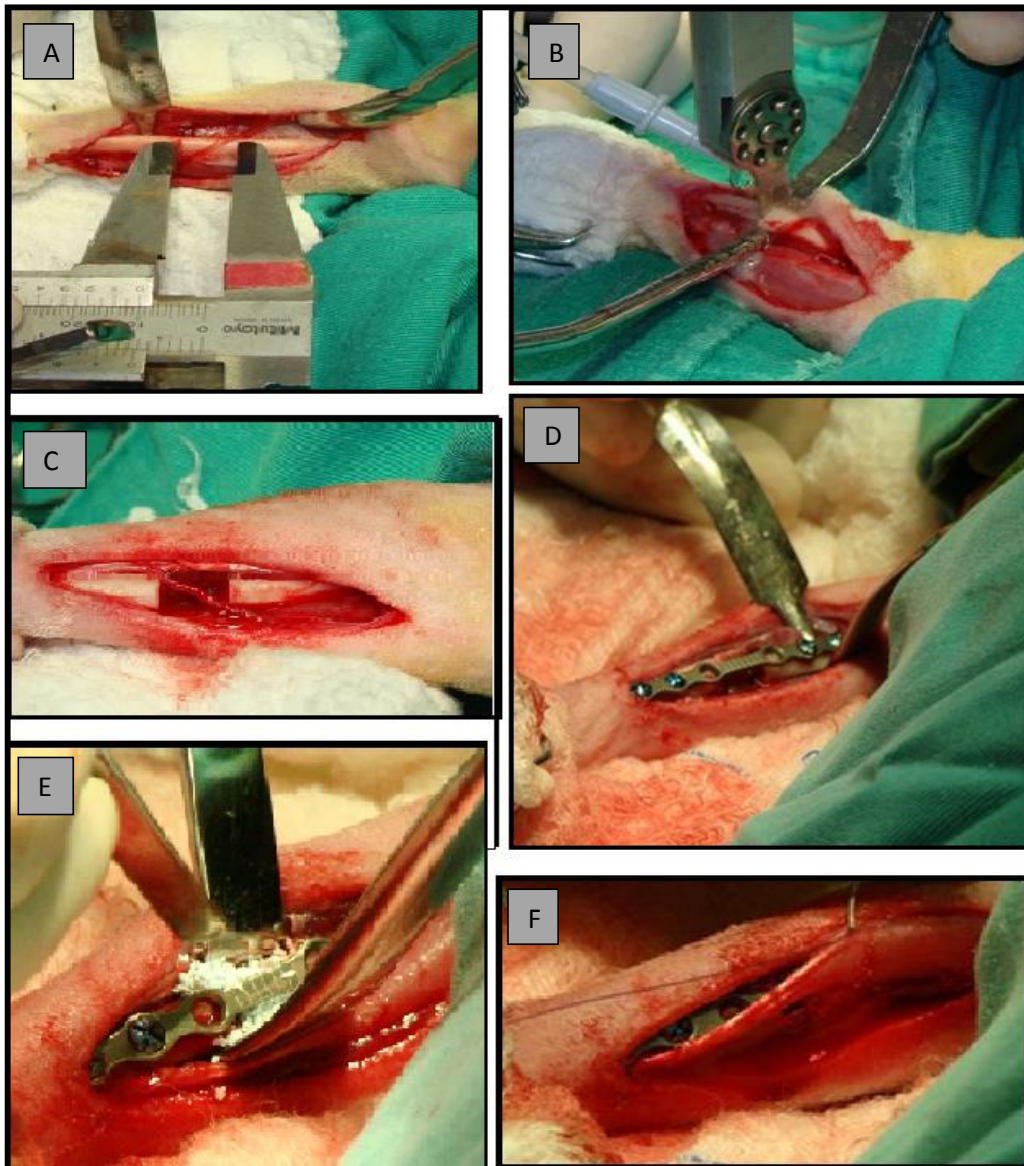


Figura 3. Fotografia das etapas de confecção do defeito crítico em rádio de coelhos e preenchimento com biocerâmica nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida. A) Exposição do rádio e mensuração da extensão do osso. B) Osteotomia com uma serra pneumática. C) Falha óssea. D) Miniplaca fixada ao osso. E) Biocerâmica no defeito ósseo. F) Fechamento da ferida cirúrgica.

Avaliação radiográfica

As avaliações radiográficas foram feitas em duplo cego com três avaliadores distintos que desconheciam o tempo de realização do exame e o grupo experimental. Ela foi feita para todos os animais em cada

um dos tempos até o sacrifício, tendo assim a seguinte distribuição e número de membros avaliados para cada um dos tempos em cada um dos grupos experimentais (GI, GII):

Tempos de Avaliação Radiográfica	Dias pós-cirúrgico	Número de membros avaliados em cada tempo
Tempo 1	8 dias	35 membros
Tempo 2	15 dias	30 membros
Tempo 3	30 dias	25 membros
Tempo 4	45 dias	20 membros
Tempo 5	60 dias	15 membros
Tempo 6	90 dias	10 membros
Tempo 7	120 dias	5 membros

Com auxílio de um escore, foi quantificada a evolução do processo de reparação óssea. Reação periosteal, formação de calo ósseo, formação de ponte óssea e remodelação óssea foram os parâmetros

semi-quantitativos usados para a avaliação. Cada avaliador recebeu duas tabelas, uma delas com o escore junto com as especificações de cada categoria (quadro 1).

Quadro 1. Escore de avaliação radiográfica empregado na avaliação da consolidação de defeito crítico em rádio de coelho preenchido com biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturada micro macro porosa em grânulos de absorção rápida e com autoenxerto.

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

Fonte: Yuehue e Friedman, 1999.

Densitometria Óssea.

A densidade mineral óssea (DMO), em g/cm², o conteúdo mineral ósseo (CMO), em g, e a área em cm² foram examinados em todos os rádios. A avaliação densitométrica

foi realizada após a eutanásia compassiva de todos os animais, objeto do estudo. Utilizou-se o densitômetro de dupla emissão de raios – X (DXA), modelo DPX-ALPHA LUNAR (Figura 4).



Figura 4. Fotografia do densitômetro ósseo de dupla emissão de raios – X (DXA).

Os ossos foram agrupados em blocos de seis, posicionados cranio-caudalmente sobre a superfície da mesa do densitômetro e alinhados com o feixe de luz laser do aparelho. Para isto, foi empregada uma

bandeja cuja superfície possui uma graticula que permite o correto posicionamento das amostras e seu alinhamento com o feixe dos raios-X (Figura 5).

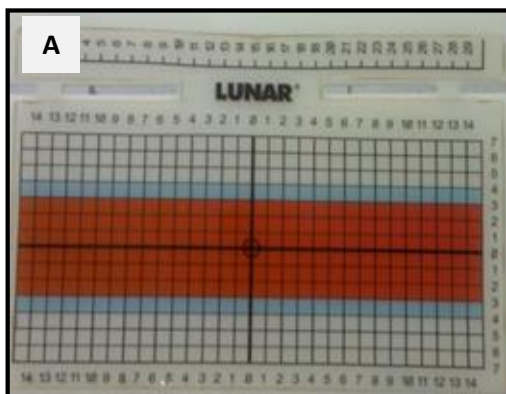


Figura 5. A) Fotografia da bandeja com graticula empregada no posicionamento dos ossos na mesa do densitômetro ósseo; B) fotografia dos ossos posicionados sobre a graticula para serem escaneados no densitômetro ósseo.

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

Após a varredura foi obtida uma imagem radiográfica de alta definição do osso e da área do defeito. A área de estudo foi então delimitada mediante o uso do mesmo software para determinar a DMO (Figura 6).

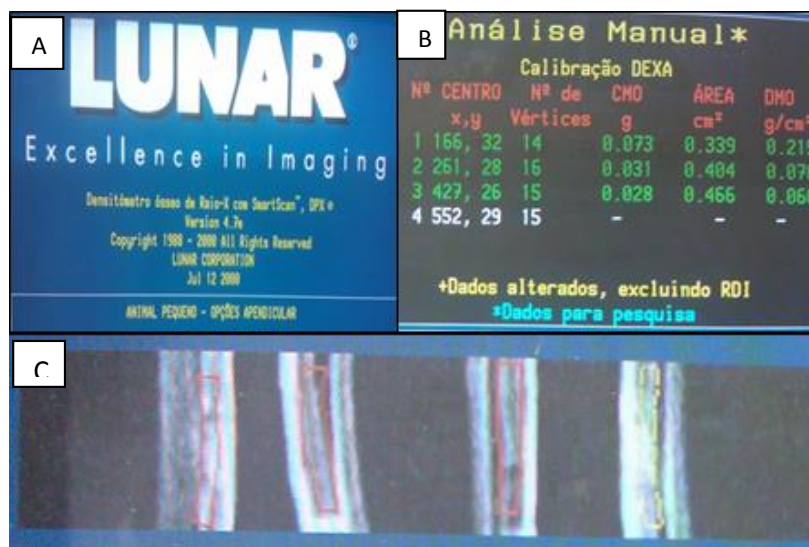


Figura 6. Fotografias da tela do computador durante o processamento das análises densitométricas. A) Software empregado para a análise densitométrica. B) Fotografia com os dados obtidos depois das análises feitas pelo software. C) Imagem da densitometria: a área delimitada (quadro vermelho) no osso representa a área do defeito crítico com o preenchimento com biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida ou autoenxerto.

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

Análise histológica

As avaliações histológicas foram realizadas aos oito (tempo 1), 15 (tempo 2), 30 (tempo 3), 45 (tempo 4) e 60 dias (tempo 5). Os animais foram submetidos à eutanásia por sobredose anestésica utilizando-se tiopental sódico¹² via intravenosa, após sedação com 40 mg/Kg de cloridrato de cetamina¹³ via intravenosa.

12. Thiopentax, Cristália

13. Cetamin 10 %, Rhobifarma

Após a remoção dos tecidos moles, o terço médio do rádio foi colhido a cerca de 5 mm da interface implante-enxerto-linha de ostectomia. As amostras foram fixadas por 48 horas em formalina a 10% tamponada. Posteriormente, cada fragmento ósseo foi envolvido em gaze e identificado para descalcificação em ácido fórmico a 50%, durante 20 dias. A solução foi trocada a cada 48 horas até a comprovação radiográfica de completa descalcificação do tecido.

Após a descalcificação as amostras foram lavadas por 24 horas em água corrente, foram posteriormente desidratadas em álcoois de concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, absoluto 1, absoluto 2),

Resultados e discussão.

O coelho como modelo experimental foi satisfatório, de fácil manipulação e manejo, menor custo da pesquisa e tempo de obtenção de resultados, vantagens já relatadas por An et al. (1999) e Hankenson et al., (2003). A docilidade da espécie, especificamente Nova Zelândia, e o pequeno porte contribuíram para facilitar o transporte dos animais para a realização dos exames clínicos e radiográficos.

Apesar de serem frequentemente preconizados os jejuns sólido e hídrico no pré-operatório, estes não foram realizados,

permanecendo duas horas em cada um deles. Após a desidratação, os fragmentos foram diafanizados em xilol por duas horas, embebidos em parafina líquida por duas horas e incluídos em blocos de parafina. As amostras foram coradas com Hematoxilina-Eosina segundo o procedimento padrão para observação por microscopia óptica de luz.

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

conforme recomendado por Lipman et al. (2008) e nenhuma intercorrência foi verificada. O jejum pré-operatório é feito para minimizar os riscos de vômito durante a anestesia ou no pós-operatório, mas ainda não há um consenso a esse respeito no coelho. Entretanto, o jejum alimentar de uma a 12 horas é considerado benéfico, pois evita a presença de alimento na boca no momento da intubação, bem como, reduz o volume do estômago, facilitando assim a respiração durante a anestesia. De forma geral, há consenso de que não há necessidade de remover a água antes da cirurgia (Richardson,

2002; Mason, 1997; Harcourt-Brown, 2002; Rich, 2002, Lipman et al. 2008).

O protocolo anestésico empregado associado com a intubação oro-traqueal permitiu anestesia com controle dos parâmetros como relatado na literatura (Harcourt-Brown, 2002; Percy e Barthold, 2007), mas não é uma técnica fácil e requer treinamento prévio.

Na avaliação radiográfica, observou-se que 25 dos 70 membros operados ao longo do experimento apresentaram lesão na cortical cranial da ulna, provocada pela serra oscilatória, porém sem alteração na estabilidade do rádio. Dois animais (5%) apresentaram lesões por automutilação das falanges do membro operado, nos pós-cirúrgico imediato, mas foram tratados e

Aos oito dias, havia redução acentuada da biocerâmica nos tecidos moles adjacentes, sugerindo reabsorção da cerâmica localizada além dos limites do defeito ósseo. Chamou a atenção também, o aspecto mais definido dos limites do implante. Ainda neste tempo de observação, verificou-se que o material implantado apresentava características

incluídos no grupo com eutanásia aos oito dias.

O estudo radiográfico permitiu o acompanhamento satisfatório da evolução de todo o processo de reparação óssea, fato já esperado e realizado em todo estudo que acompanha os eventos da regeneração óssea (Manjubala et al., 2002).

Verificou-se no pós-operatório imediato, em todos os animais, o correto posicionamento da placa óssea, dos parafusos e do biomaterial, preenchendo completamente o defeito crítico, bem como a presença da cerâmica nos tecidos circunvizinhos. Este acompanhamento radiográfico é, como relatado por Manjubala et al. (2002), importante para se avaliar os enxertos ou implantes em órgãos e tecidos.

radiográficas mais homogêneas e delimitação dos contornos na região do defeito, aumento de sua radiopacidade e linhas de osteotomia pouco evidentes (Fig. 8). No grupo controle, verificou-se reação periosteal caudal envolvendo toda a extensão do defeito e segmento (8E).

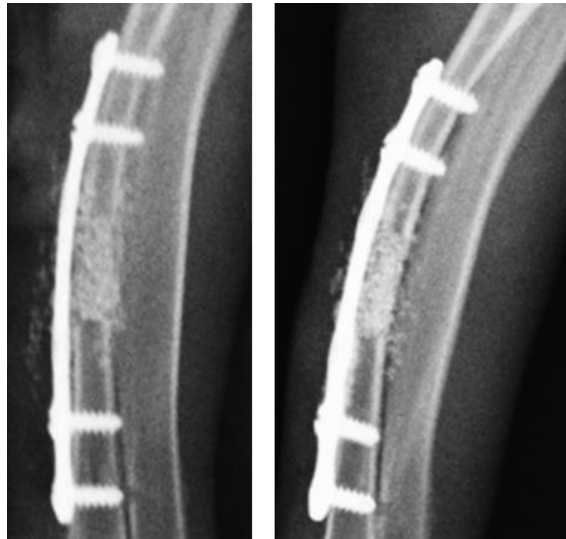


Figura 7. Imagem radiográfica de defeito crítico em rádio de coelho aos zero (A) e oito (B) dias, mostrando defeito preenchido com biocerâmica nano-estruturada micro-macro porosa de absorção rápida em grânulos. Observa-se aumento da radiopacidade da biocerâmica (B).

Aos quinze dias verificou-se em 6,6% (dois) do grupo tratado, aumento da espessura da cartilagem caudal do rádio nos segmentos proximal e distal, aumento da linha de osteotomia no segmento proximal e redução do volume do biomaterial com menor densidade do mesmo (Fig. 8C), transmitindo a impressão visual de maior agregação das partículas de biomaterial, formação de ponte óssea classificada como moderada (score

dois) em 6,6% (dois animais). Neste mesmo período verificou-se nos animais do grupo controle, linhas de osteotomia evidentes e mais amplas com aumento da reação periosteal na superfície caudal do rádio abrangendo autoenxerto e rádio proximal e distal com aumento discreto de densidade parcial do canal medular no segmento distal (Fig. 8F), característica de calo ósseo endosteal e periosteal.

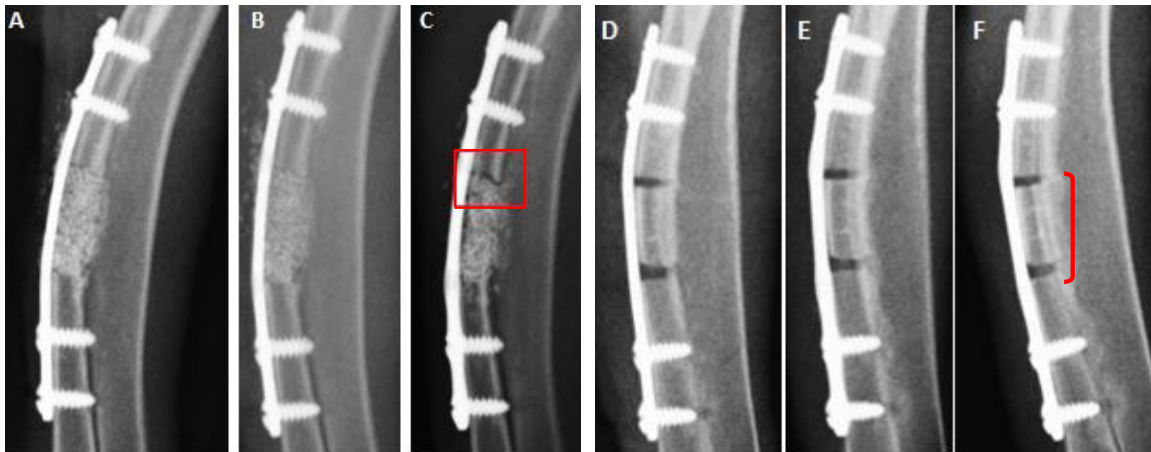


Figura 8. Imagens radiográficas médio-lateral, de rádio de coelhos aos zero (A), oito (B) e 15 dias (C), mostrando defeito crítico preenchido com biocerâmica nano-estruturada micro- macro porosa em grânulos de absorção rápida e autoenxerto em defeito crítico em rádio de coelho aos zero (D), oito (E) e quinze dias (F). Nota-se o aumento da linha de osteotomia (quadro vermelho) (8C) e aumento da reação periosteal caudal no segmento distal (chave vermelha) (8F).

Na avaliação radiográfica de 30 dias observou-se no grupo tratado, aumento da densidade parcial do canal medular e aumento da espessura da cortical caudal do rádio em 20 % (cinco) dos animais, dos quais 16 % (quatro animais) mostravam reação discreta (escore um) e 5 % (um) moderada (escore dois). Formação de calo ósseo foi verificada em 40 % (dez animais), sendo 24% (seis) moderado (escore dois) e 16% (quatro

discreto (oito animais) e 20 % moderado (cinco animais). Os 48 % (12 animais) restantes apresentavam radiopacidade do canal medular característico de formação de calo endosteal (Figura 9 D). Assim como no grupo tratado,

animais) discreto (escore dois). Havia formação de ponte óssea em 88% (22) dos animais dos quais, 44% discreta (escore um) e 44% moderada (escore dois). Nos demais 12% não havia ponte óssea. Em todos os animais do grupo tratado a ponte óssea foi observada exclusivamente na cortical caudal. No grupo controle havia formação de calo ósseo discreto (escore um) em 52% dos casos, sendo 32 %

também no controle a ponte óssea, foi observada exclusivamente na cortical caudal em todos os animais, com 32 % (oito animais) considerada como discreta e 68% (dez e sete animais) como moderada.



Figura 9. Imagem radiográfica, médio-lateral de rádio de coelho aos quinze e trinta dias, mostrando defeito crítico preenchido com biocerâmica nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida (A, B) e autoenxerto (C, D). B) Observa-se formação de calo ósseo (setas vermelhas) no defeito preenchido com biocerâmica. D). Observa-se radiopacidade no canal medular (círculo vermelho) na interface radio-autoenxerto.

Aos 45 dias, 30% (seis animais) do grupo tratado mostravam maior aumento da densidade medular ocupando todo o canal e da cortical caudal do rádio, sendo discreta (escore um) em 25% (cinco animais) e moderada (escore dois) em 5% (um animal). Ao ser avaliada a formação de calo ósseo observou-se que em 35% (sete animais) era discreto (escore um), e em 20% (quatro animais) moderada (escore dois). Formação de ponte óssea era moderada em 75 % (quinze animais) e discreta em 25% (cinco animais), com continuidade da cortical caudal, mantendo-se evidentes as linhas de osteotomia da cortical cranial. Ao avaliar a

remodelação óssea verificou-se que era discreta (escore um) em 30 % (seis animais), moderada inicial em 15 % (três animais) e avançada (escore três) em 15 % (três animais). Era evidente a redução da radiopacidade da biocerâmica aproximando-se daquela da cortical (Fig. 10 B). No grupo controle havia continuidade cortical caudal em 80% (dez e seis animais) dos animais com formação de calo ósseo no segmento proximal, mas ainda com presença de linha parcial da osteotomia. Nos demais 20% (quatro animais), observou-se início de remodelação do calo ósseo e continuidade da cortical caudal no segmento distal (Fig.10D).

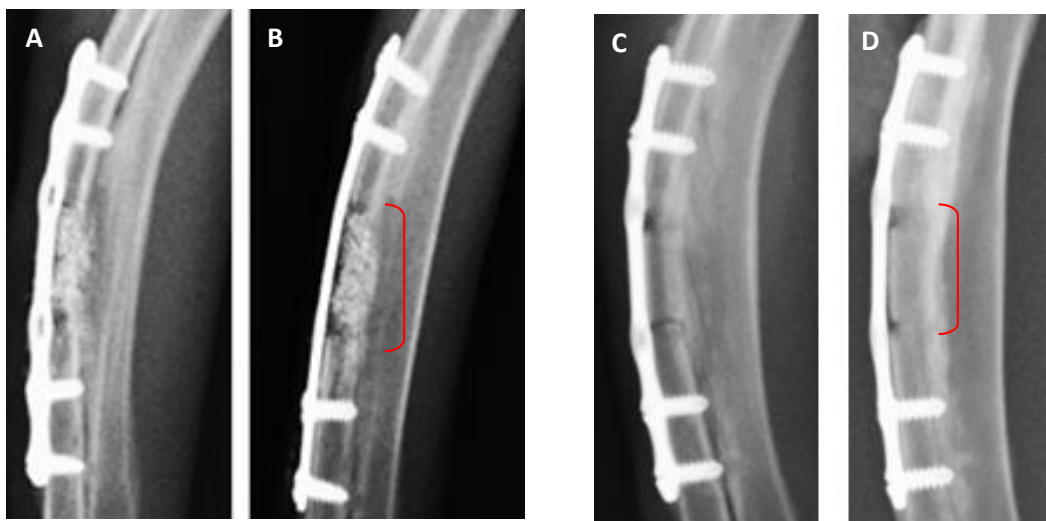


Figura 10. Imagem radiográfica médio-lateral, de rádio de coelhos aos trinta e quarenta e cinco dias mostrando defeito crítico preenchido com biocerâmica nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida (A e B) e autoenxerto (C e D). Observa-se continuidade cortical caudal (chave vermelha) nos dois grupos.

Aos 60 dias, observou-se preenchimento do defeito na quase totalidade com áreas de menor densidade na linha de osteotomia na superfície cranial do rádio. Calo ósseo estava presente em 60% dos animais (nove animais), sendo discreto (escore um) em 33,3% (cinco animais) e moderado (escore 2) em 26,6% (quatro animais). Formação de ponte óssea ocorreu

animais), moderada inicial (escore dois) em 40% (seis animais) e moderada avançada (escore três) em 26,6% (quatro animais). No grupo controle, 80% dos animais (doze) apresentavam remodelação do calo, evidenciando continuidade cortical no

em 80% do grupo (doze animais), sendo que deste total, 6,6% (um animal) tinha ponte óssea discreta (escore um), 60% (nove animais) ponte óssea moderada (escore dois) e 13,3% (dois animais) apresentavam ponte óssea exuberante (escore três). Remodelação óssea foi observada no 86,6% dos casos (treze animais), sendo discreta em 20% (três

segmento caudal. Nos demais 20% (três animais), verificou-se linha de osteotomia pouco definida no segmento proximal cranial com ausência de calo ósseo (Fig. 11 B e D).

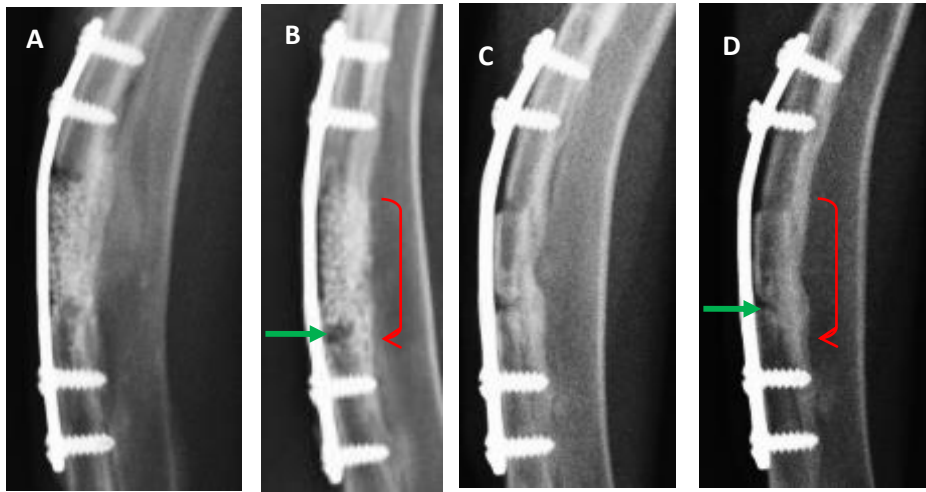


Figura 11. Imagem radiográfica médio-lateral, de rádio de coelho aos 45 e 60 dias, mostrando defeito crítico preenchido com biocerâmica nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida (A e B) e autoenxerto (C e D). Nota-se a continuidade cortical com superfície regular do calo ósseo (linha vermelha) e persistência da linha de osteotomia parcial e pouco definida na cortical cranial (seta verde).

Aos 90 dias observou-se preenchimento total de defeito com diminuição da densidade radiográfica na superfície cranial do rádio adjacente à placa. Neste tempo de avaliação, verificou-se em 20 % dos animais (dois), calo ósseo discreto (escore um) e 30% (três animais) moderado (escore dois). A ponte óssea ocorreu em 100% dos animais do grupo tratado (dez), sendo 70 % moderada e 30 % exuberante (com continuidade cortical). A remodelação óssea foi observada em 80% dos animais (oito), sendo 30% (três animais) discreta (escore um), 20% (dois animais) moderada avançada (escore dois) e 30% (três animais)

exuberante (escore três). No grupo controle, a remodelação óssea mostrava-se avançada com continuidade do canal medular e radiopacidade do autoenxerto semelhante a do osso receptor (Fig. 12A).

No grupo tratado aos 120 dias, o 100% dos animais (cinco) mostravam ponte óssea, moderada em 60 % (três animais) que apresentavam linha de osteotomia parcial e pouco definida na região cranial do rádio e, 40 % (dois animais) com ponte óssea exuberante. A remodelação óssea foi observada em 60% dos casos (três animais) como moderada inicial (escore dois) e 40%

(dois animais) moderada avançada (score três), com radiopacidade similar ao osso. No grupo controle, a remodelação óssea se mostrava avançada em 60 % dos animais

(três) e completa nos demais, 40 % (dois animais), com menor densidade do autoenxerto em relação ao osso receptor (Fig. 12D).

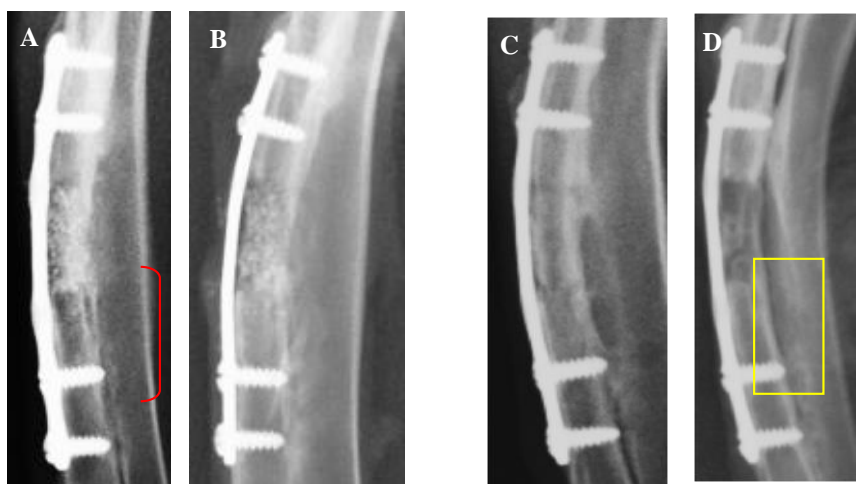


Figura 12. Imagem radiográfica médio-lateral de rádio de coelho aos 90 e 120 dias mostrando defeito crítico preenchido com biocerâmica nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida (A e B) e autoenxerto (C e D). Radiopacidade aumentada no enxerto (linha vermelha) e autoenxerto com remodelação e menor radiopacidade em relação ao osso receptor (quadrado amarelo).

A radiopacidade aumentada ao redor da biocerâmica em 70 % das amostras analisadas aos 90 dias (sete animais) (Figura 12 A e B) e discreta redução em 80 % (quatro animais) aos 120 dias (Fig. B) caracterizando a reparação óssea. Observação semelhante, 83 % aos 90 dias e 100 % aos 120, foi relatada por Sá (2005).

Nas avaliações de densitometria óssea, verificam-se diferença significativa entre o

Após 90 dias verificou-se um decréscimo gradual nos níveis de Ca, resultado da remodelação óssea, fato observado nos dois grupos. Aos 120 dias o grupo controle mostrava continuidade cortical, mas com menor radiopacidade em relação ao osso receptor em 20 % dos animais (um animal) (Fig. 12 D).

grupo tratado e o controle ao longo do tempo de estudo (Tab. 1).

Tabela 1. Valores das médias da DMO (g/cm^2) em defeito crítico de rádio de coelhos preenchidos com biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturado micro-macro porosa de absorção rápida em grânulos e autoenxerto aos 8, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias ($p < 0,05$).

Tratamentos	Médias
1 Biocerâmica de absorção Rápida	0.288114 a1
2 Controle positivo (auto enxerto)	0.159063 a2

A diferença no valor do Ca g/cm^2 entre o tratamento e o grupo controle é devido aos níveis de concentração de Ca na biocerâmica em relação ao osso, mantendo-se esta diferença ao longo dos tempos.

As variações da DMO ao longo do tempo, nos dois grupos de estudo estão representadas no gráfico 1.

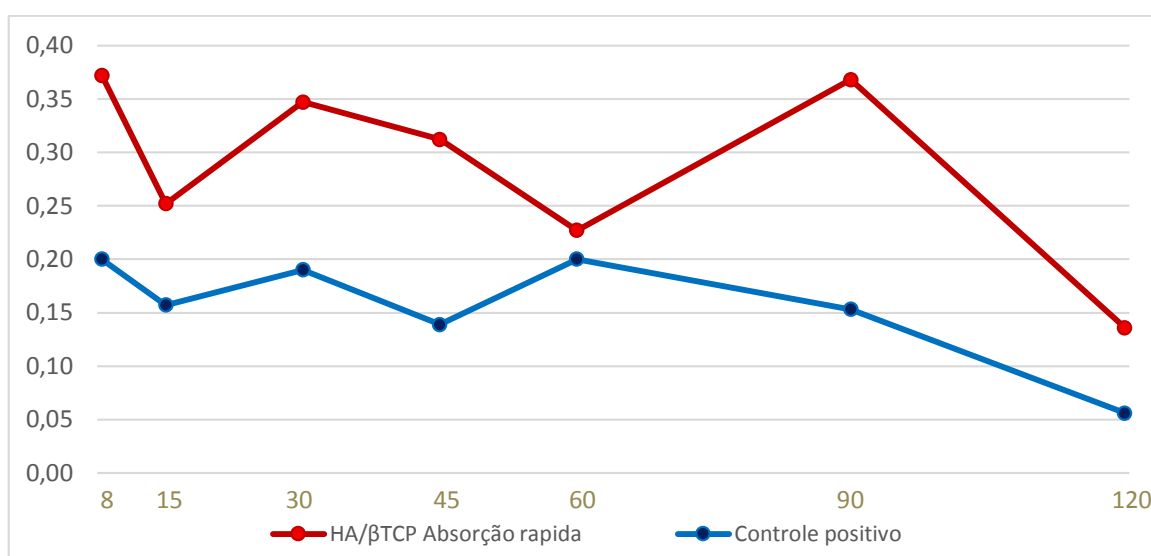


Gráfico 1. Variações da DMO em defeito crítico de rádio de coelho preenchido com biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturado micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida e autoenxerto aos 8, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias ($p < 0,05$).

Foi observado até aos 45 dias (Gráf. 1), diferença estatística entre os dois grupos entre os tempos, porém aos 60, a DMO mostrou valores próximos entre si (0,20 e 0,22 gr. Ca/cm²) sem diferença estatística. Aos 90 dias entretanto, observou-se novamente, aumento acentuado da DMO (0,37 gr. Ca/cm²) no grupo tratado com subsequente redução gradual até o final do estudo. No grupo controle houve a redução gradual dos níveis de DMO a partir dos 60 até aos 120 dias.

Esta similaridade entre os valores da DMO aos 60 dias pode ser devida à redução do cálcio no implante conforme as observações radiográficas e presença de matriz óssea não mineralizada como verificado na avaliação histológica e relatado por Cullun et al., (1988) que atribui a diminuição da radiopacidade à invasão de tecido conjuntivo no local da lesão.

A elevação do DMO aos 90 dias pode ser atribuída à deposição mineral, traduzida radiograficamente pelo aumento de densidade adjacente à cortical e a redução subsequente, decorrente do processo de remodelação óssea.

O aumento da linha de osteotomia observado radiograficamente em ambos os grupos nos tempos iniciais (oito e 15 dias) é esperada e fisiológica decorrente do processo

de reabsorção do tecido necrótico ocasionado pela osteotomia, que evolui segundo os mesmos princípios fisiológicos de reparação de fratura traumática como o relatado por Molina (2008), Glowacki, (1998), Hollinger (1999).

A osteotomia é uma fratura experimental e evolui seguindo os mesmos princípios. A definição dos contornos da biocerâmica observado radiograficamente aos oito e 15 dias, pode ser atribuída à ação celular de reabsorção parcial de partículas ou detritos celulares, resultantes da osteotomia. Neste período, tem-se fibrina e células sanguíneas envolvendo as partículas, tecido de granulação e tecido blástico entremeando o biomaterial.

Histologicamente, verificou-se em ambos os grupos aos oito e 15 dias presença de células sanguíneas e fibroblastos (Fig. 13), como o relatado por Lobo et al., (2009) e Lobo e Arinzeh (2010).

Ao exame histológico observou-se pequenos ninhos de células condroblásticas adjacente à linha de osteotomia caudal do rádio e na superfície cranial da ulna. Neste intervalo de tempo, entre oito e 15 dias, ocorre neoformação vascular e formação de uma nova rede de capilares, surgem mais células fibroblásticas, aumentando também a proporção de células mesenquimais

indiferenciadas (fase celular do calo) como relatado na literatura (Glowacki, 1998; Hollinger, 1999; Adriens, 1999; Molina, 2008). No grupo controle aos 15, 30 e 45 dias havia tecido osteóide formado a partir das bordas da osteotomia e tecido cartilaginoso (calo primário). A função é, como relatado por Doblare et al. 2004 e Molina (2008), estabilizar os fragmentos ósseos. Neste estudo observou-se presença de matriz

cartilaginosa nas bordas dos segmentos ósseos e em algumas áreas da ulna correspondentes à lesão provocada pela serra durante a ostectomia. Gotcher, (1998) e Marx (1999) citam que a diminuição do pH, evento presente nas lesões ósseas traumáticas como fraturas ou osteotomias, favorece a diferenciação das células condroblásticas (Fig.14).

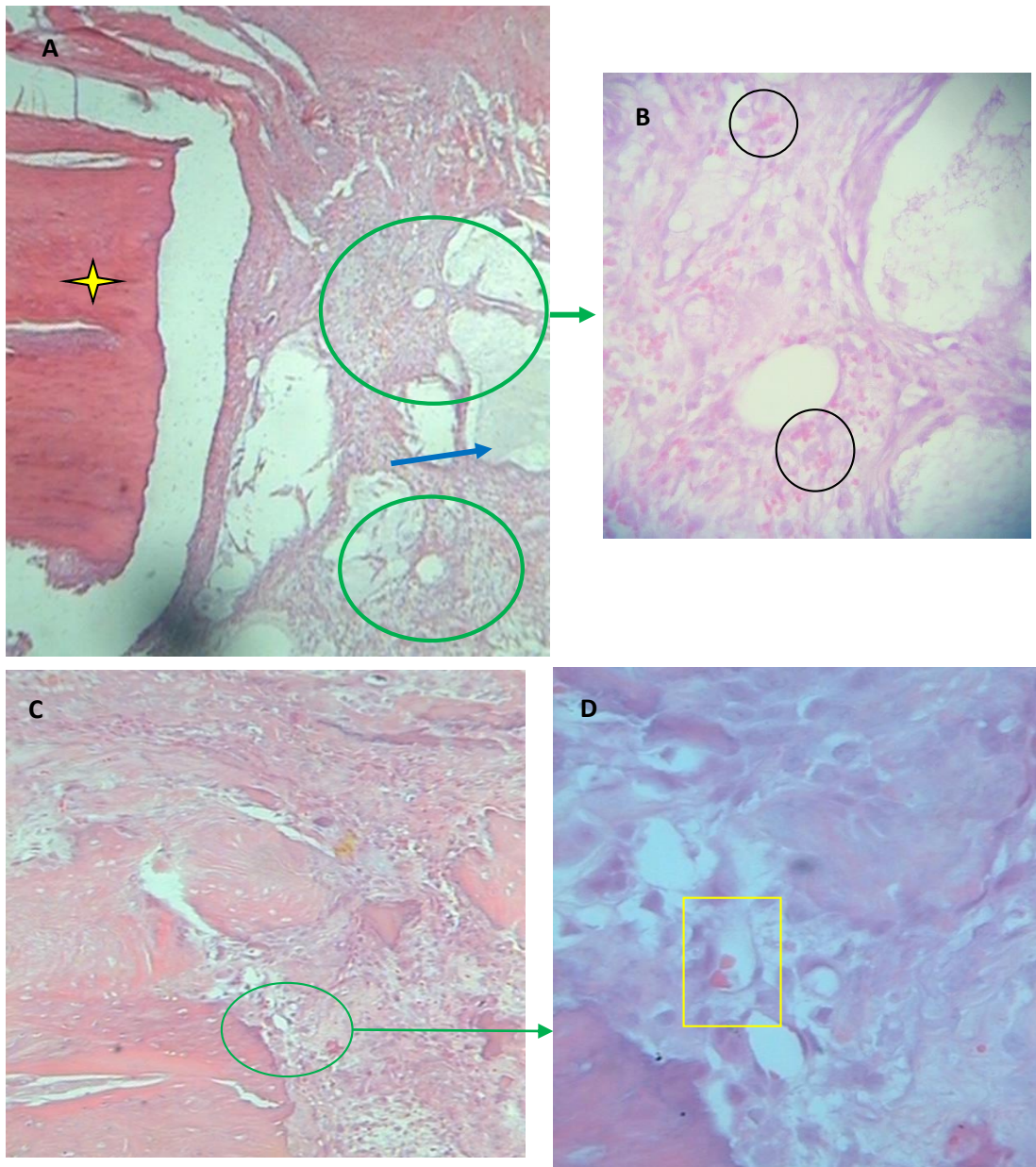


Figura 13. Fotomicrografia de defeito crítico em radio de coelho aos oito dias da implantação de biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida (A, B) e autoenxerto (C, D). A) Tecido de granulação (círculo verde), espaço ocupado pelas partículas de biocerâmica (seta azul), osso receptor (estrela amarela), (HE; 4X). B) Tecido de granulação. Presença de hemácias (círculo preto) e tecido blástico se formando em torno do material; partículas de biocerâmica (seta azul), (HE; 40X). C) Interface osso-autoenxerto: nota-se o tecido de granulação na região da linha de osteotomia (HE; 10X). D) Formação de vasos sanguíneos com presença de hemácias (quadrado amarelo), infiltrado inflamatório com presença de mononucleares e células blásticas (HE; 40X).

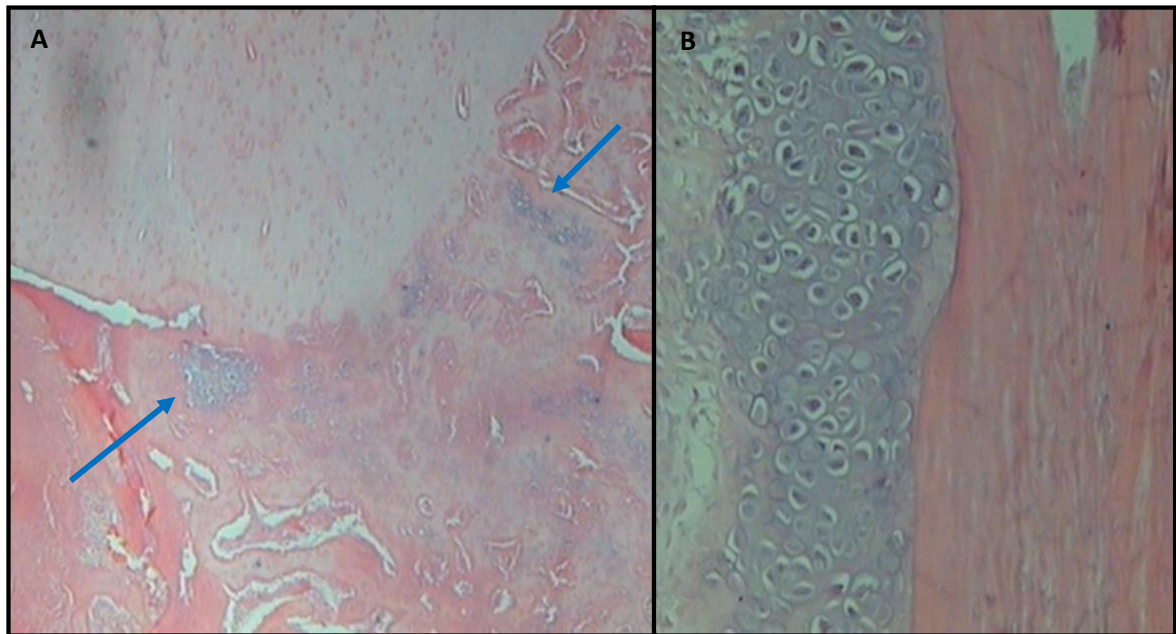


Figura 14. Fotomicrografia de defeito crítico em rádio de coelho aos 15 dias da implantação de autoenxerto. A) Interface osso-autoenxerto, formação endocondral na interface do rádio (setas azuis), (HE; 4X). B) Matriz cartilaginosa formada na ulna adjacente à linha de osteotomia do rádio, (HE; 10X).

Aos 30 dias de avaliação, a DMO era elevada em ambos os grupos com valores superiores aos do dia 15 e próximos àqueles dos oito dias, com diferença estatística entre os grupos. A maior densidade no grupo tratado pode ser explicada pela constituição de fosfatos de cálcio do implante. Havia também neste tempo, reação periosteal, maior radiopacidade na região do enxerto e linha de osteotomia pouco evidente com

presença de calo ósseo como observado por Borges (1998) em trabalho experimental com coelhos nos mesmos tempos de observação. Os achados radiográficos e da DMO são corroborados pela avaliação histológica que mostra aos 30 dias, presença de tecido osteóide entremeando o implante a partir dos fragmentos ósseos e da ulna em direção ao defeito, caracterizando formação óssea centrípeta (Fig. 15).

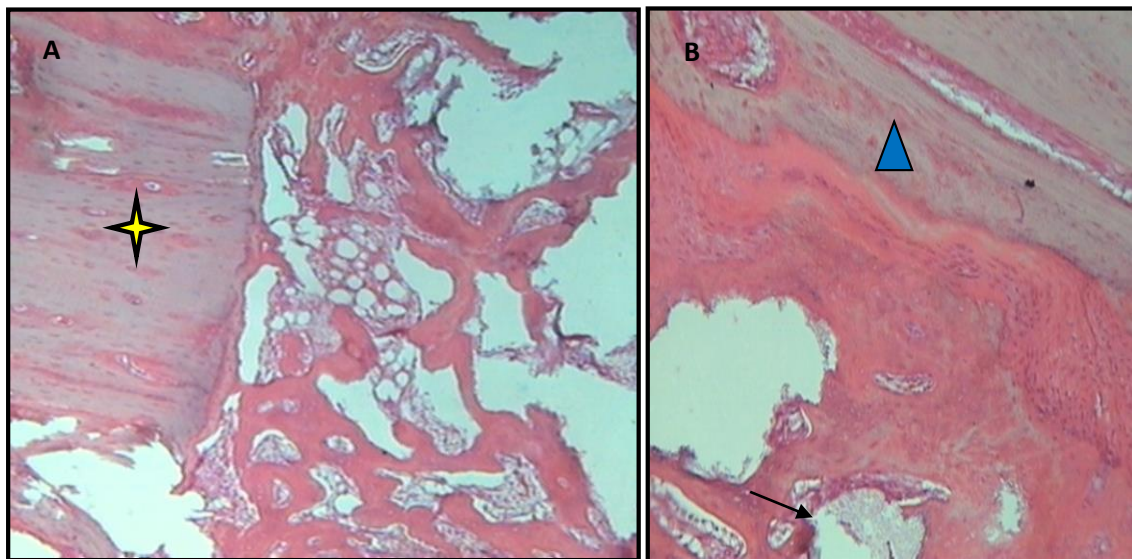


Figura 15. Fotomicrografia da interface osso-biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturado micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida em rádio de coelho após 30 dias. A) Acentuada vascularização e células osteoblásticas em torno do material a partir do osso receptor (estrela amarela) (HE; 4X). B) Formação de matriz óssea a partir da ulna (triângulo azul) para a região do defeito preenchido com biocerâmica (espaço ocupado pelas partículas de biocerâmica, seta preta) (HE; 10X).

Como relatado por Bucholz et al. (1987) a utilização de materiais cerâmicos pode eventualmente prejudicar a interpretação radiográfica durante o processo de regeneração, como é o caso deste estudo. A radiopacidade do material pode induzir a interpretação precoce de uma continuidade cortical. Cumpre ressaltar que, essa continuidade cortical observada aos 45 dias no grupo tratado e no grupo controle ocorreu apenas na cortical caudal, acompanhado de uma diminuição e retração caudal da cerâmica. Isto pode ser devido à maior

atividade celular na região caudal explicada pela presença do periósteo ulnar, maior aporte sanguíneo, células progenitoras mesenquimais diferenciadas, células progenitoras osteogênicas, osteoblastos e fibroblastos, o que também é citado por Soleri, (1995), Roch, (2000), Allen et al., (2004), Shapiro (2008) e Dwek (2010). Aos 45 dias, verificou-se, histologicamente, a formação de matriz óssea não mineralizada e formação de trabéculas no grupo tratado (Fig.16).

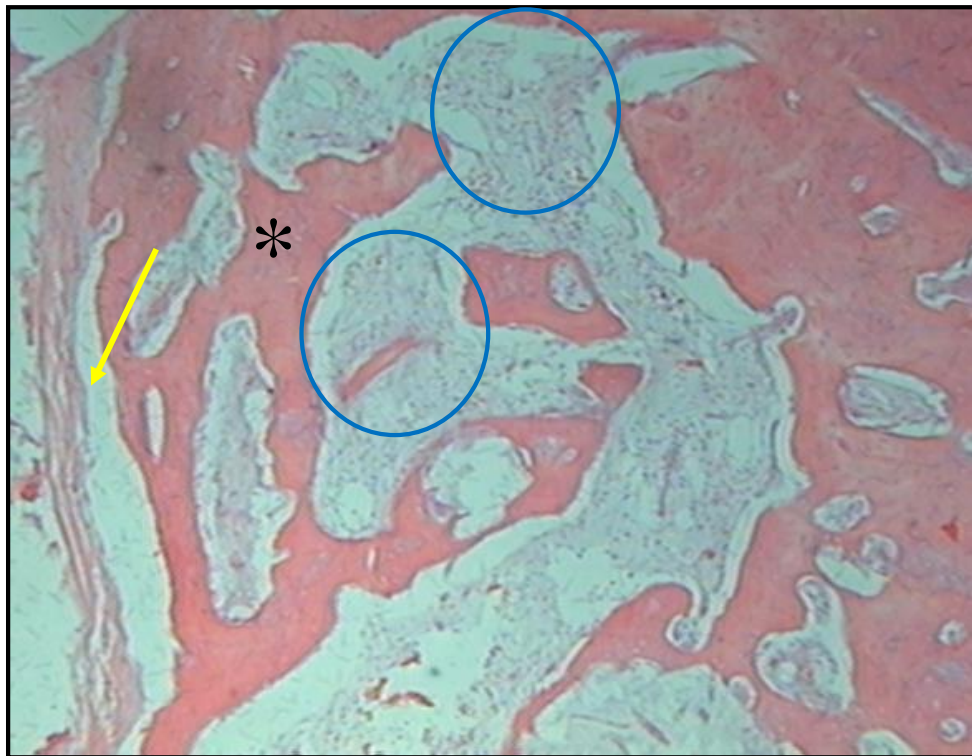


Figura 16. Fotomicrografia do defeito crítico em radio de coelho preenchido com biocerâmica após 45 dias. Tecido blástico com acentuada neovascularização (círculos azuis) e formação de trabéculas em volta e no interior dos grânulos da biocerâmica (estrela preta) e fibras colágenas (seta amarela) (HE; 4X).

Aos 60 dias, observa-se radiograficamente diminuição na densidade da cerâmica, bem como retração caudal do biomaterial, ou seja afastamento da superfície de contato com placa. Esta redução da

densidade local pode ser devido à maior quantidade de matriz óssea depositada na região do defeito (Fig.17). No grupo controle havia um aumento da radiopacidade medular compatível com presença de calo endosteal.

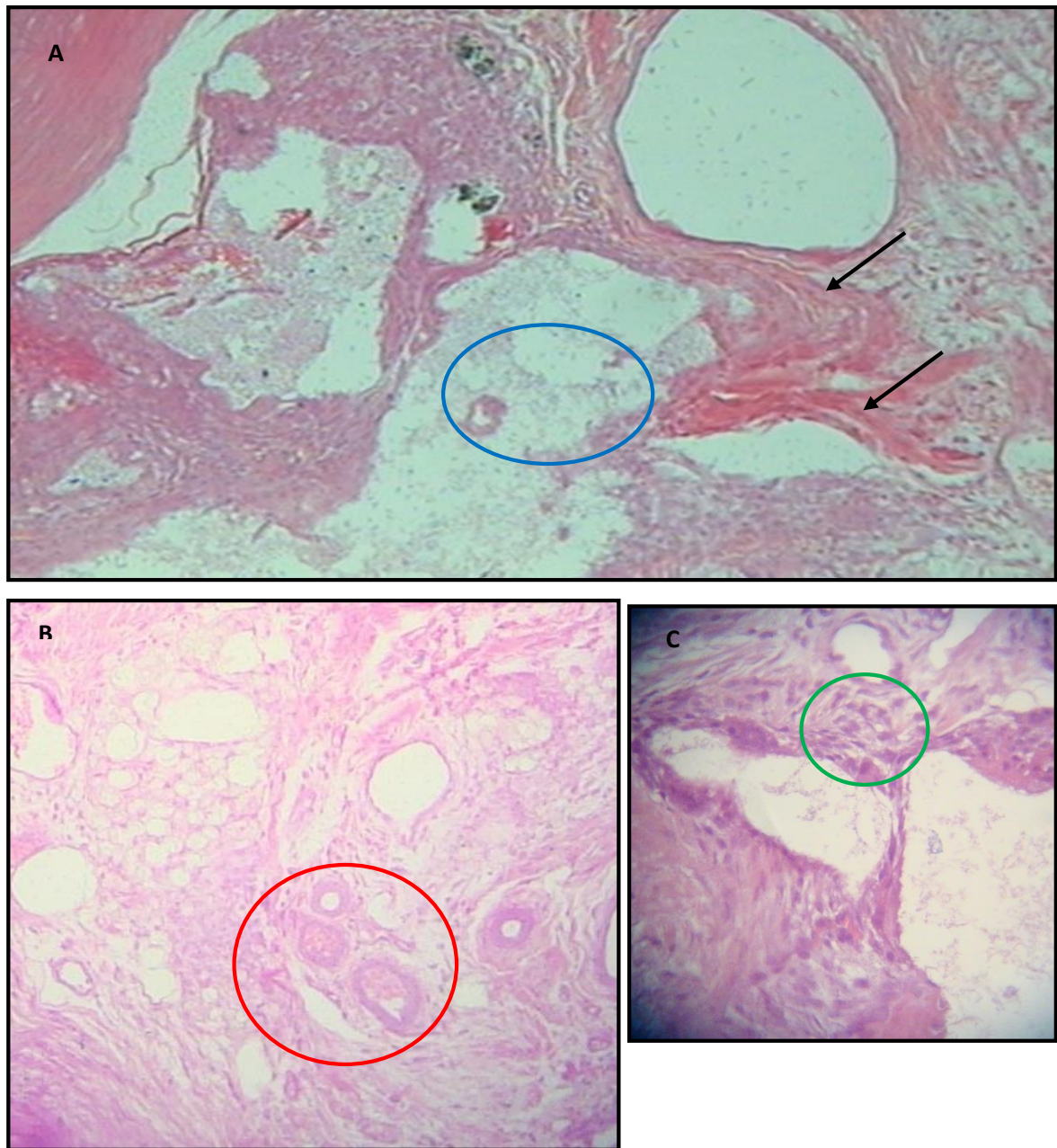


Figura 17. Fotomicrografias de defeito crítico em rádio de coelho preenchido com biocerâmica nano-estruturada macro-micro porosa em grânulos, de absorção rápida aos 60 dias. A) Tecido conjuntivo fibroso com invasão de células sanguíneas e células osteoblásticas na biocerâmica, fibras colágenas (setas pretas) tecido osteóide no espaço ocupado pelo biomaterial (círculo azul) (HE; 10 X). B) Vasos sanguíneos com presença de hemácias (círculo vermelho) no espaço ocupado pela biocerâmica. C) Tecido osteóide, grande número de células osteoblásticas (círculo verde) no espaço ocupado pela biocerâmica (HE; 40X).

Os resultados mostram que a biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida é um material biocompatível e não apresenta nenhum sinal de reações orgânicas adversas, que seria traduzido pela presença de células gigantes. Como citado por Williams (2008), a biocompatibilidade consiste na habilidade do desempenho favorável do material quando em contato com o meio biológico. Estes resultados já eram esperados visto que os compostos de fosfatos de cálcio e hidroxiapatita são reconhecidos por serem biocompatíveis (Ben-Nissan, 2003; Pataro, 2005; Sá, 2005; Safdar, 2005; Volkmer, 2006; Garrido et al., 2011). Todavia, a ação do produto pode variar segundo suas especificações.

Observou-se neste estudo a formação de uma rede vascular por entre os poros da biocerâmica desde o primeiro tempo de avaliação (oito dias), fato relatado por Pilliar et al. (2001), Pataro (2005) e Lobo et al., (2009) e Lobo e Arinzeh (2010). Segundo os autores, a presença destes poros permite a deposição das células e a condução do processo por haptotaxia. Houve formação de matriz óssea em contato com o biomaterial implantado no defeito crítico, caracterizada por uma neoformação centrípeta de um tecido conjuntivo fibroso com infiltrado de células

osteoblásticas, característico de ossificação intramembranosa como cita a literatura (Mattioli-Belmonte, 1997; Garces, 1999; Sá, 2005).

Foi observada no grupo controle, ossificação do tipo endocondral (Gotcher, 1998; Hollinger, 1999; Marx, 1999; Bostrom, 2000), o que não foi verificado no grupo tratado até os 60 dias, apesar de se tratar de um biomaterial em grânulos. Esse resultado contraria o relatado por Borges (1998) que observou presença de formação endocondral após implantação de hidroxiapatita em pó. As características específicas de cada produto entre tanto, pode levar a reações orgânicas diferentes.

Houve formação de tecido ósseo primário, formação de trabéculas a partir do tecido ósseo preexistente (região do fragmento ósseo do rádio) desde os 30 dias após a implantação da biocerâmica, evidenciando contato direto entre o implante e o osso, oposto ao observado por Sá (2005) que citou que a hidroxiapatita apresenta baixa afinidade com o osso. Reafirmando o comentário anterior, cada produto tem suas especificações e as reações no organismo variam segundo diferentes características. A biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa de absorção rápida em grânulos contém menor proporção de HA e maior quantidade de fosfatos de

cálcio (Rumpel et al., 2006) . Isto é, sua composição e características estruturais fazem com que sua absorção seja mais rápida, podendo formar matriz óssea em contato direto com o osso mais precocemente (Gil et al., 2003; Lobo et al., 2009; Garrido e Sampaio, 2010; Lobo e Arinzeh, 2010; Lobo (2011). Entre as fibras colágenas na região central do defeito crítico foram observadas partículas do biomaterial e tecido ósseo em volta e no interior dos grânulos de cerâmica. Até 60 dias de avaliação havia grande quantidade de matriz óssea não mineralizada em volta e no interior dos grânulos da biocerâmica (Fig. 17) como o relatado por Lobo et al, (2009) e Lobo e Arinzeh (2010) a partir de 30 dias de avaliação. Havia também presença de tecido ósseo compacto a partir dos segmentos ósseos preexistentes para o centro, caracterizando formação óssea centrípeta.

A biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida como observado neste estudo, pode ser empregada em casos clínicos com grandes perdas ósseas, uma vez

que ela favorece a invasão e multiplicação celular e propicia assim, a regeneração óssea.

Conclusões

Nas condições em que foi realizado este estudo pode-se concluir que:

- A biocerâmica de fosfatos de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida pode ser indicada para o tratamento de defeitos críticos por propiciar a regeneração óssea sem alterar o processo de reparação.
- Os micro e macro poros da biocerâmica permitem a penetração de túneis vasculares e invasão celular e permite um crescimento ósseo por aposição, de forma centrípeta.
- A biocerâmica de fosfatos de cálcio nano-estruturada micro-macro porosa em grânulos de absorção rápida é um material biocompatível sem causar alterações microscópicas indicativas de rejeição.

Referências bibliografia

1. ADRIENS, P.A. Preservation of bony sites. Em: Proceeding of the 3rd European workshop on periodontology, 1999, Berlin: Quintessence. Implant dentistry. Lang NP, Karring T, Lindhe J (eds), p.266-280.
2. AHLMANN E.; PATZAKIS M.; ROIDIS N.; SHEPHERD L.; HOLTOM P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg Am.*, v. 84, n. 5, p.716-20, 2002.
3. ALLEN, M.R.; HOCK, J.M.; BURR, D.B.. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone*, v. 35 n. 5, p.1003–12, 2004.
4. AN, Y.H.; FRIEDMAN, R.J.; DRAUGHN, R.A. Animal Models of Bone Fracture or Osteotomy. Em: Animal Models In Orthopaedic Research. (AN, Y.H. and FRIEDMAN, R.J.). Boca Raton: CRC Press. 1999. p.197-217.
5. ARISTIZABAL, O.L.; JUNQUEIRA, R.; PACHECO, A.B.; FERREIRA, S.O.; MONTEIRO, B.S.; NEVES, C.D.; OLIVEIRA, A.L. Caracterização do coral Porites asteroides por meio de difração de raios-x e microscopia eletrônica de varredura. *Vet. e Zootec.*, v. 15, n. 1, p. 47-55, 2008.
6. BIOCERAMICA para reconstrução óssea. Belo Horizonte: EINCO, 2011. 13p. (Relatório Técnico).
7. BEN-NISSAN, B. Natural bioceramics: from coral to bone and beyond. *Current Opinion in Solid State and Materials Science.*, v. 7, p. 283-288, 2003.
8. Borges, A.P.B. O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia, de cães (Canis familiares). Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodispersão. 1998. Tese Doutoral, Departamento de Medicina Veterinária- Escola de veterinária da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte.
9. BOSTROM, M.P.G.; YANG, X.; KOUTRAS, I. *Biologics in bone healing. Curr Op Orthp.*,v.11, p.403-412, 2000.
10. BUCHOLZ, R.W.; CARLTON, A.; HOLMES, R.E.; Hidroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Orthop. Clin. North Am.*, v. 18, p.323-334, 1987.
11. CULLUN, P.E.; FROST, D.E.; NEWLAND, T.B. et al. Evaluation of hidroxyapatite particles in repair of alveolar clefts on dogs. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.46, n.4, p.290-296, 1988.
12. DENNY, H.R.; BUTTERWORTH, S.J. Fracture Healing. In: _____. A Guide to Canine and Feline orthopaedic. USA: Blackwell Science, 2000. Cap. 1, p. 1–17.
13. DOBLARE, M.; GARCIA, J.M.; GOMEZ, M.J. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics.* v.71, p. 1809 -1840. 2004.

14. DWEK, J.R. The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence?. *Skeletal Radiol.*, v.39, p.319–323, 2010.
15. FARDIN, A.C.; JARDIM, E.C.; GAETTI, PEREIRA, F.C.; GUSKUMA, M.H.; ARANEGA, A.M.; GARCIA, J.I.R. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. *Innov. Implant. J., Biomater. Esthet.*, v. 5, n. 3, p. 48-52, 2010.
16. FOSSUM TW. Cirurgia de pequenos animais. São Paulo: Roca, 2002., p. 792-799 ; 848–853.
17. GARCES, C.L. Fisiopatología del callo de fractura. Em: De Pedro JA, Perez AJ. Fractura. Buenos Aires: Panamericana, 1999, p.3-12.
18. GARRIDO C.A., SAMPAIO T.C. Use of bioceramics in filling bone defects. *Revista Brasileira de Ortopedia.*, v. 45, n. 4, 2010.
19. GARRIDO, C.A.; LOBO, S.E; TURÍBIO, F.M.; LEGEROS, R.Z. Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics for Orthopaedic Reconstructions: Clinical Outcomes. *International Journal of Biomaterials*, 2011.
20. GIL A.J, ; GARRIDO L.R, ; GIL A.R, ; MELGOSA G.M. Material for bone healing and substitution growth factors and gene therapy in orthopaedics surgery and traumatology. *Mapfre Medicina.*, v. 14, n.1, p. 51-65, 2003.
21. GOLDBERG V.M.; AKHAVAN S. Biology of Bone Grafts in Bone Regeneration and Repair in Biology and Clinical Application; New jersey: Totowa, 2005, p. 57-65.
22. GOTCHER, J.E.; GERARD, D.A. Fracture repair in the facial skeleton. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.*, v.10, p.519-530, 1998.
23. GLOWACKI, J. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Rel Res.*, v.35, p.82- 89, 1998.
24. HANKENSON, K.D.; CAVALIERE, C.M.; FRANK, R.P. Animals Models of Skeletal Disease. c.10. In: HAU, J. VAN HOOSIER, G.L. Handbook of Laboratory Animal Science. 2ed. Washington: CRC Press, 2003. Cap. 10, p.183-224.
25. HARCOURT-BROWN, F. Textbook of Rabbit Medicine. USA: Elsevier Science Limited. 2002.
26. HELM, G.A.; DAYOUB, H.; JANE, J. A bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis. *Neurosurg. Focus.*, v.10, n.4, p.1-5, 2001.
27. HOLLINGER, J.O.; BUCK, D.C.; BRUDER, S.P. Biology of bone healing:its impact on clinical therapy. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). Tissue engineering. Applications in maxillofacial surgery and periodontics. Illinois:Quintessence, 1999, p.17-53.
28. KÜBLER, A.; NEUGEBAUER, J.; OH, J.; SCHEER, M. & ZÖLLER, J., E. Growth and proliferation of human osteoblasts in different bone graft substitutes. An in vitro tudy. *Implant Dent.*, v. 13, p.171-9, 2004.

29. KASTL S, SOMMER T, KLEIN P, HOHENBERGER W, ENGELKE K. Accuracy and precision of bone mineral density and bone mineral content in excised rat humeri using fan beam dual-energy x-ray absorptiometry. *Bone.*, v.30, n.1, p.243-246, 2002.
30. LEGEROS, R.Z. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Adv Dent Res.*; v.2, n.1, p.164-180, 1988.
31. LEGEROS, R.Z.. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev.*; v. 108, n.11, p. 4742-4753, 2008.
32. LINKHART, T.A. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF-b and BMP. *Bone*, v.19, n.6, p.591-603, 1998.
33. LIPMAN, N.S.; MARINI, R.P.; FLECKNELLIN, P.A. Anesthesia and Analgesia in Rabbits. c.11. In: FISH, R.; DANNEMAN, P.J.; BROWN, M.; et al. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. 2ed. USA: American College of Laboratory Animal Medicine. 2008. p.299-333.
34. LOBO, S.E.; WYKROTA, F.H.; OLIVEIRA, A.C.; et al., Quantification of bone mass gain in response to the application of biphasic bioceramics and platelet concentrate in critical-size bone defects. *J. Mater Sci. Mater Med.* 2009; v. 20, n.5, p.1137-1147.
35. LOBO, S.E; ARINZEH, T.L.; Biphasic calcium phosphate ceramics for bone regeneration and tissue engineering applications. *Materials.* 2010; v. 3, p. 815 – 826.
36. LOUZADA, M.J.Q.; XAVIER, C.A.M.; MARQUES-NETO, J.F. Ação da calcitonina na resolução de perfurações ósseas em coelhos: controle fotodensitométrico e histológico. *Revista Brasileira de Reumatologia.*, v.30, n.4, p.111-116, 1990.
37. 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. (appl Biomater).*, v.63, p.200-208, 2002.
38. MARIEB, E.N.; HOEHN, K. Human Anatomy and Physiology- 7th Ed., San Francisco - Pearson Benjamin Cummings, 2007.
39. MARX, R.E. Platelet rich plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. En: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). Tissue engineering. Applications in maxillofacial surgery and periodontics. Illinois: Quintessence, 1999, p.71-82.
40. MASON, D.E. Anesthesia, Analgesia, and Sedation for Small Mammals. In:QUENSENBERRY, H. Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery. USA: Saunders Company. 1997, p.382,384-385.
41. MATTIOLI-BELMONTE, M.; MENGUCCI, P.; SPECCHIA, N. et al. An experimental study in X-ray spectroscopy of the zirconium (Ca-PSZ)- bone interface. Microanalytic evaluation of the osteogenetic response. *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, v.8, p.85-90, 1997.

42. MOLINA, F.M. Efecto del plasma rico en factores de crecimiento (PRFC) en la regeneración en tejidos blandos y tejido óseo. Estudio experimental en conejos albinos de nueva zelandia, Tese doutoral. Escola de Medicina e Odontologia - Universidade de Murcia, 2008.
43. MOLIST, P. Técnicas histológicas, recursos de internet, atlas de histología vegetal y animal, León España, Facultad de Biología-Universidad de Vigo, 2008.
44. MUSCHLER, G.F.; MIDURA, R.J. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Rel Res.*, v.395, p.66-80, 2002.
45. NORRIS, S.A.; PETTIFOR, J.M.; GRAY D.A. et al. Calcium Metabolism and Bone Mass in Female Rabbits During Skeletal Maturation: Effects of Dietary Calcium Intake. *Bone.* v.29, n.1, p.62-69. 2001.
46. OCHANDIANO C.S. Relleno de cavidades óseas en cirugía maxilofacial con materiales aloplásticos. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac.*, v. 29, n. 1, 2007 .
47. OLSSON, D.C.; PIPPI, N.L.; TOGNOLI, G.K.; RAISER, A.G. Comportamento biológico de matriz scaffold acrescida de células progenitoras na reparacão óssea. *Ciência Rural*, v.38, n.8, p. 2403-2412, 2008.
48. PATARO, A.L. Avaliação biológica de compósitos de polímeros biodegradáveis em uma matriz de biocerâmica com adição de tetraciclina. 2005. Dissertação (Mestrado em clinica odontológica)-Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
49. PERCY, D.H.; BARTHOLD, S.W. Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits. 3ed. USA: Blackwell Publishing. 2007. p.298,300.
50. PIERMATTEI, D.L., FLO, G.L. Handbook of small animal orthopedics and fracture treatment. 3.ed. Philadelphia : Saunders, 1997, p.516-580.
51. PILLIAR, R.M.; FILIAGGI, M.J.; WELLS, J.D. et al. Porous calcium phosphates scaffolds for bone substitute applications – in vitro characterization. *Biomaterials*, v. 22, p. 963-972, 2001.
52. QUESENBERRY, K; CARPENTER, J.W. Ferrets, Rabbits and Rodents - Clinical Medicine and Surgery 2nd Edition. St. Louis, Missouri: Saunders, 2004, 441-442p.
53. RICHARDSON, V.C.G. Anesthesia and Surgery. c.16, In: _____ . Rabbits: health, husbandry and diseases. Oxford: Blackwell Science Ltd. 2000
54. RICH, G.A. Rabbit Orthopedic Surgery. Veterinary Clinics. *North America: Exotic Animal Practice.* v.5, n.1, p.157-168. 2002.
55. RUMPEL, E.; WOLF, E.; KAUSCHKE, E.; BIENENGRBER, V.; BAYERLEIN, T.; GEDRANGE, T.; PROFF, P. The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo, *Folia Morphology.*, v. 65, n. 1, p. 43-48, 2006.

56. SÁ, M. J. C. Avaliação do compósito zircônia-hidroxiapatita no tecido ósseo e muscular de cão (*Canis familiaris*) Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico. 2005. Tese Doutoral, Departamento de Medicina Veterinária- Escola de veterinária da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte.
57. SAFDAR, N; KHAN, F; CAMMISA, H. JR.; SANDHU, S; ASHISH, D. et al. The biology of bone grafting. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, v.13, p.77-86, 2005.
58. SERRA E SILVA, F.; ALBERGARIA-BARBOSA, J. R. & MAZZONETTO, R. Clinical evaluation of association of bovine organic osseous matrix and bovine bone morphogenetic protein versus autogenous bone graft in sinus floor augmentation. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.64, p.931-5, 2006.
59. SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater.*, v.15, p.53-76, 2008.
60. SOLERI, J.J. El tejido Óseo en implantodoncia (I). *Rev Esp Odont Implant.*, v. 3, p.3-10, 1995.
61. VOLKMER, T.M. Obtenção e caracterização de hidroxiapatita porosa pelo método GELCASTING de espumas para uso como implantes. 2006. Disertação (mestrado em engenharia) - Escola de engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
62. RICHARDSON, V.C.G. Anesthesia and Surgery. c.16, In: _____. Rabbits: health, husbandry and diseases. Oxford: Blackwell Science Ltd. 2000. p.151-157.
63. ROCH HI. Bone anatomy and cell biology. *J Clin Invest*, v.97, n.1, p. 14-21, 2000.
64. URIST, M.R. (editor). Bone transplants and implants. In: Fundamental and clinical bone physiology. Philadelphia: J.B Lippincott, 1980. P. 361-368.
65. WILLIAMS, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. v. 29, n.20, p. 2941-2953, 2008.
66. YUEHUEI H.; FRIEDMAN, R.J.: Animal models in orthopaedic research, USA: CRC Press, 1999, p.208, 217.
67. ZABEU, J.L.; MERCADANTE, M.T. Substitutos ósseos comparados ao enxerto ósseo autólogo em cirurgia ortopédica- Revisão sistêmica da literatura. *Rev. Bras. Ortop.*, v. 43, n. 3, p. 59-68, 2008.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 263/2011**, relativo ao projeto intitulado "***Biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturado micro-macro porosa de absorção rápida em grânulos como alternativa ao enxerto ósseo no preenchimento de defeito crítico em radio de coelhos (Oryctolagus Cuniculus)***", que tem como responsável(is) **Cleuza Maria de Faria Rezende**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **14/ 03/2012**.

Este certificado expira-se em **14/ 03/ 2017**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 263/2011**, related to the project entitled "***Bioceramics of calcium phosphate nano-structured micro-macroporous fast absorbing granules as an alternative to bone graft to fill a critical defect in rabbits radius (Oryctolagus Cuniculus)***", under the supervisors of **Cleuza Maria de Faria Rezende**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 14, 2012**.

This certificate expires in **March 14, 2017**.

Belo Horizonte, 16 de Março de 2012.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br