

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS-PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Avaliação de diferentes fosfatos de cálcio na regeneração do tecido ósseo em defeito provocado na metáfise femoral de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).  
Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico

Clécio Henrique Limeira

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS-PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Avaliação de diferentes fosfatos de cálcio na regeneração do tecido ósseo em defeito provocado na metáfise femoral de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).  
Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico

Clécio Henrique Limeira  
Graduando

Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá  
Orientador

Patos  
Setembro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS-PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CLÉCIO HENRIQUE LIMEIRA  
**Graduando**

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

ENTREGUE EM \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ MÉDIA: \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá

\_\_\_\_\_  
Nota

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Pedro Isidro da Nóbrega Neto

\_\_\_\_\_  
Nota

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

\_\_\_\_\_  
Nota

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS-PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CLÉCIO HENRIQUE LIMEIRA  
**Graduando**

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

APROVADO EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

EXAMINADORES:

Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá

Dr. Pedro Isidro da Nóbrega Neto

Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

*DEDICATÓRIA*

*A MINHA FAMÍLIA.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a deus por ter me dado o dom da vida e ter me ensinado como conviver bem com todos que me cercam.

Aos meus pais, José Limeira e Maria de Fátima, que sempre confiaram em mim e ensinaram-me a ser uma pessoa honesta, de caráter e humilde, tendo sempre eles como os melhores exemplos do mundo.

Aos meus irmãos André e Antônio José, minhas irmãs Roberta, Cleciane e Késsia, que sempre me apoiaram e me ajudaram durante toda minha caminhada.

Aos meus sobrinhos, Maria Vitória, Gabriel e Vinícius que vêm enchendo minha vida de alegria e mostrando que a vida é uma verdadeira brincadeira.

Aos meus tios, tias, primos e primas e todos os familiares que me apoiaram e sempre tiveram muita confiança em mim.

A minha namorada, Manoella, que me ajudou muito para que eu conseguisse concluir o curso e tem dedicado boa parte do seu tempo para me ouvir e me dar conselhos, aos seus pais, Manoel e Maria José e seu irmão Gabriel, que sempre me trataram muito bem e me ajudaram nas horas que precisei.

Aos meus amigos George Lacerda (cabeção), Flávio (sem pescoço) e Augusto Daniel - in memória -, pelos bons momentos que tivemos de convivência e com quem eu pude contar muitas vezes nas horas difíceis.

Aos meus colegas e amigos Murilo, Azevedo, João Pordeus, Iácome, Ticiano, Kléber, Evaristo, Rodrigo, e a todos os meus colegas de turma, com quem compartilhei os últimos cinco anos de minha vida, aprendendo e compreendendo como é viver e trabalhar em grupo e como construir novas amizades.

Aos meus professores, que gastaram boa parte do seu tempo dentro de uma sala de aula para me ensinarem tudo que eu sei hoje sobre a medicina veterinária, em especial ao professor Marcelo Sá, que me deu a oportunidade de ser bolsista de iniciação científica e me orientou durante a elaboração desse trabalho de conclusão de curso.

A Adilio Azevedo e Paulo Vinicius, pela enorme contribuição na elaboração e execução do projeto que deu origem esse trabalho de conclusão de curso e a todos que contribuíram nesse projeto.

O meu muito obrigado a todos.

## SUMÁRIO

	<b>Pag.</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>07</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>08</b>
<b>RESUMO</b>	<b>09</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Definição e origem dos biomateriais.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2. Uso dos biomateriais.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Classificação.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4. Características dos biomateriais.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Animais.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Preparação do material de implante.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3. Procedimento cirúrgico.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Avaliação clínico-cirúrgica.....</b>	<b>18</b>
<b>3.5. Avaliação radiológica.....</b>	<b>18</b>
<b>3.6. Avaliação histológica.....</b>	<b>18</b>
<b>3.7. Análise estatística.....</b>	<b>19</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Avaliação clínico-cirúrgica.....</b>	<b>20</b>
<b>4.2. Avaliação radiológica.....</b>	<b>20</b>
<b>4.3. Avaliação histológica.....</b>	<b>21</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>26</b>

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1:</b> Classificação das biocerâmicas.....	<b>13</b>
<b>Tabela 2:</b> Escala gradual quanto ao grau de radiopacidade da cicatriz óssea.....	<b>18</b>
<b>Tabela 3:</b> Resultados da avaliação histológica dos animais do grupo de 30 dias.....	<b>22</b>
<b>Tabela 4:</b> Resultados da avaliação histológica dos animais do grupo de 60 dias.....	<b>23</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1:</b> Gaiolas individuais onde os animais foram alojados .....	<b>15</b>
<b>Figura 2:</b> Incisão cutânea ao longo da margem crâniolateral da diáfise femoral e exposição da metáfise femoral .....	<b>17</b>
<b>Figura 3:</b> Orifício de 2 mm de diâmetro produzido na metáfise femoral distal e orifícios distal e proximal após a introdução dos implantes .....	<b>17</b>
<b>Figura 4:</b> Implantes proximal e distal e imersão dos fragmentos em formol a 10% .....	<b>19</b>
<b>Figura 5:</b> Ferida cirúrgica 10 dias após a cirurgia .....	<b>21</b>
<b>Figura 6:</b> Radiografias nas projeções craniolateral (CL) e craniocaudal (CC) do fêmur .....	<b>21</b>
<b>Figura 7:</b> Lâminas histológicas coradas pela Hematoxilina-Eosina (H.E), em objetiva de 40X .....	<b>24</b>

## RESUMO

**LIMEIRA, CLÉCIO HENRIQUE.** Avaliação de diferentes proporções de cálcio e fósforo na regeneração do tecido ósseo em defeito provocado na metáfise femoral de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico. Patos, UFCG. 2009. 20p. (Trabalho de Conclusão do Curso de Medicina Veterinária)

O experimento foi desenvolvido nas dependências do Hospital Veterinário da UFCG, campus de Patos. Foram utilizados 20 coelhos, de ambos os sexos, SRD, pesando em média 2,5 kg, provenientes de um criatório situado na cidade de Patos – PB. Os animais foram divididos ao acaso em dois grupos de 10 animais de acordo com o período em que foram eutanasiados (30 ou 60 dias após o procedimento cirúrgico), para avaliação comparativa entre quatro enxertos de fosfatos de cálcio com diferentes relações Ca/P. Foram utilizados quatro implantes em cada animal, dois em cada fêmur, situados nas metáfises proximal e distal. Na metáfise proximal do membro pélvico esquerdo utilizou-se o implante CPP700, na metáfise distal do membro pélvico esquerdo utilizou-se CPP900, na metáfise proximal do membro pélvico direito utilizou-se TCP/HA e na metáfise distal do membro pélvico direito utilizou-se HA, em cada animal. Após a introdução dos implantes, foi realizada a sutura da musculatura, subcutâneo e pele. Os animais apresentaram evolução clínica normal, sem sinais de infecção, complicação, ou deiscência da ferida, ocorrendo cicatrização por primeira intenção em todas as feridas cirúrgicas. Não houve diferença estatística na avaliação radiográfica em relação à cicatrização induzida pelos biomateriais entre os grupos, porém pode-se observar uma tendência de indução cicatricial óssea nos animais do grupo 60 dias que utilizaram os implantes TCP/HA e HA. Na avaliação histológica, os materiais TCP/HA e HA proporcionaram maior estimulação da cicatrização óssea tanto no grupo 30 dias como no de 60 dias, sendo mais evidente neste último. Os resultados obtidos neste experimento permitem concluir que os biomateriais utilizados mostraram-se biocompatíveis e os implantes TPC/HA e HA proporcionaram indução na cicatrização óssea mais rápida que os demais implantes.

**Palavras-chave:** biomateriais, cicatrização óssea, cirurgia.

## ABSTRACT

**LIMEIRA, CLÉCIO HENRIQUE.** Evaluation of different proportions of calcium and phosphorus in the regeneration of bone in fabric defect caused in femoral metaphysis of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Clinical-surgical study, radiological and histological study. Patos, UFCG. 2009. 20p. (Final Project for Graduation in Veterinary Medicine)

The experiment was developed in the Veterinary Hospital of UFCG, campus of Patos, PB. Twenty rabbits of both sexes, weighing on average 2,5 kg, were purchased from a creation situated in the city of Patos – PB. The animals were divided randomly in two groups of 10 animals in accordance with period that they were euthanized (30 or 60 days after the surgical procedure). For comparative evaluation among them, four types of biomaterials graft with different preparations of Ca/P have been used. Four implants, two in each femur, were used in each animal. The implants were situated in proximal and distal metaphysis. In proximal metaphysis of the left pelvic member the CPP700 implant was used, in distal metaphysis of the left pelvic member a CPP900 implant was used, in proximal metaphysis of the right pelvic member TCP/HA implant was used, and in distal metaphysis of the right pelvic member HA was used, in each animal. After the introduction of the implants, the suture of the muscle, subcutaneous tissue and skin was carried out. The animals presented normal clinical evolution, without signs of infection, complication, or dehiscence of the wound and all surgical wounds had first intention healing. It did not have statistical difference in the radiographic evaluation in relation to the healing induction of influenced by the biomaterials between groups, however, it could be observed a trend of bone healing induction in the animals of group 60 days that have been used TCP/HA and HA implants. Histological evaluation has shown that TCP/HA and HA materials had, in such a way, provided a greater stimulation of bone healing in group 30 days and in the one of 60 days, although in the group 60 days the healing was more evident. The results gotten in this experiment allow to conclude that the biomaterials used revealed biocompatible and TCP/HA and HA implants provided induction in the bone healing faster than the others implants.

**Keywords:** biomaterials, bone healing, surgery.

## 1. INTRODUÇÃO

Os avanços na tecnologia da área médica e da engenharia de materiais têm levado pesquisadores de todo mundo a uma busca intensa por materiais que possam substituir de forma semelhante os sistemas biológicos, devolvendo a funcionabilidade dos órgãos sem causar rejeição no corpo dos pacientes. A descoberta dos biomateriais revolucionou tanto a medicina humana (ortopedia e odontologia) como a medicina veterinária, através do seu uso como implantes odontológicos, recobrando implantes metálicos ou como substitutos ósseos.

Com a geração das cerâmicas avançadas houve uma revolução no uso de cerâmicas projetadas especialmente para reparar, reconstruir e substituir porções ósseas acometidas por alguma patologia ou traumatismos diversos. As cerâmicas utilizadas com este propósito são chamadas de biocerâmicas, as principais são: alumina, zircônia, hidroxiapatita, fosfatos de cálcio, alguns silicatos que constituem os biovidros, e algumas cerâmicas covalentes. Atualmente, mais de 25% dos implantes realizados na área da ortopedia são produzidos utilizando material cerâmico (RIBEIRO, 2008)

Diversos tipos de biocerâmicas, especialmente as biocerâmicas de fosfato de cálcio, continuam sendo pesquisadas e cada vez mais são utilizados em procedimentos para a reconstrução e recomposição tecidual, devido às suas características e propriedades, principalmente biocompatibilidade, osteocondução e ainda pela sua semelhança estrutural, química e física com a matriz mineral óssea.

Os principais desafios encontrados nas clínicas veterinárias estão relacionados aos problemas ortopédicos, como traumatismos e neoplasias ósseas, e mesmo com as pesquisas que estão sendo desenvolvidas, atualmente ainda existem dúvidas com relação à utilização de biomateriais, o que muitas vezes pode levar o cirurgião ortopedista a obter resultados poucos significativos ou indesejáveis quando os mesmos são utilizados.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de fosfatos de cálcio quando utilizada na correção de defeitos ósseos na metafise femoral de coelhos, através da observação clínica e radiográfica do processo de reparação óssea e dos aspectos histológicos na interface entre o tecido ósseo e os implantes, 30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Definição e origem dos biomateriais**

Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas de 1982, entende-se por biomaterial “toda substância (com exceção de fármacos) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais” (MIRTCHI et al., 1989).

A utilização de cerâmicas como biomateriais remonta a 1894, quando Dreesman relatou o uso de gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ ) como um possível substituto para ossos. Este material apresenta uma resistência mecânica muito baixa e é completamente reabsorvido pelo organismo, resultando em uma rápida fragmentação e degradação. Tais propriedades pouco atrativas praticamente excluíram a utilização do gesso como biocerâmica implantável (KAWACHI, 2000).

O cientista e engenheiro Hench, da Universidade da Flórida, iniciou um trabalho com verba do exército americano em setembro de 1969 e dois meses depois apresentou um vidro que se soldava tão bem aos ossos e tecidos de ratos, que os pesquisadores não conseguiam separá-los. Surgia uma nova classe de materiais médicos, também conhecidos como biomateriais: a biocerâmica. Esta categoria inclui todos os tipos de cerâmicas implantados no corpo humano (AZEVEDO et al., 2008).

### **2.2. Uso dos biomateriais**

A utilização dos substitutos ósseos sintéticos é justificada em defeitos causados por traumatismos, processos infecciosos, neoplasias ósseas, união-retardada ou não-uniões nas quais seja necessária uma remodelação e reconstrução desses defeitos (MORAES et al., 2004), ou em artrodeses onde se queira proporcionar imobilizações de articulações com o mínimo de desconforto para os pacientes (DÓRIA NETO, 2007) e onde o uso de enxertos autógenos e alógenos seja inviável devido a problemas como disponibilidade limitada, dificuldade de armazenamento e um tempo cirúrgico maior dos enxertos orgânicos (BORGES, 2000). Estas cerâmicas também podem ser aplicadas em sistemas de liberação controlada de fármacos em sítios doentes, potencializando sua ação local e minimizando os

efeitos indesejados de intoxicação da parte sadia não comprometida (UCHUDA et al., 1992).

### 2.3. Classificação

Os materiais cerâmicos empregados na confecção de implantes podem ser divididos, de acordo com sua reatividade química, em três categorias: os inertes, os com superfície reativa e os reabsorvíveis, sendo que os fosfatos de cálcio podem se comportar tanto como cerâmica de superfície ativa como serem totalmente reabsorvidos (MARIOLANI, 1991). A tabela abaixo mostra o resumo da classificação das biocerâmicas e alguns exemplos.

Tabela 1: Classificação das biocerâmicas.

<b>TIPO DE BIOCERÂMICA</b>	<b>INTERAÇÃO COM OS TECIDOS</b>	<b>EXEMPLOS</b>
Inertes	Não há interações químicas nem biológicas	Alumina
Porosas	Ocorre crescimento interno dos tecidos através dos poros	Aluminatos e hidroxiapatita porosos
Bioativas	Ocorre uma forte ligação na interface osso-implante	Biovidros, hidroxiapatita
Reabsorvíveis	São degradadas e substituídas pelos tecidos	Gesso e fosfato tricálcio

Fonte: KAWACHI et al., 2000.

### 2.4. Características dos fosfatos de cálcio

No decorrer dos últimos anos, constatou-se que as cerâmicas microporosas destacam-se em aplicações de substituição e regeneração de tecidos ósseos, principalmente as cerâmicas formadas pela composição Ca/P, os fosfatos de cálcio (KARVAT et al., 2005), sendo esse grupo de biomateriais o que mais se assemelha à composição do osso (LEGEROS, 2002), apresentando-se como materiais biocompatíveis e bioativos (CORSETTI, 2005). Algumas desvantagens no uso dessas cerâmicas incluem baixa resistência à tração, à compressão, baixa elasticidade e alta densidade (KAWACHI et al.,

2000), ficando seu uso limitado a locais onde não seja exigida respostas de esforços mecânicos (VAZ, 2007).

Esses biomateriais devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos dos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos, caracterizando a biocompatibilidade (KAWACHI et al., 2000). Já bioativos são os materiais que em função de sua similaridade química com a parte mineral do tecido ósseo, ligam-se a ele, permitindo a osteocondução (CORSETTI, 2005), ou seja, com capacidade de fazer com que o crescimento ósseo ocorra sobre a superfície e através dos poros do material (KARVAT et al., 2005), servindo como arcabouço passivo sobre o qual células osteoprogenitoras podem produzir novo osso (DÓRIA NETO, 2007).

A resposta do tecido ósseo ocorre pelo revestimento do material por uma camada microscópica de apatita biológica com osteoblastos diferenciados, depositando na superfície do implante uma camada de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de substância amorfa, a qual se calcifica como cristais de osso mineralizado em forma de placas (BARTH et al., 1988).

Miranda et al. (2005) em estudo comparativo usando enxerto inorgânico constituído por trifosfato de cálcio e hidroxiapatita sintética e enxerto orgânico retirado da asa ilíaca de coelhos, concluíram que o enxerto sintético estimula precocemente o início do processo de reparação óssea em coelhos quando comparados ao orgânico e os achados radiográficos e histológicos mostram melhor evolução na formação do calo ósseo com o uso de enxerto inorgânico.

Já Moraes (2004) concluiu também que cimento à base de fosfato de cálcio utilizado em seu experimento não provocou reações inflamatórias no local de contato com o tecido ósseo, sendo biocompatível.

Vital et al. (2006) avaliaram a eficiência da hidroxiapatita sintética associada apenas ao carbono e associada ao carbono e ao fosfato biácido de sódio no preenchimento de defeito ósseo na ulna de coelhos e concluíram que ambos os tipos de hidroxiapatitas usadas mostraram-se biocompatíveis, por não ter havido, em nenhum dos animais, qualquer indício de rejeição do implante ou de reação inflamatória. Nos animais tratados, o processo de regeneração óssea ocorreu mais cedo do que nos animais do grupo controle, o que comprova a capacidade osteocondutora da hidroxiapatita.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

O presente estudo foi desenvolvido nas dependências do Hospital Veterinário da UFCG, campus de Patos. Foram utilizados 20 coelhos, de ambos os sexos, SRD, pesando em média 2,5 kg, provenientes de um criatório situado na cidade de Patos – PB. Os animais foram divididos ao acaso em dois grupos de 10 animais de acordo com o período em que foram eutanasiados (30 ou 60 dias após o procedimento cirúrgico), para avaliação comparativa entre quatro enxertos de fosfatos de cálcio com relações diferentes de Ca/P. Os animais foram colocados em gaiolas individuais (figura 1) e passaram por um período de adaptação de sete dias antes do início do experimento, recebendo ração balanceada duas vezes ao dia e água potável *ad libitum* durante todo o experimento.



Figura 1: Fotografia mostrando as gaiolas individuais onde os animais foram alojados.

#### 3.2. Preparação do material de implante

Para a obtenção dos pós de fosfato de cálcio foi realizada uma reação de neutralização entre as soluções de ácido fosfórico [ $\text{H}_3\text{PO}_4$ ] e hidróxido de cálcio [ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ]. As quantidades das soluções foram estequiometricamente determinadas de acordo com os valores das relações atômicas entre os átomos de cálcio e fósforo - Ca/P.

Neste estudo foram utilizados quatro fosfatos de cálcio: o Pirofosfato de Cálcio de razão 1.0 com tratamento térmico a 700°C (CPP700), Pirofosfato de Cálcio de razão 1.0 com tratamento térmico a 900°C (CPP900), Fosfato Tricálcio de razão 1.5 associado à Hidroxiapatita de razão 1.67 (TCP/HA) e Hidroxiapatita de razão 1.67 (HA). A solução ácida foi adicionada com controle de vazão à solução básica previamente aquecida à temperatura de +/- 80°C, sob agitação constante. Após a completa adição o produto obtido ficou sob agitação à temperatura de 100°C até a evaporação da água. Em seguida, o produto foi seco em estufa a 110°C por 24 horas e sintetizado em temperaturas variadas de acordo com as fases dos fosfatos de cálcio desejadas.

### **3.3. Procedimento cirúrgico**

Foram utilizados quatro implantes em cada animal, dois em cada fêmur, situados nas metáfises proximal e distal. No pré-operatório cada animal foi submetido a jejum sólido por 12 horas e líquido por 06 horas. A tricotomia foi realizada com tosador elétrico na área compreendida desde a região dorso-lombar até o calcâneo. A medicação pré-anestésica utilizada foi Acepromazina (1 mg/kg, via intravenosa - IV) e para indução anestésica utilizou-se anestesia dissociativa com a associação Zolazepan + Tiletamina (15 mg/kg, IV) e se necessário, para a manutenção, fazia-se re-administração de 1/3 da dose de indução. A antisepsia da área operatória foi realizada com solução de Clorexidina a 0,5%. Após a delimitação da área operatória com panos de campo, foi efetuada uma incisão cutânea ao longo da margem craniolateral da diáfise femoral desde o trocanter maior até a crista troclear lateral (figura 2A), a gordura subcutânea e fáscia superficial foram seccionadas abaixo da incisão cutânea e a fáscia lata seccionada ao longo da margem cranial da aponeurose do músculo bíceps femoral. Em seguida, a retração caudal do bíceps e afastamento cranial do músculo vasto lateral revelou a metáfise femoral (figura 2B). O músculo adutor da coxa foi rebatido na região subperiosteal para propiciar maior exposição do aspecto caudal do osso.

Foi feita ressecção longitudinal do perióstio e dois orifícios construídos, um na metáfise proximal e outro na distal (figura 3A) com trefina de 2,0 mm de diâmetro em cada membro pélvico. Durante a penetração da trefina no osso usou-se solução fisiológica para minimizar aquecimento ósseo e consequente osteólise. Após a confecção de cada orifício, foram colocados os implantes previamente esterilizados, distribuídos da seguinte maneira: na metáfise proximal do membro pélvico esquerdo utilizou-se o implante CPP700, na

metáfise distal do membro pélvico esquerdo utilizou-se CPP900, na metáfise proximal do membro pélvico direito utilizou-se TCP/HA e na metáfise distal do membro pélvico direito utilizou-se HA, em cada animal. Após a introdução dos implantes, o perióstio e o músculo tensor da fáscia lata foram suturados com categut cromado 3-0 em plano contínuo. A redução de espaço morto foi feita com sutura em zigue-zague com categut cromado 3-0 e a pele foi unida com mononailon 3-0 empregando-se sutura simples contínua.

No período pós-operatório os animais receberam Enrofloxacin na dose de 10 mg/kg, via intramuscular (IM) uma vez ao dia durante 5 dias e Meloxicam na dose de 0,2 mg/kg no primeiro dia (fármaco administrado 30 minutos antes do procedimento cirúrgico) e 0,1 mg/kg nos dois dias subsequentes, IM. A limpeza da ferida cirúrgica foi realizada com solução fisiológica 0,9% e Rifamicina spray durante os 10 primeiros dias pós-operatório, tendo sido retirado os pontos após esse período.



Figura 2: Fotografia mostrando incisão cutânea ao longo da margem craniolateral da diáfise femoral (A) e exposição da metáfise femoral (B).

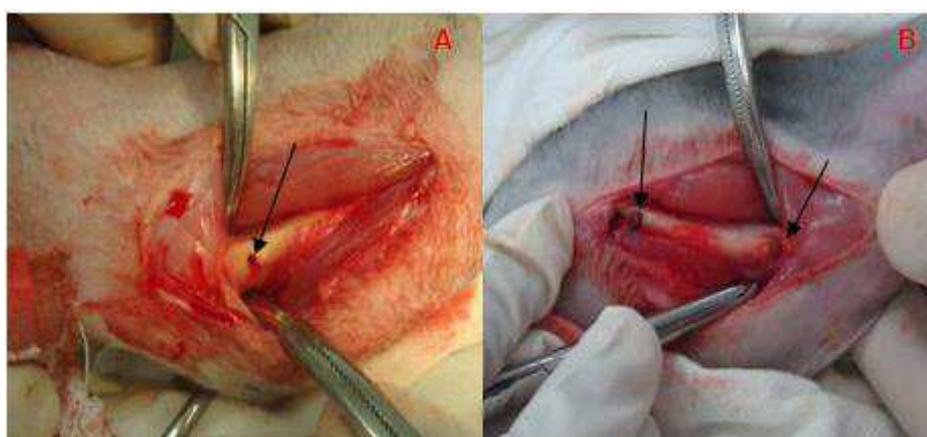


Figura 3: Fotografia mostrando orifício de 2 mm de diâmetro produzido na metáfise femoral distal (A) e orifícios distal e proximal (B) após a introdução dos implantes (setas).

### 3.4. Avaliação clínico-cirúrgica

O processo de avaliação clínica das feridas cirúrgicas foi diário durante os 10 primeiros dias de pós-operatório, observando-se presença de reação inflamatória e infecciosa, dor e deiscência da sutura.

### 3.5. Avaliação radiológica

Foram realizadas radiografias nas projeções craniocaudal (CC) e mediolateral (ML) dos membros operados, antes e imediatamente após a cirurgia, com 30 e 60 dias de pós-operatório, visando acompanhar o processo de reparação óssea. Para a avaliação radiográfica foi proposta uma escala gradual de radiopacidade exemplificada na tabela 2. Essa avaliação foi realizada por três veterinários experientes em exames radiográficos, os quais não tinham conhecimento de qual implante teria sido utilizado em cada defeito ósseo, tendo sido obtido a média dos valores atribuídos para cada orifício avaliado, conduta essa tomada para isentar a avaliação de tendências e erros.

Tabela 2: Escala gradual quanto ao grau de radiopacidade da cicatriz óssea

<b>Graus de radiopacidade</b>	<b>Quantidade de cruces recebidas</b>
Radiopacidade intensa	+++
Radiopacidade moderada	++
Radiopacidade leve	+
Ausência de Radiopacidade	Sem cruz

### 3.6. Avaliação histológica

Os animais foram eutanasiados ao final do período de observação destinado a cada grupo (30 dias ou 60 dias após a cirurgia).

Foram colhidos os fêmures (figura 4A) e em seguida retirados os fragmentos do tecido ósseo que continham os implantes, realizando-se um corte transversal com 2 cm de extensão, de modo que foi colhido 1 cm de osso proximal e distal em relação aos implantes e foram submetidos a fixação com formalina tamponada a 10% durante 10 dias (figura 4B). Logo após o material foi lavado em água corrente e descalcificado em mistura de partes iguais de solução de ácido fórmico 5% + ácido clorídrico 5% durante cinco dias. Terminada a descalcificação os fragmentos foram enviados ao laboratório de Histopatologia Veterinária, no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina

Grande (UFMG), Campus de Patos. No laboratório os fragmentos foram incluídos em parafina líquida previamente colocada em moldes de papel de forma cúbica. Posteriormente foram cortadas fatias transversais de 5  $\mu\text{m}$  de espessura dos blocos e montados em lâminas de vidro. De cada bloco foram obtidas quatro lâminas que foram submetidas à técnica de hematoxilina-eosina e em seguida observado o padrão de regeneração tecidual com base nos graus de atividade do endósteo e periósteo, atividades osteoblástica e osteoclástica, presença de tecido conjuntivo e neoformação óssea. A regeneração óssea foi caracterizada, segundo a escala atribuída pelos patologistas, que não sabiam a qual tratamento pertencia cada lâmina em discreta, discreta-moderada, moderada, moderada-acentuada e acentuada.



Figura 4: Fotografia mostrando o fêmur (A) após coleta, onde observa-se o implante proximal e o distal (setas) e os quatro fragmentos de cada animal, dois de cada fêmur, imersos em formol a 10% (B).

### 3.7. Análise estatística

A comparação da cicatrização óssea induzida pelos fosfatos de cálcio foi realizada por momento experimental e entre os vários momentos. Inicialmente foi realizado o teste de normalidade de Anderson-Darling para a verificação da distribuição dos dados. Para variáveis com distribuição normal, os grupos foram comparados pela análise de variância (ANOVA) de um critério de classificação, com comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Para variáveis com distribuição não normal, a comparação foi realizada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com comparações múltiplas pelo teste de Nemenyi (ZAR, 1999). O nível de significância adotado foi de 5% e as análises foram feitas com o programa estatístico MINITAB versão 14.0.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Avaliação clínico-cirúrgica**

O período trans-operatório transcorreu normalmente, sem maiores complicações e sem a necessidade do uso de doses complementares de anestésicos, demonstrando a eficiência do protocolo anestésico usado neste experimento. Todos os animais apoiaram os membros operados de imediato, logo que se recuperaram do efeito anestésico e não apresentaram nenhum grau de claudicação, provavelmente devido ao pequeno tamanho da lesão óssea provocada e ao uso da analgesia preemptiva. Resultados similares foram relatados por Borges (1998) e Rezende (1998).

Os animais apresentaram evolução clínica normal, não se observando quaisquer sinais de infecção, complicação, ou deiscência da ferida, ocorrendo cicatrização por primeira intenção em todas feridas cirúrgicas, justificada pela rigorosa assepsia e técnica cirúrgica adequada durante todo o procedimento, em conjunto com uma antibioticoterapia adequada e uso de antiinflamatório para um adequado manejo da dor, concordando com os resultados relatados por Freitas et al (2008). Nenhum animal apresentou sinais de rejeição aos enxertos, comprovando a característica de biocompatibilidade dos fosfatos de cálcio, descrita na literatura (MORAES, 2004; VITAL et al, 2006).

Cinco animais apresentaram edema leve e sensibilidade dolorosa durante os três primeiros dias pós-operatórios, sendo que dois destes animais apresentaram apenas em um dos membros operados, regredindo a partir do quarto dia e não mais aparente no 10º dia pós-cirúrgico, quando os pontos de sutura foram retirados e a ferida cirúrgica estava totalmente cicatrizada (figura 5), resultados que podem ser considerados normais devido à manipulação cirúrgica dos tecidos moles. Esses achados são similares aos encontrados por Duarte et al. (2007).

### **4.2. Avaliação radiológica**

Não houve diferença estatística em relação à indução de cicatrização induzida pelos biomateriais quanto ao grau de radiopacidade avaliada entre os grupos 30 e 60 dias nem entre os momentos, porém pode-se observar uma tendência de maior grau de radiopacidade nos animais do grupo 60 dias nos orifícios que utilizaram os implantes TCP/HA e HA com média de indução de cicatrização óssea maior que os demais implantes (figura 6). Resultado semelhante foi encontrado por Vital et al. (2006).

Moraes et al. (2004) observaram em seu estudo que a reabsorção do enxerto é gradativa e com isso o processo de cicatrização óssea pode progredir por até 180 dias, estando assim explicado a ausência de diferença radiográfica em relação à cicatrização óssea no presente experimento.



Figura 5: Fotografia mostrando a ferida cirúrgica 10 dias pós cirúrgico totalmente cicatrizada e sem indícios de infecções ou rejeição aos biomateriais.



Figura 6: Fotografia das radiografias nas projeções craniolateral (CL) e craniocaudal (CC) mostrando os orifícios (setas), produzidos logo após a cirurgia (A), 30 dias pós-cirúrgicos (B) e 60 dias pós-cirúrgicos (C).

#### 4.3. Avaliação histológica

Os exames histológicos realizados neste estudo possibilitaram analisar os efeitos os induzidos pelos biomateriais em relação à cicatrização óssea e aos eventos celulares.

Foi observado nos animais do grupo 30 dias, na interface osso-implante atividade moderada do endósteo e periósteo, atividade osteoblástica discreta e moderada atividade osteoclástica nos animais que receberam CPP700 e CPP900. Já os animais que receberam TCP/HA e HA essa atividade foi moderada-acentuada. Observou-se presença moderada-acentuada de tecido conjuntivo e neoformação óssea em apenas alguns animais que receberam o biomaterial HA (Tabela 3).

No grupo 60 dias observou-se na interface osso-implante atividade endosteal e periosteal acentuada com exceção do implante CPP700 que apresentou discreta reação endosteal e reação periosteal moderada. A atividade osteoblástica e osteoclástica foi acentuada na interface óssea que recebeu o biomaterial TCP/HA e HA e discreta-moderada nos demais implantes, presença moderada-acentuada de osteócitos hipertrofiados, vacuolizados e desorganizados. Observou-se formação óssea primária acentuada na interface óssea que recebeu o implante TCP/HA, moderada-acentuada nos que receberam HA e discreta nos que receberam CPP900, não sendo observado neoformação óssea nos que receberam CPP700 (Tabela 4).

Tabela 3: Resultados da avaliação histológica dos quatro biomateriais, aos 30 dias pós-operatórios.

	<b>Atividade do endósteo</b>	<b>Atividade do periósteo</b>	<b>Atividade Osteoblástica</b>	<b>Atividade Osteoclástica</b>	<b>Neoformação Óssea</b>
<b>CPP700</b>	Moderada	Moderada	Discreta	Moderada	Não observada
<b>CPP900</b>	Moderada	Moderada	Discreta	Moderada	Não observada
<b>TCP/HA</b>	Moderada	Moderada	Moderado-Acentuada	Moderado-Acentuada	Não observada
<b>HA</b>	Moderada	Moderada	Moderado-Acentuada	Moderado-Acentuada	Moderado-Acentuada

Tabela 4: Resultados da avaliação histológica dos quatro biomateriais, aos 60 dias pós-operatórios.

<b>Tratamento</b>	<b>Atividade do endósteo</b>	<b>Atividade do periósteo</b>	<b>Atividade Osteoblástica</b>	<b>Atividade Osteoclástica</b>	<b>Neoformação Óssea</b>
<b>CPP700</b>	Discreta	Moderada	Discreta	Discreta	Não observada
<b>CPP900</b>	Acentuada	Acentuada	Discreta	Discreta	Discreta
<b>TCP/HA</b>	Acentuada	Acentuada	Acentuada	Acentuada	Acentuada
<b>HA</b>	Acentuada	Acentuada	Acentuada	Acentuada	Moderado-Acentuada

Os biomateriais são utilizados nas cirurgias ósseas com o objetivo de reconstrução óssea, e seu desempenho neste quesito depende de alguns fatores como composição e poder osteogênico (TADJOEDIN et al, 1995). A formação óssea depende do contato dos materiais com o periósteo e endósteo (MIRANDA et al., 2005), já que estes participam na nutrição, formação e reparo do tecido ósseo (ROCHA et al., 2008), pois apresentam células osteoprogenitoras que são ativadas durante o processo de regeneração óssea (CORSETTI, 2005). Sendo assim, a atividade do endósteo e do periósteo observada neste estudo (figura 7A) indica a participação destas estruturas no processo de reparo ósseo, sendo essa atividade mais acentuada nos animais do grupo de 60 dias em relação ao de 30 dias. No entanto não se observou diferenças significativas entre os quatros tipos de biomateriais testados, exceto o biomaterial CPP700, que apresentou pouca atividade periosteal (figura 7B), o que é indesejável, já que uma maior atividade do periósteo no processo de reparo ósseo indica que mais células osteoprogenitoras serão ativadas, e mais rápida será a cicatrização óssea.

Dentre as várias células que compõem o tecido ósseo, os osteoclastos e os osteoblastos são as principais. Os osteoclastos são células multinucleadas que participam dos processos de reabsorção e remodelação do tecido ósseo, sendo também as responsáveis pela reabsorção dos biomateriais, e os osteoblastos são responsáveis pela síntese dos constituintes orgânicos da matriz óssea e também armazenam fosfato e cálcio, participando da mineralização da matriz (ROCHA et al., 2008). Neste estudo, os materiais TCP/HA e HA proporcionaram maior estimulação destas células tanto no grupo 30 dias como no de 60 dias, tendo sido no grupo 60 dias esta estimulação mais evidente. Esses resultados são devidos à ação osteocondutiva e da osteotransdutividade desses biomateriais, concordando

com o observado por Dória Neto (2007). Através desses processos (osteocondutividade e osteotransdutividade) os substitutos ósseos são degradados, reabsorvidos e substituídos por tecido ósseo neoformado, conforme observado por Borges et al. (2000).

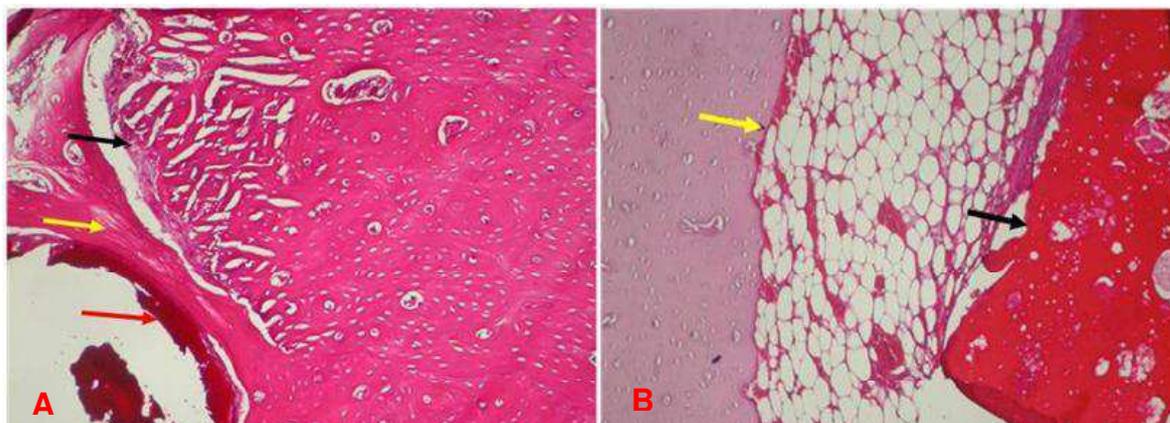


Figura 7: Fotomicrografia mostrando lâminas histológicas coradas pela Hematoxilina-Eosina (H.E) aos 60 dias pós-operatórios, aumento de 40X. Em A, tratamento com TCH/HA, notar atividade endosteal acentuada (seta preta), neoformação óssea primária (seta amarela) e interface osso/implante (seta vermelha). E em B tratamento com CPP700, com pouca atividade endosteal (seta amarela), presença do biomaterial (seta preta) e ausência de neoformação óssea primária.

De acordo com Almeida et al. (2000) o principal obstáculo para uma reparação óssea satisfatória e a neoformação óssea é que a formação de tecido conjuntivo ocorre rapidamente podendo prejudicar ou impedir totalmente a osteogênese. Neste sentido, a presença de tecido conjuntivo observada no grupo de 30 dias pode ter impedido a neoformação óssea precoce, já que nesse mesmo grupo foram observadas células responsáveis pela formação de matriz óssea. Porém alguns animais que receberam HA apresentaram neoformação óssea nesse período, demonstrando mais uma vez a capacidade osteocondutiva desse composto. Já no grupo de 60 dias, a formação óssea primária foi mais acentuada, sendo mais evidente nos implantes de TCP/HA (figura 7A), HA e CPP900, em ordem decrescente e não foi observada no implante com CPP700 (figura 7B). Esse fato pode ser devido à reabsorção lenta desses biomateriais, já que os mesmos precisam ser degradados e reabsorvidos para só então serem substituídos por um novo tecido ósseo.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste experimento permitem concluir que:

1. Os quatro biomateriais utilizados mostraram-se biocompatíveis;
2. Os materiais usados estimularam a reparação do defeito ósseo, com exceção do CPP700;
3. TCP/HA foi o fosfato de cálcio que melhor induziu a neoformação óssea, seguido da HA e por último o CPP900.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.D.; CARVALHO, Y. R.; ROCHA, R. F. et al. Estudo da reparação óssea em mandíbula de ratos. **Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol**, São José dos Campos, v.3, n.1, p.49-53, 2000.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D.C.; COSTA, A. C. F. M. Materiais cerâmicos utilizados para implantes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, n.1, 2008. Disponível em: [www.dema.ufcg.edu.br/revista](http://www.dema.ufcg.edu.br/revista). Acesso em: 22 jun. 2009.

BARTH, E.; RAEMINGEN, H.; SOLLHEIM, L.F. Tissue reactions to ceramics and glass ceramics. **Acta Orthop Scand**. Sweden. v. 59, p. 219-20, 1988.

BORGES, A.P.B. **O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea do defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia de cães. Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodisperção.** Tese (Doutorado), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 1998.112f.

BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B. et al. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.6, p. 616-620, 2000.

CORSETTI, A. **Avaliação do reparo ósseo em fêmures de rato após implante de blocos de fosfato de cálcio e enxerto ósseo autógeno.** Dissertação (Mestrado Clínica Odontológica), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2005. 122f.

DÓRIA NETO, F. A. **Avaliação do cimento de alfa-fosfato tricálcico em artrodeses tarsocrurais experimentais em cães.** Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 2007. 67f.

DUARTE, T. S.; BORGES, A.P.B.; LAVOR, M.S.L. et al. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos clínicos e radiográficos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.1, p.114-118, 2007.

FREITAS, S. H.; DÓRIA, R. G. S.; MENDONÇA, F. S. et al. Aspecto radiológico de heteroenxerto ósseo cortical fragmentado na reparação de falhas ósseas em coelhos. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Niterói, v.15, n.3, p. 107-110, 2008.

KARVAT, F.; CAMARGO, N.H.A.; SOARES, C. et al. Elaboração e caracterização de um biomaterial compósito a partir de uma matriz fosfato de cálcio/ $Al_2O_3-\alpha$  para aplicação como implante e restituição óssea. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 43 – 50, 2005.

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, Campinas, vol.23, n.4, p.518-522, 2000.

LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium Phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.395, p.81-98, 2002.

MARIOLANI, J. R. L. **Metodologia para avaliação da interface biomaterial - tecido ósseo: estudo teórico e experimental**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Centro de Tecnologia, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 1991. 113f.

MIRANDA, E.S.; CARDOSO, F.T.S.; FILHO, J.F.M. et al. Estudo experimental comparativo no uso de enxerto ósseo orgânico e inorgânico no reparo de fraturas cirúrgicas em rádio de coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, vol.13, n.5, p.245-248, 2005.

MIRTCHI, A.A.; LEMAITRE, J.; TERAQ, N. Calcium phosphate cements: study of the B- tricalcium phosphate-monocalcium phosphate system. **Biomaterials**, New York, n.10, p. 475-480, 1989.

MORAES, P. C.; PADILHA FILHO, J. G.; CANOLA, J. C. et al. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. Disponível em: <http://www.scielo.br/acb>. Acesso em: 17 jun. 2009.

REZENDE, C.M.F.; BORGES, A.P.B.; BERNIS, W.O. et al. Aspectos clínico-cirúrgicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães. **Arquivo Brasileira Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.50, p.537-545, 1998.

RIBEIRO, C. **Obtenção e caracterização de biocerâmicas porosas à base de fosfatos de cálcio processadas com a utilização de albumina**. Tese (Doutorado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2008. 160f.

ROCHA, F. S.; RAMOS, L. M. A.; BATISTA, J. D. et al. Análise histológica do reparo ósseo utilizando osso inorgânico associado ao PRP em lesões de calvária de coelhos. Disponível em: [www.horizontecientifico.propp.ufu.br/](http://www.horizontecientifico.propp.ufu.br/). Acesso em: 10 de jul. de 2009.

TADJOEDIN, E. S.; DE LANGE, G.L.; BRONKER, A.L.J.J. et al. Scanning electron microscopy (SEM) and microanalysis (EDS) applied to the study of biomaterial for dental use. **Minerva Stomatol**, vol.44, n.1-2, p.55-68, 1995.

UCHUDA, A.; SHENTO, Y.; ARAKI, N.; ONO, K. Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic. **Journal of orthopedic research**, v. 10, p.440-445, 1992.

VAZ, G. J. O. **Propriedades de biocerâmicas porosas de fosfato de cálcio obtidas com matérias-primas de origem orgânica e sintética**. Dissertação (Mestrado), Rede Temática em Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Ouro Preto, Belo Horizonte, MG. 2007. 92f.

VITAL, C.C.; BORGES, A.P.B.; FONSECA, C.C. et al. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.2, p.175-183, 2006.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 1999. 663 p.