

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

MONOGRAFIA

Utilização da Hidroxiapatita, Quitosana e Células da Medula Óssea na regeneração de defeito provocado na metáfise femoral de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Estudo Clínico-Cirúrgico, Histológico e Morfométrico.

Isabella Maria Lira Tavolaro de Siqueira

2011



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

MONOGRAFIA

Utilização da Hidroxiapatita, Quitosana e Células da Medula Óssea na regeneração de defeito provocado na metáfise femoral de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Estudo Clínico-Cirúrgico, Histológico e Morfométrico.

Isabella Maria Lira Tavolaro de Siqueira
Graduanda

Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá
Orientador

Patos
Novembro 2011

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CSTR /
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CAMPUS DE PATOS

S585u

2011

Siqueira, Isabella Maria Lira Tavolaro de

Utilização da hidroxiapatita, quitosana e célula da medula óssea na regeneração de defeito provocado na metáfise femoral de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Estudo clínico – cirúrgico, histológico e morfométrico./ Isabella Maria Lira Tavolaro de Siqueira. - Patos - PB: UFCG/UAMV, 2011.

35p.: il. Color.

Inclui Bibliografia.

Orientador (a): Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá

(Graduação em Medicina Veterinária). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1- Ortopedia Veterinária 2 – Biomaterial. 3 – Cirurgia 4- Coelho. 5 - Regeneração óssea.

CDU: 617.3:636.92

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

ISABELLA MARIA LIRA TAVOLARO DE SIQUEIRA
Graduanda

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

APROVADA EM/...../.....

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá
Orientador

Nota _____

Prof. Dr. Pedro Isidro da Nóbrega Neto
Co-orientador (Examinador I)

Nota _____

M.V. Msc. Adílio Santos Azevedo
(Examinador II)

Nota _____

M.V. Res. Fabrícia Geovânia Fernandes Filgueira
Suplente

Nota _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Edilene Barbosa de Lira e Cláudio Ernesto Tavolaro de Siqueira (*in memóriam*), que me deram amor e carinho, sempre me apoiaram, me incentivaram a seguir adiante nas adversidades e me ensinaram a respeitar todas as formas de vida.

À minha irmã, Isaura Maria Lira de Siqueira, que sempre esteve ao meu lado nas horas boas e ruins, sempre me entendendo, mesmo sem eu falar nada, confiando e me ajudando a ser sempre alguém melhor.

A todos os animais que passaram pela minha vida e me mostram que atitudes valem mais que palavras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS** por me dar sabedoria para tomar as decisões mais corretas, me ajudar a escolher os melhores caminhos e me ensinar que tudo tem o seu tempo.

Ao meu pai, **Cláudio** (*in memóriam*), que me ensinou a viver sempre tentando aprender ao máximo com as coisas que nos rodeiam, à minha mãe, **Edilene**, por me ensinar que amor e respeito são fundamentais em tudo que se faz. Obrigada aos dois por me darem amor, carinho, me incentivarem, apoiarem, me ensinarem a assumir meus atos, amar e respeitar todas as formas de vida e me ajudarem a ser a pessoa que sou hoje. AMO MUITO OS DOIS.

À minha irmã, **Isaura** (Zozó), por sempre me escutar, me fazer rir, me dar broncas quando necessário, me dar colo, amor e estar presente em todas as minhas conquistas sempre torcendo muito pelo meu sucesso. TE AMO.

À minha avó, **Izaura**, pelo amor que tem por mim, pelas palavras sábias e doces, por sempre fazer coisas gostosas na cozinha, pelos conselhos e história de vida; e a minha avó **Lilia**, que me ensinou a ser forte, a ter garra para superar os obstáculos, tenho muita admiração por vocês e as. AMO MUITO.

À minha madrinha, **Elisa**, e meu padrinho, **Dirceu**, por sempre se mostrarem interessados em saber sobre minha trajetória, me guiarem para esta profissão a qual amo, me incentivaram e apoiaram, sempre com muito amor e carinho. AMO MUITO VOCÊS.

À **Dona Priscila**, por sempre cuidar de mim com tanto carinho e amor, por sempre acreditar que meu sonho ia se tornar realidade. TE AMO.

À minhas Tias, **Helena, Celeste e Cristina**, por sempre se me apoiarem e me ensinarem a ser paciente e correta.

À minha Tia, **Lola**, por sempre me fazer rir, especialmente nos momentos de tristeza, e me dar conselhos; à Tia **Edicélia**, por me fazer acreditar sempre em mim e me ajudar a ser correta em tudo; às Tias **Elza, Edilma, Mirian, Edina, Nila, Paula e Tereza** por verem em mim uma grande profissional.

Aos meus Tios, **Bernardo, Fernando, Jairo, Jorge, Mario, Madiel, Edson, Manoel, Geraldo e Celso**, pelas palavras de incentivo e carinho; em especial ao meu Tio **Bernardo** que mesmo longe sempre esteve presente em minha vida, me ajudando a superar os obstáculos desta caminhada.

Às minhas primas, **Tatá**, por sempre cuidar de mim nas férias, me ensinar equitação e hispismo, por ser sempre paciente e por me ensinar a compreender os animais com amor e dedicação; **Gabi**, por acreditar na minha capacidade e sonhos; **Guta**, por me apoiar ao longo do curso; **Juliana**, que sempre me transmitiu paz, sabedoria e acreditar sempre em um Deus maravilhoso; **Priscila, Larissa, Maria Helena e Cida**, pela força que sempre me deram, obrigada por me fazerem uma parte do que sou hoje.

Aos meus primos: **Pedro**, por sempre acreditar em mim; **Dega**, por me apoiar e acreditar; **Bê**, por me ensinar a ser dedicada nas coisas que gosto; **Jairinho**, pelo carinho; **Edson**, que me mostrou que os nossos sonhos são possíveis; **Rafa**, pelas caronas; **Rodrigo, Lucas, Edson Luiz, Alberto, Celso Filho, João Gabriel, Bruno e Tiago**, por me acolherem com tanto carinho.

Ao **3jnetim** o que eu posso falar de vocês... **Julia (July)**, obrigada por sempre fazer comidas gostosas e ser paciente; **Juliana (Juju)**, por encher meu vocabulário de palavras cultas e por sempre me deixar por dentro das novidades; **Natalia (Nat)**, por me fazer rir até se a piada não for tão boa e por sempre acompanhar nas maluquices; **Eloiza (Elo)**, pelos grupos de estudo e por sempre me fazer rir; **Tariana (Tari)**, por me ensinar a ser mais responsável, dar dicas de moda e ceder a casa para as nossas reuniões; e **Mariana (Mary)**, por ser sempre sincera. Vocês sabem que são muito especiais para mim, que eu as amo muito, e que mesmo distante sei que estamos perto, e que se fosse falar as qualidades de cada uma precisaria de umas mil folhas. Obrigada por me fazer aceitar as diferenças e compreender que elas nos fazem únicos, por serem sempre um ombro amigo quando precisei e é bom lembrar que se nada der certo teremos nosso comércio (rsrsrs). Saibam que este I mesmo estando longe sempre pensa em vocês e sempre vai estar prestes a ajudar vocês.

Quando eu tinha quatro anos de idade me perguntavam o que eu queria ser quando crescer, minha resposta era sempre a mesma: VETERINÁRIA. Os anos foram passando e minha resposta nunca mudou e minha vontade de ajudar aqueles que “não falam nossa língua”, os animais, só cresce a cada dia. Eu agradeço ao **Alcapone (in memórium)**, **Queen, Capataz, Sarita, Farrista, Black (in memórium), Vitória (in memórium), Goff (in memórium), Bela (in memórium), Meg, Tofi, Teco, Toby, Lala, Mole, Layde, Tiara (in memórium), Flora (in memórium), Jambo (in memórium), Laila (in memórium), Clara (in memórium), Lucke (in memórium), Luna, Mel (in memórium), Baloo, todos os coelhos do projeto (in memórium)** e demais animais, ou melhor, amigos que passaram pela minha vida, por me darem a oportunidade de conviver com eles e por eu ter aprendido muito a ser sincera, leal, paciente, amável, estar sempre de bom humor, ajudar sem esperar algo em troca e ter mais atitudes ao invés de palavras.

A todos os funcionários do colégio Poli Positivos e Objetivo Litoral pelo carinho. Em especial à Tia **Deborah**, por sempre torcer por mim; Tias **Maria, Wilma e Germínia**, pela dedicação e cuidado que sempre tiveram comigo; aos Tios **Laércio e Hélio**, pela paciência que tiveram comigo, sempre sendo alegres e divertidos; à Tia **Cida**, por fazer a melhor coxinha do mundo e me mostrar que cozinhar é uma arte; e à Tia **Odeorides**, por sempre acreditar no meu sonho.

Aos professores que me ensinaram desde o maternal até o colegial, pela dedicação. Em especial às Tias **Lelis, Rúbia e Izilda**, por me educarem, me ensinarem as primeiras palavras com tanta paciência e carinho, acreditando em mim. Muito obrigada. Às Tias **Beth e Rosana**, pelos seus ensinamentos ecológicos, me fazendo ser uma pessoa consciente; à Tia **Katarina**, que com seu modo indicativo, falando em advérbios, interjeições e substantivos; e à Tia **Tânia**, por me ensinar que uma segunda língua é importante.

Aos meus colegas desde o maternal até o colegial por compartilharem anos maravilhosos de sua vida comigo.

Ao **Sr. Sampaio** por sempre me ajudar, apoiar e incentivar durante esta trajetória.

À **Dona Socorro e Fernando**, por me acolherem com tanto amor quando precisei.

Às minhas amigas: **Angélica**, que sempre confiou em mim, me ouviu quando precisei e me incentivou. Te adoro **Angel! Juliana**, por me ensinar coisas novas sempre nas nossas conversas, especialmente sobre felinos. Obrigada por me ouvir e torcer por mim. **Sâmya**, por sempre me alegrar com seu alto astral, pelas festas, risadas, caronas, por me ouvir, me ajudar e me enriquecer com seu conhecimento. Sem crocodilagem, te adoro. **Layse**, por sempre me mostrar coisas novas e sempre estar disposta a me ajudar. Adoro muito vocês!

Às desmoralizadas **Juci, Ivana, Thais, Roberta, Rafa e Talita**, obrigada pelas hospedagens pós festas, pelos papos jogados fora, por cuidarem de mim quando precisei e pelo carinho. Aos meninos da Mansão Vet, **Jeff (jeffinho, tchutchu)** por me passar serenidade e sempre me acalmar; **Jeann (galego 2, cabeludo)** por me ajudar sempre quando precisei; **Orestes** pelas caronas, por me ajudar a levar Luna e Baloo para o HV sempre quando precisei; **Olawo e Efren** por me fazer rir com suas composições; aos elementos **Érico e Juberdan** por me fazerem rir, me ajudarem, mesmo me enchendo o saco muitas vezes, Eu adoro vocês! A todos vocês, pelo ombro quando precisei, pelas festas, risadas, por me ensinarem a lidar com as diferenças, pela troca de experiências, pela troca de conhecimentos, que estes cinco anos se tornem mil.

Aos funcionários da UFCG, em especial à **Tereza**, por ser sempre paciente comigo e me ajudar.

A **Fabília, Adílio e Lulu** por me ajudarem a nessa caminhada, pelo conhecimento que adquiri com vocês e por me mostrarem como um bom profissional deve agir.

A todos os professores do curso de Medicina Veterinária da UFCG, por me ensinarem tudo que sei e em especial aos professores **Gil e Pedro** por serem pacientes, gentis, dedicados, mostrarem sempre o amor pela profissão, estarem sempre dispostos a ajudar e esclarecer qualquer dúvida e por serem um exemplo de ótimos profissionais.

À professora **Verônica Trindade**, por nunca medir esforços para ajudar aos alunos, sempre visando o nosso bem.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Enxertos ósseos.....	16
2.2 Biomateriais.....	17
2.2.1 Hidroxiapatita.....	18
2.2.2 Quitosana.....	19
2.2.3 Células da medula óssea	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Animais.....	22
3.2 Preparação do Material de Implante.....	22
3.3 Procedimento cirúrgico e Grupos Experimentais.....	23
3.4 Avaliação Clínica.....	26
3.5 Avaliação Histológica	26
3.6 Avaliação Morfométrica.....	27
3.7 Análise Estatística.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Avaliação Clínico-Cirúrgica.....	28
4.2 Avaliação Histológica.....	28
4.3 Avaliação Morfométrica.....	31
5. CONCLUSÃO.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Média e desvio padrão da área em μm^2 obtidos pela histomorfometria do tecido ósseo neoformado na interface osso/implante, segundo o grupo e o momento pós-operatório.....	31

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Gaiolas Individuais onde os animais permaneceram durante o período experimental.....	22
Figura 2 A - Antissepsia da área operatória, B - Delimitação da área operatória com os panos de campo, C - Incisão cutânea ao longo da margem craniolateral da diáfise femoral desde o trocanter maior até a crista troclear lateral, D - Metafisária femoral, E - Orifícios feitos com a broca cirúrgica de 2,0 mm.....	24
Figura 3 Biomateriais (Quitosana à esquerda e Hidroxiapatita à direita), G - Quitosana implantada na metáfise proximal, H - Hidroxiapatita implantada na metáfise distal, I - Coleta da medula óssea, J - 0,5ml de medula óssea, K - Adição de 0,25ml da medula óssea na metáfise proximal, K - Adição de 0,25 mL da medula óssea na metáfise distal, L - Dermorafia.....	25
Figura 4 Fragmentos ósseos submetidos à fixação com formalina tamponada a 10% durante 10 dias.....	27
Figura 5 Análise histológica.....	30

RESUMO

SIQUEIRA, ISABELLA MARIA LIRA TAVOLARO. **Utilização da Hidroxiapatita, Quitosana e Células da Medula Óssea na regeneração de defeito provocado na metáfise femoral de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Estudo Clínico-Cirúrgico, Histológico e Morfométrico.** Patos, UFCG. 2011. 35p. (Trabalho de conclusão de curso de Medicina Veterinária, Cirurgia Animal).

Este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar a eficácia entre a quitosana e hidroxiapatita isoladas e associadas às células da medula óssea em defeito ósseo na metáfise femoral de coelhos. Os biomateriais foram confeccionados pelo laboratório de Engenharia de Materiais da UFCG. Foram utilizados 20 coelhos adultos, da raça Nova Zelândia, provenientes de um criatório situado na cidade de Campina Grande – PB, os quais foram divididos em quatro grupos experimentais de acordo com o membro operado e localização dos implantes, sendo eles o Grupo quitosana (QUI), Grupo quitosana associada à medula óssea (QUIMO), Grupo hidroxiapatita (HA), Grupo hidroxiapatita associada à medula óssea (HAMO). Os animais foram divididos ao acaso de acordo com dois momentos experimentais, sendo que 10 animais foram eutanasiados 30 dias após a cirurgia, e 10 eutanasiados 60 dias após a cirurgia. Os materiais foram introduzidos em defeitos criados cirurgicamente na metáfise proximal (MP) e distal (MD) de cada fêmur, de modo que a quitosana foi introduzida na MP e a hidroxiapatita na MD do membro esquerdo, e no membro direito além dos implantes foi adicionado medula óssea. Na avaliação clínico-cirúrgica, foram observados a deambulação, comportamento de dor e cicatrização da ferida cirúrgica, não sendo observado no período imediatamente após a cirurgia e até serem eutanasiados com 30 e 60 dias sinal de dor, claudicação dos membros operados, nem característica histopatológica do enxerto contra o hospedeiro ou rejeição imunológica durante todo o período experimental. Na análise histológica observou-se que os grupos QUI e QUIMO estatisticamente foram mais eficazes do que os grupos HA e HAMO, não sendo havendo diferença estatística entre os grupos QUI e QUIMO, concluindo que esses últimos estimularam reações mais acentuadas e aceleraram o reparo ósseo.

Palavras-chave: Biomateriais, cicatrização óssea, ortopedia.

ABSTRACT

SIQUEIRA, LIRA MARIA ISABELLA TAVOLARO. Use of hydroxyapatite, Chitosan and Bone Marrow Cells in regenerating defect caused in the femoral metaphysis of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Clinical and Surgical, histological and morphometric. Patos, UFCG. 2011. 35 p. (course conclusion paper Veterinary Medicine).

This study aimed to evaluate and compare the effectiveness of chitosan and hydroxyapatite isolated and associated with bone marrow cells in the bone defect in the femoral metaphysis of rabbits. The biomaterials were prepared by the laboratory of Materials Engineering UFCG. We used 20 adult rabbits, New Zeland, from a farm located in the city of Campina Grande - PB, which were divided into four groups according with member operated and location of the implants, they were the Group chitosan (QUI), chitosan group associated with bone marrow (QUIMO), Group hydroxyapatite (HA), hydroxyapatite group associated with bone marrow (HAMO). The animals were randomly divided according with two experimental moments, where 10 animals were euthanized 30 days after surgery, 10 and euthanized 60 days after surgery. The materials were inserted, surgically, in defects in the proximal (MP) and distal (MD) of each femur, so that the chitosan was introduced in the MP and MD hydroxyapatite in the left limb and right limb was added in addition to spinal implants marrow. The animals were evaluated ambulation, pain behavior and healing of the wound. Clinical evolution of animals proceeded normally, without presence of infection or point dehiscence, occurring healing in all surgical wounds in the first 10 days post-operatively. Histological analysis showed that the groups were statistically QUI and QUIMO more effective than HA and HAMO groups, not being statistically different groups QUI and QUIMO, concluding that the latter more pronounced reactions stimulated and accelerated bone healing.

Keywords: biomaterials, bone healing, orthopedics.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem 32 milhões de cães e 16 milhões de gatos, de acordo com a Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação, a Anfal Pet. Atualmente os animais de estimação são vistos não só como amigos, mas também como filhos ou irmão em boa parte das famílias, devido a esta nova classificação dos animais na sociedade a exigência de melhores tratamentos vem aumentando, exigindo assim a necessidade de procedimentos terapêuticos mais seguros, eficientes e eficazes (MÉIER; VAISMAN, 2009).

Os traumas ósseos em animais de companhia vêm aumentando cada vez mais, pondo em risco a saúde deles. As afecções mais comuns e que exigem um tratamento ortopédico rápido e efetivo são as fraturas decorrentes principalmente de acidentes automobilísticos, ou ainda quedas e brigas. Esses sérios problemas de saúde afetam significativamente a qualidade de vida de seus portadores. Em muitos casos, o tratamento de falhas ósseas requer o uso de implantes (KOKUBO; KIM; HAWASHITA, 2003). O objetivo no tratamento dessas injúrias é a obtenção rápida da união óssea preservando as funções principais das articulações e tecidos moles próximos.

A reparação de uma fratura envolve uma seqüência de eventos celulares que evoluem desde a agressão propriamente dita, formação de hematoma, iniciação do calo plástico, organização do calo e remodelação. Sabe-se que algumas fraturas consolidam adequadamente após o uso correto de determinado método de imobilização, porém outras resultam em consolidação demorada ou não união. Para obtenção do sucesso na reparação das fraturas, diversos fatores são importantes entre eles estão o tipo de osso envolvido, tipo de fratura, idade do paciente, métodos de tratamento, fatores biomecânicos e metabólicos (JOHNSON, 2008).

No início do século vinte o uso de enxerto ósseo foi introduzido na prática cirúrgica veterinária e trouxe subsídios para uma reparação óssea mais acelerada, promovendo a formação de calo precoce através de um processo chamado de substituição invasiva associado ao processo de osteoindução e osteocondução (MIRANDA *et al.*, 2005).

Dentre os enxertos ósseos mais utilizados em cirurgias, os enxertos alógenos corticais e os autógenos esponjosos e córtico-esponjosos são os que apresentam maiores benefícios para reparação de defeitos, entretanto a coleta de osso autógeno danifica partes saudáveis do corpo e podem causar sequelas sérias ao paciente como dor local, infecção

além de prolongar o tempo de cirurgia e elevar o custo, como também a quantidade a ser coletada pode ser limitada. O uso de enxerto alógeno aumenta os riscos de infecção podendo ocorrer reações de rejeição do implante, e em adição a isso a quantidade de osso alogênico disponível é limitado (MONCHAU et al., 2002; KOKUBO; KIM.; HAWASHITA, 2003), estes empecilhos cirúrgicos podem ser evitados com o uso de biomaterias ou enxertos aloplásticos que segundo Legeros (2002) são substâncias de origem natural ou sintética, que podem ser usadas durante qualquer período de tempo, como parte ou como sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo.

Objetivou-se com este trabalho avaliar a eficácia dos implantes de hidroxiapatita e quitosana e da associação dos mesmos às células da medula óssea, na regeneração do tecido ósseo de coelhos, analisando o tempo de consolidação óssea e descrevendo os aspectos histológicos e morfométricos na interface entre o tecido ósseo e os implantes aos 30 e 60 dias após a intervenção cirúrgica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Enxertos ósseos

A enxertia óssea é uma parte essencial do tratamento cirúrgico de muitas injúrias ortopédicas, podendo ser realizada com sucesso de um local para o outro ou de um indivíduo para o outro, fazer uma ponte entre os defeitos ósseos ou para estabelecer a continuidade de um osso longo, auxiliar na fusão das articulações, preencher as cavidades e promover união óssea em fraturas com união tardia ou não-união (MILLIS e MARTINEZ, 2007). Os enxertos ósseos são determinados de acordo com seu local de origem e composição. Um auto-enxerto é um tecido retirado de uma parte do corpo e transplantado para outro local no mesmo indivíduo (STEVENSON, 1999). Um aloenxerto (homoenxerto) é um tecido obtido de um indivíduo e transplantado para outro da mesma espécie, mas não geneticamente idênticos. Um xenoenxerto envolve o transplante de tecido de um indivíduo a outro de espécie diferente. E finalmente, isoenxertos são tecidos transplantados de um indivíduo para outro geneticamente idêntico e da mesma espécie (MILLIS e MARTINEZ, 2007).

A composição dos enxertos ósseos pode incluir osso esponjoso, osso corticoesponjoso, osso cortical, medula óssea ou osso e cartilagem articular (osteocondral). Os enxertos de osso cortical são basicamente utilizados para propiciarem suporte estrutural e osteocondução em áreas destituídas de porções da coluna óssea, como uma fratura altamente cominutiva ou um segmento de osso removido como resultado de ressecção tumoral (FITCH *et al*, 1997; STEVENSON, 1998).

O enxerto ósseo pode atuar de três maneiras distintas no processo de reparação óssea, sendo elas a osteogênese, a osteoindução e osteocondução. A osteogênese é a formação de tecido ósseo no local da implantação do enxerto, o qual funciona como fonte de células osteoprogenitoras. A osteoindução é a capacidade do enxerto ósseo de recrutar e estimular células mesenquimais indiferenciadas a se diferenciarem em células osteogênicas. A osteocondução é o processo no qual o enxerto serve como arcabouço para formação de vasos sanguíneos e tecido ósseo. O enxerto é lentamente reabsorvido através de atividade osteoclástica e substituído por osso novo (PIERMATEI e FLO, 1999; MORAES, 2002; FOSSUM, 2002).

O enxerto mais comumente utilizado é o auto-enxerto devido à ausência de resposta imunológica (MORAES, 2002; FOSSUM, 2002), porém esse tipo de enxerto tem algumas limitações, como a quantidade não se tornando viável para grandes falhas ósseas, a coleta que exige sempre uma nova operação a qual resulta em perda de sangue e um tempo de anestesia prolongada, podendo levar complicações ao doador como lesão neurovascular, infecção, formação de hematoma e dor crônica. (MONCHAU *et al.*, 2002; KOKUBO; KIM; HAWASHITA, 2003). Outra característica do enxerto autógeno é a rápida reabsorção o que reforça o uso clínico extenso de materiais sintéticos e biológicos para o tratamento de defeitos ósseos (CEHRELI *et al.*, 2003).

Os enxertos alógenos (homógenos) e os xenoenxertos também são uma opção viável (CALIXTO, 2001). Porém deve-se levar em conta o risco de transmissão de doenças e da ativação do sistema imunológico do hospedeiro (PIERMATEI e FLO, 1999; KOKUBO; KIM; HAWASHITA, 2003; WU; HUANG; LAN, 2003; RODRIGUEZ, 2004), além de infecções que podem ocorrer devido a má conservação e manipulação errada do mesmo.

Para superar essas limitações, enxertos sintéticos vêm sendo estudados e usados, sendo os mais comumente utilizados os metais ou ligas metálicas (titânio, titânio-alumínio-vanádio), as cerâmicas (hidroxiapatita, trifosfato de cálcio, aluminatos de cálcio), os polímeros (silicones, poliamida, ácido glicólico, polipropileno, polimetilmetacrilato, poliuretanas, etc) e os compósitos (amálgama) (CALIXTO, 2001).

2.2 Biomateriais

Um biomaterial pode ser definido como uma substância, ou a combinação de duas ou mais substâncias de origem natural ou sintética que é tolerado de forma transitória ou permanente pelos órgãos e tecidos (CALIXTO, 2001; MORAES, 2002; RODRIGUES, 2004). Os biomateriais devem ser inertes, degradáveis e ou absorvíveis, além de favorecer o crescimento ósseo por condução, e se possível, por indução, as quais variam de acordo com as propriedades físicas e químicas do material que devem ser compatíveis com as reações fisiológicas do osso. Também sendo importantes algumas características como biocompatibilidade, ser de fácil aplicação clínica, não oferecer riscos trans-operatórios e sequelas pós-operatórias e ter uma boa aceitação pelo paciente (BORGES, 1998; FEHLBERG, 2001; MONCHAU *et al.*, 2002).

Diversos tipos de biomateriais, especialmente as biocerâmicas de fosfato de cálcio, continuam sendo pesquisadas e cada vez mais são utilizados em procedimentos para a reconstrução e recomposição tecidual, apresentando a vantagem de não provocar trauma adicional no paciente diferentemente o que ocorre na obtenção de enxerto autógeno (KEATING e MCQUEEN, 2001).

2.2.1 Hidroxiapatita

O grupo das cerâmicas de fosfatos de cálcio são os que mais se assemelham à composição do osso (LEGEROS, 2002).

Dentro deste grupo encontra-se a hidroxiapatita, a qual na sua forma natural é o elemento cristalino essencial dos componentes calcificados do esqueleto e é o principal mineral do osso e dente (CHERELI *et al.*,2003). Os cristais de hidroxiapatita são encontrados também nas pequenas calcificações dentro da glândula pineal e outras estruturas, o que é conhecido como corpora arenacea ou "areia cérebro" (HOLMES *et al.*,1984).

A hidroxiapatita apresenta fórmula molécula $C_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, sendo o biomaterial mais conhecido e utilizado nas reparações cirúrgicas devido apresentar a mesma estrutura cristalina que a do osso e por isso ser bastante estudado, sua produção vem sendo feita desde o início dos anos 70 e sua utilização desde os anos 80 (SCHMITZ; HOLLINGER; MILAM, 1999).

Quando sintetizada em laboratório permite a determinação de seu tamanho, porosidade e forma, além da obtenção de um produto estéril (BORGES, 1998), de fácil armazenamento e ilimitada disponibilidade. O tamanho dos poros, sua extensão e a interconectividade entre eles deve permitir a formação de vasos sanguíneos e o crescimento ósseo, levando a uma maior resistência na fixação do conjunto implante-osso (LEGEROS, 2002).

A hidroxiapatita tem uma boa condutibilidade óssea (acelera a formação do tecido ósseo novo e serve como suporte para o crescimento ósseo) a qual é regulada principalmente pela porosidade da mesma (tamanho dos poros que é completamente controlável), a qual influencia na sua velocidade de reabsorção. Ela também tem uma alta biocompatibilidade e segurança (não é tóxica, nem alergênica ou carcinogênica) além de uma composição uniforme (NILSSON *et al.*,2004). Todas essas qualidades ajudam a

reduzir o tempo de recuperação. O contato direto e estável desse biomaterial com o osso estimula a formação de uma ligação direta e forte com o tecido ósseo, favorecendo um suporte nutricional do tecido dentro dos poros incentivando o crescimento celular, fibrovascular, formação de osteóide e o crescimento do osso mineralizado formando uma interface direta, única e forte com o osso, além de servir como molde para a formação de osso novo (osteocondução) (LEGEROS, 2002). Esta osteocondução (acelera a formação do tecido ósseo novo, uma vez que o osso necessita de suporte para fazê-lo crescer) só é possível se o implante estiver em contato direto com o osso, o osso periférico deve estar viável e a interface entre o osso e o implante deve ser estável (POLLICK *et al.*, 1995).

A HA vem demonstrando extrema biocompatibilidade, produz neossificação, pouca fibrose com reação inflamatória moderada e não forma reação de corpo estranho; por isso as pesquisas com este biomaterial vem aumentando (CAMILLI *et al.*, 2008)

2.2.2 Quitosana

A quitosana é um biopolímero hidrofílico obtido a partir da quitina (termo derivado da palavra grega *Khitón*, que significa carapaça, casca ou caixa de revestimento), e que designa um polissacarídeo abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose em quantidade produzida anualmente (SENEL; MCCLURE, 2004). Este material é proveniente principalmente de carapaças de crustáceos, sendo também encontrado em insetos, moluscos e na parede celular de fungos. No entanto, toda a quitina comercialmente produzida é obtida dos resíduos das indústrias de processamento de crustáceos enquanto alimento. A quitosana é um polissacarídeo originado a partir da reação de desacetilação parcial de quitina, geralmente por tratamento alcalino (CHEN *et al.*, 2005).

Características como biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade são suas propriedades fundamentais, além de ação bacteriostática (SENEL *et al.*, 2000; NETO *et al.*, 2008). Devido a estas características biológicas, foram encontradas diversas aplicações para este biomaterial, dentre elas: na agricultura, na indústria de alimentos e, recentemente, na área médica (SENEL *et al.*, 2000; SINGLA; CHAWLA, 2001.). Outra característica importante e sua alta resistência a cargas, bem como a estabilidade dada ao enxerto, as quais são extremamente importantes especialmente nos estágios iniciais de formação óssea, essas só são possíveis devido ao arranjo paralelo de pontes de hidrogênio que constituem o biomaterial (MUZZARELLI *et al.*, 2002).

Segundo Ueno (2001) a quitosana também têm sido considerada como acelerador da reparação tecidual, capaz de aumentar a produção de matriz extracelular através do aumento de produção de fatores de crescimento, como também de acelerar a infiltração de linfócitos polimorfonucleares nas fases iniciais de cicatrização tecidual, aumentando consideravelmente a osteopontina, uma fosfoproteína capaz de aumentar a ligação celular na ferida em cicatrização. Ela também tem a capacidade de formar estruturas porosas, contendo fatores de crescimento, como proteínas morfogenéticas ósseas ou fatores de crescimento vascular em sua composição, podendo ser utilizados como moldes para o crescimento celular, para posterior implantação em defeitos extensos (ZHANG *et al.*, 2006).

2.2.3 Células da medula óssea

A medula óssea por sua vez é constituída pelas células primordiais indiferenciadas, as stem cells (BURWELL, 1985), caracterizadas por baixa taxa de crescimento, capacidade de auto-renovação e potencial para diferenciarem-se em várias linhagens (OWEN, 1980; CONNOLLY, 1995). Os dois tipos celulares ósseos, osteoblastos e osteoclastos, são derivados, respectivamente, dos sistemas medulares estromal e hematopoiético (DEL CARLO, 2004). No processo de reparação óssea, células presentes na medula desempenham papel importante na osteogênese ou fagocitose, dependendo das condições do meio (BURWELL, 1985).

A osteogenicidade da medula óssea deve-se às células osteoprogenitoras do estroma, que contêm dois tipos celulares: as células precursoras ósseas determinadas e as células precursoras ósseas indutíveis, que na presença de fator indutível local expressam atividade osteogênica, por exemplo, em fraturas e enxertos ósseos (DEL CARLO, 2004).

A medula óssea pode ser obtida de vários locais como: crista ilíaca (principal fonte), extremidade de ossos longos, parte esponjosa de ossos curtos, costelas, corpo das vértebras e interior dos ossos do crânio e esterno, sua coleta é simples e causa mínimos traumas ao paciente (KEITH, SACK, WENSING, 2004).

Ela pode ser usada isoladamente, nos casos em que existe uma união óssea retardada, artrodese, em pequenos defeitos ósseos e em não união óssea ou em associação com outro enxerto ampliando a propriedade osteogênica ao enxerto, sendo usada no caso de fraturas extensas. Sua utilização deve ocorrer logo após a coleta para que um maior

número de células esteja viável, quando possível o método de concentração das células osteoprogenitoras melhora a eficiência osteogênica do enxerto, pois a formação óssea está ligada diretamente ao número de células (DEL CARLO, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (UAMV/UFCG), segundo protocolo de aprovação nº 100/2008.

3.1 Animais

Foram utilizados 20 coelhos adultos, de ambos os sexos, da raça Nova Zelândia, pesando em média $3,0 \pm 0,4$ kg, provenientes de um criatório situado na cidade de Campina Grande – PB. Os animais foram divididos ao acaso, em dois momentos experimentais com 10 animais cada, de acordo com o período em que foram eutanasiados (30 ou 60 dias após o procedimento cirúrgico). Os mesmos foram acomodados em gaiolas individuais (Figura 1), por um período de sete dias antes do início do experimento para se adaptarem ao ambiente, foram vermifugados com albendazole 5%, na dose de 20mg/kg, por via oral, e alimentados com ração balanceada duas vezes ao dia e água potável *ad libitum* desde sua chegada.



Figura 1: Gaiolas individuais onde os animais permaneceram durante o período experimental.

3.2 Preparação do material de implante

Os implantes utilizados no experimento foram fornecidos pela Unidade Acadêmica de Biomateriais do Departamento de Engenharia de Materiais (UAEMa) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). A Hidroxiapatita utilizada foi a de razão 1.67 e a Quitosana foi extraída da carapaça de caranguejos e processada em solução de hidróxido

de sódio a 40%, ambas na apresentação de 3 mm de diâmetro com 5 mm de altura, com 100 a 300 µm de porosidade. Todos os substitutos ósseos foram autoclavados antes do uso.

3.3 Procedimento cirúrgico e Grupos Experimentais

O procedimento cirúrgico e a utilização dos biomateriais se deu da seguinte forma: no pré-operatório cada animal foi mantido em jejum sólido por 6 horas e líquido por 3 horas. A tricotomia foi realizada desde a região dorso-lombar até o calcâneo. Em seguida fez-se a medicação pré-anestésica com acepromazina, na dose de 1mg/kg, por via intravenosa (IV) e anestesia com zoletil na dose de 15mg/kg, IV. A antisepsia da área operatória foi realizada com solução de clorexidina a 0,5% (Fig.2A). Após a delimitação da área operatória com os panos de campo (Fig.2B), uma incisão cutânea foi efetuada ao longo da margem craniolateral da diáfise femoral desde o trocanter maior até a crista troclear lateral (Fig.2C), a gordura subcutânea e fáscia superficial foram seccionadas abaixo da incisão cutânea e a fáscia lata foi seccionada ao longo da margem cranial da aponeurose do músculo bíceps femoral. A retração caudal do bíceps e afastamento cranial do músculo vasto lateral revelou a metafisária femoral (Fig.2D). O músculo adutor da coxa foi rebatido na região subperiosteal para propiciar maior exposição do aspecto caudal do osso.

Foi feita ressecção longitudinal do periósteo e dois orifícios foram construídos (um na metafise proximal e outro na distal) com uma broca cirúrgica de 2,0 mm de diâmetro na parte proximal e distal em cada metafise femoral (Fig.2E). Durante a penetração da broca foi utilizada solução de NaCl 0,9% para minimizar o aquecimento ósseo e conseqüente osteólise. Após a confecção de cada orifício, os substitutos ósseos (Fig.2F) foram manualmente introduzidos da seguinte maneira: a quitosana na metafise proximal (Fig.2G) (Grupo QUI) e a hidroxiapatita na metafise distal do fêmur esquerdo (Fig.2H) (Grupo HA). No fêmur direito a disposição dos biomateriais foi a mesma da ocorrida do lado esquerdo porém com a adição de 0,25ml medula óssea (Fig.2J) sobre a interface osso implante (Fig.2K) (Grupos QUIMO e HAMO, respectivamente). A medula óssea foi coletada do trocanter maior do fêmur direito (Fig.2I) imediatamente antes de ser utilizada. Após a introdução dos implantes o músculo tensor da fáscia lata foi suturados com catagute 3-0 em plano contínuo. A redução do espaço morto foi realizada com catagute 3-0

utilizando a sutura em zigue-zague. A pele foi unida com mononailon 3-0 empregando-se sutura schmieden (Fig.2L).

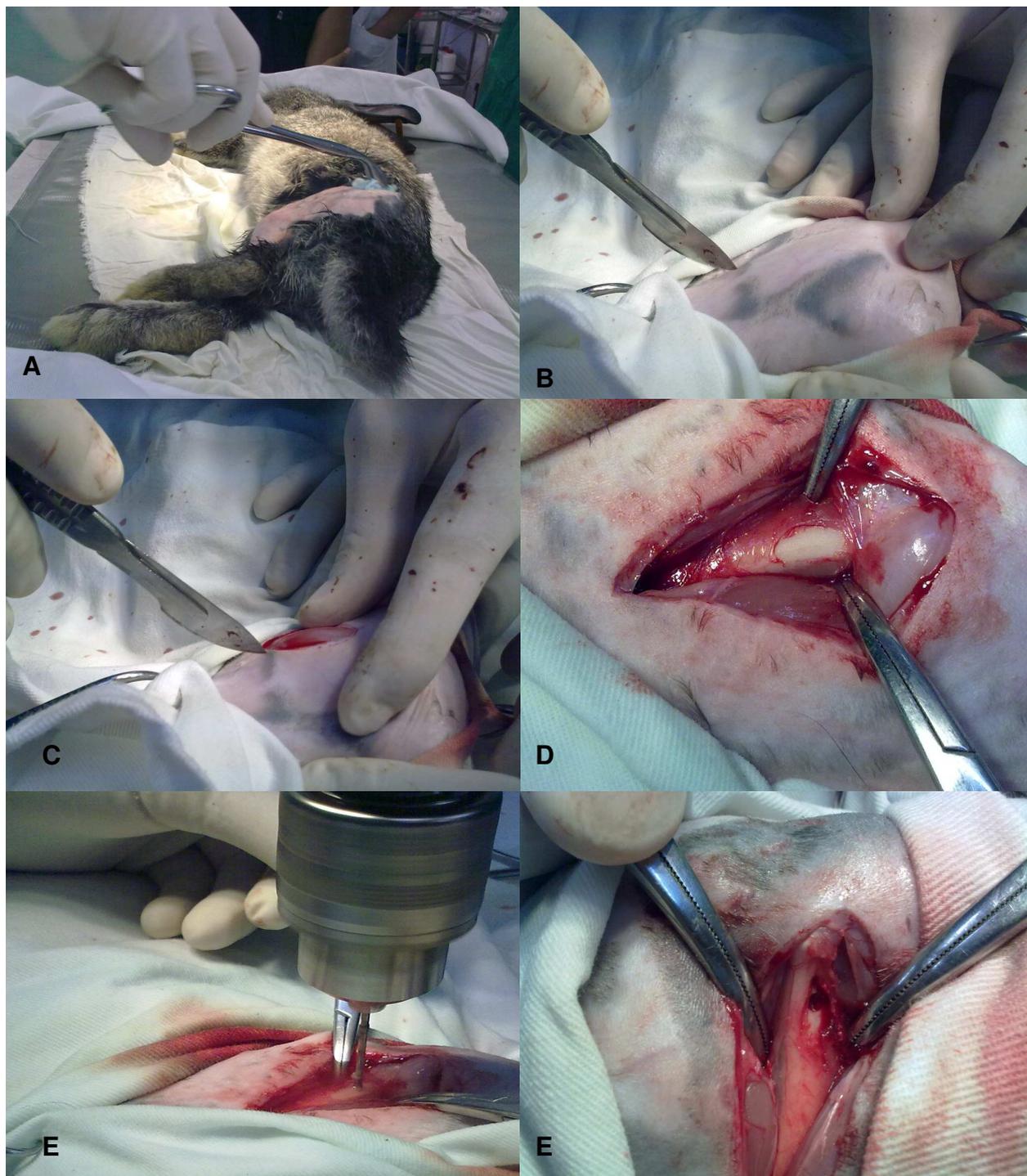


Figura 2: A - Antissepsia da área operatória, B - Delimitação da área operatória com os panos de campo, C - Incisão cutânea ao longo da margem craniolateral da diáfise femoral desde o trocanter maior até a crista troclear lateral, D - Metafisária femoral, E - Orifícios feitos com a broca cirúrgica de 2,0 mm.

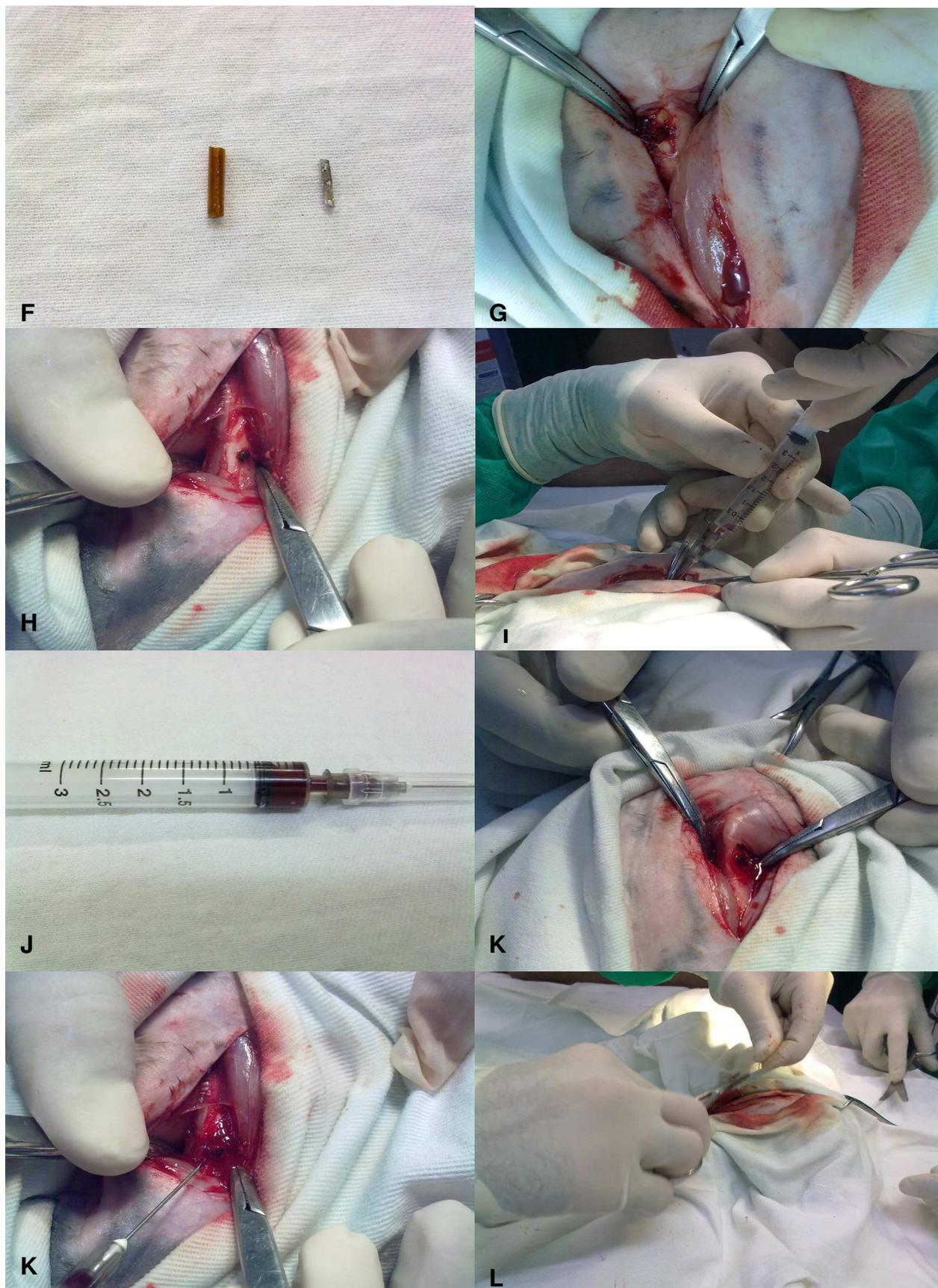


Figura 3: F – Biomateriais (Quitosana à esquerda e Hidroxiapatita à direita), G - Quitosana implantada na metáfise proximal, H – Hidroxiapatita implantada na metáfise distal, I – Coleta da medula óssea, J - 0,5ml de medula óssea, K - Adição de 0,25ml da medula óssea na metáfise proximal, K - Adição de 0,25 mL da medula óssea na metáfise distal, L - Dermorafia.

3.4 Avaliação clínico-cirúrgica

No pós-operatório os animais receberam enrofloxacina na dose de 10mg/kg, por via intramuscular (IM) uma vez ao dia durante 5 dias e meloxicam, via IM, 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. A higienização da ferida cirúrgica foi realizada com solução de NaCl 0,9% e kuraderm prata durante os 10 primeiros dias do pós-operatório, tendo sido retirado os pontos após esse período.

A avaliação clínica das feridas cirúrgicas foi feita diariamente, durante os 10 primeiros dias de pós-operatório, observando se havia presença de reação inflamatória, infecção, dor e deiscência da sutura.

3.5 Avaliação histológica

Os animais foram eutanasiados ao final do período de observação destinado a cada momento experimental (30 dias e 60 dias pós-cirúrgicos), tendo sido colhido os fêmures e em seguida retirados os fragmentos do tecido ósseo que continham os implantes, os quais foram cortados transversalmente no tamanho de 2cm de extensão, de modo que fossem colhidos 1cm de osso proximal e distal em relação aos implantes. Os fragmentos ósseos foram submetidos à fixação com formalina tamponada a 10% durante 10 dias (Fig.3). 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 14 dias. Em seguida eles foram desidratados por passagens em soluções de álcool em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e álcool absoluto) sendo em seguida incluídos em parafina líquida formando blocos e posteriormente cortados em fatias transversais de 5µm de espessura e montados em lâminas histológicas. De cada bloco foram obtidas quatro lâminas, sendo estas submetidas à técnica de hematoxilina-eosina para visualização histológica, avaliando-se a interface osso-implante os graus de reação endosteal e periosteal, proliferação e diferenciação celular no tecido cicatricial, presença de tecido conjuntivo e cicatrização óssea da lesão. Nessa análise, foi realizada avaliação descritiva qualitativa e comparação entre os momentos e grupos.



Figura 4 - Fragmentos ósseos submetidos à fixação com formalina tamponada a 10% durante 10 dias.

3.6 Análise morfométrica

A neoformação óssea induzida pelos tratamentos foi quantificada através da análise morfométrica das lâminas, através do programa *Image Pro Plus*, versão 6.2®. Para essa análise, foram realizadas capturas e digitalização das imagens que compreenderam a interface osso/implante. Foram obtidas imagens seqüenciadas de cada lâmina analisada para quantificar em μm^2 todo o tecido ósseo neoformado em toda interface osso/implante. Foi obtida a média dos valores para cada grupo estudado e estas foram submetidas à análise estatística.

3.7 Análise estatística

A comparação da cicatrização óssea induzida pelos tratamentos foi realizada por momento experimental e entre os grupos. 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 (ZAR23). 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

Na avaliação clínico-cirúrgica dos animais durante o período experimental, não foi observado nenhum sinal de dor e claudicação dos membros operados. Isso pode ser explicado pelo tamanho reduzido da lesão óssea provocada, não provocando processo inflamatório exacerbado e devido ao uso da analgesia empregada com o meloxicam, fármaco muito eficaz para minimizar a dor óssea, uma vez que atua no local da lesão, diminuindo o processo inflamatório (FANTONI, 2002). Em relação à cicatrização não foi observada infecção nem deiscência da sutura, ocorrendo assim a cicatrização de todas as feridas em 10 dias de pós-operatório. Pôde-se observar a importância de uma adequada assepsia, técnica cirúrgica e antibioticoterapia bem executada, estando estes resultados de acordo com os encontrados em MORAES (2002), CEHRELI et al.(2003) e VITAL et al.(2006), o que comprova a biocompatibilidade do enxerto.

4.2 Avaliação Histológica

A avaliação histológica foi realizada aos 30 e 60 dias de pós-operatório, sendo observado aos 30 dias na interface osso-implante que recebeu a quitosana (Grupo QUI), endósteo e periósteo irregular com reação celular intensa, muitos osteoblastos e osteoclastos ativos, grande quantidade de fibroblastos e tecido conjuntivo, intensa neoformação vascular (Figura 5A), tecido ósseo imaturo em volta de todo o implante (Figura 5B) com cicatrização avançada da lesão e presença de células mesenquimais em processo de diferenciação. Já aos 60 dias de pós-operatório, foi observado que o periósteo apresentava-se menos irregular em relação à análise que foi realizada aos 30 dias, os osteoclastos estavam em maior quantidade, ainda com muito tecido ósseo neoformado em volta de todo o implante (Figura 5C) e presença de células mesenquimais em diferenciação (Figura 5D).

Esses resultados se devem à capacidade da quitosana de estimular a formação de estruturas porosas, por conter fatores de crescimento como proteínas morfogenéticas ósseas ou fatores de crescimento vascular em sua composição (MADIHALLY, 1999; ZHANG, 2006). Segundo Ueno (2001), a quitosana é capaz de aumentar as funções de células inflamatórias, promovendo organização celular e atuando no reparo de feridas

amplas, pois sua estrutura química é similar à do ácido hialurônico, mostrando assim sua alta capacidade de cicatrização e reparação do tecido lesionado.

Na interface preenchida pela associação de quitosana e medula óssea (Grupo QUIMO), aos 30 dias do pós-operatório foram constatadas as mesmas reações observadas no Grupo QUI (Figura 5E e F), porém havia maior quantidade de células mesenquimais em processo de diferenciação. Já aos 60 dias, observou-se a permanência da intensa atividade celular e a cicatrização da lesão óssea encontrava-se avançada, com muito tecido ósseo neoformado em volta do implante (Figura 5G), ainda com presença de células mesenquimais indiferenciadas em atividade na região da interface osso/implante. Essa maior reação está associada ao fato de a medula óssea ampliar a propriedade osteogênica do local, especialmente quando sua utilização é realizada logo após a coleta, pois o número de células viáveis se torna maior no local (DEL CARLO, 2004). Este fato associado à ação estimulante da quitosana sobre a diferenciação celular, devido as células se aderirem fortemente a ela e se proliferarem mais rapidamente (UENO, 1999), propiciou a reação óssea mais marcante neste grupo.

Já na interface que recebeu a HA (Grupo HA) aos 30 dias de pós-operatório foi observado endóstio e perióstio bem regulares com presença de células ósseas, pequena atividade osteoblástica e osteoclástica, presença de fibroblastos, tecido conjuntivo, neoformação vascular e do tecido ósseo (Figura 5H), achados similares aos citados por VITAL (2005), LEE (2009) e Nandi *et al.* (2008) que realizaram um estudo para avaliar a eficiência da hidroxiapatita porosa em defeitos ósseos criados na diáfise de rádio de cabras e observaram boa formação óssea e revascularização na área que recebeu o implante, confirmando assim a propriedade osteocondutora biológica natural deste material. Porém, em comparação com os grupos QUI e QUIMO os resultados da HA mostraram-se inferiores. Aos 60 dias de pós-operatório, as reações ainda permaneceram muito discretas, com defeito ósseo em processo de cicatrização, entretanto Vital *et al.* (2006) em seu estudo com HA na falha óssea na ulna de coelhos observou maior formação óssea no grupo 60 dias.

Na avaliação da lesão óssea que foi preenchida pela HA associada à medula óssea (Grupo HAMO), observaram-se aos 30 dias de pós-operatório reações similares às encontradas no Grupo HA, porém com maior quantidade de fibroblastos e fibras colágenas, neovascularização e neoformação óssea (Figura 5I). Aos 60 dias as reações encontradas foram: regularidade endosteal e periosteal com pouca celularidade, pouca quantidade de

osteoblastos, porém os osteoclastos estavam em maior quantidade comparado ao momento 30 dias no mesmo grupo. Essa maior quantidade de osteoclastos se deve ao fato da utilização da medula óssea logo após a coleta ocorrendo assim um número maior de células osteoprogenitoras viáveis (DEL CARLO, 2004).

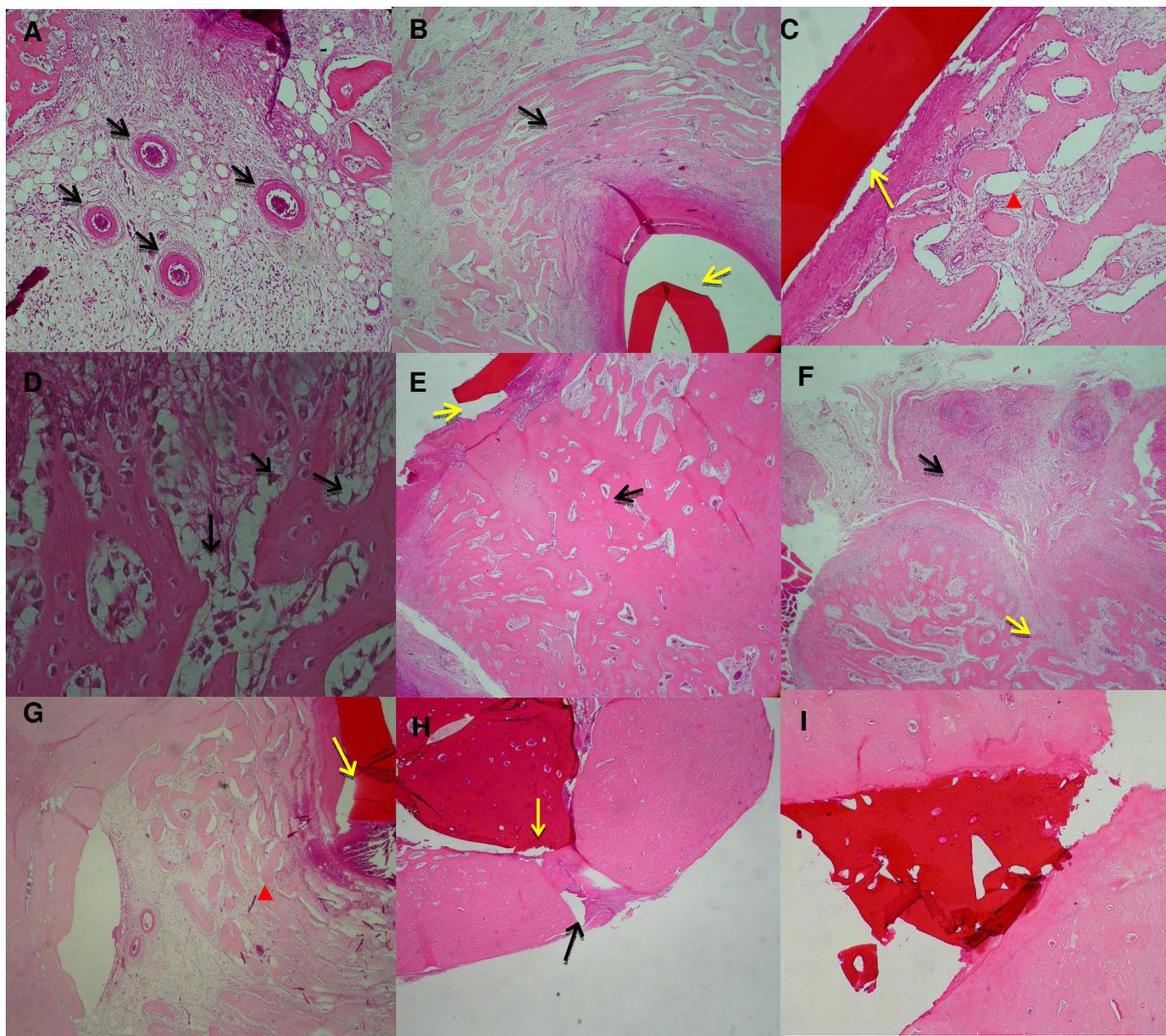


Figura 5: A – setas pretas mostrando vasos sanguíneos Obj.10(HE) (Grupo QUI) aos 30 dias. B- seta preta mostrando tecido ósseo imaturo em volta do implante na região medular do osso e seta amarela mostrando a quitosana Obj. 4x(HE) (Grupo QUI) aos 30 dias. C- interface osso/implante com muita celularidade em contato com a quitosana (seta amarela), muito tecido ósseo neoformado (▲) Obj. 10x (HE) (Grupo QUI) aos 60 dias. D - células mesenquimais em diferenciação (setas pretas) Obj. 40x (HE) (Grupo QUI) aos 60 dias. E - intensa neoformação óssea (seta preta) em contato com a quitosana e interface osso implante (seta amarela) Obj. 4x (HE) (Grupo QUIMO) aos 30 dias. F - grande quantidade de tecido conjuntivo (seta preta) acima da lesão óssea já preenchida por tecido ósseo (cicatrizacao)(seta amarela) Obj 4x (HE) (Grupo QUIMO) aos 30 dias. G - presença de muito tecido ósseo neoformado (▲) em volta do implante (seta amarela) Obj. 4x (HE) (Grupo QUIMO) aos 60 dias. H - pouco tecido ósseo neoformado preenchendo a lesão (seta preta) em comparação aos grupos QUI e QUIMO e endósteo e periosteo regular em contato com a hidroxiapatita (seta amarela) Obj. 4x (HE) (Grupo HA) aos 30 dias. I - hidroxiapatita (▲) com pouco tecido ósseo em volta (setas pretas) sem presença de celularidade Obj. 4x (HE) (grupo HAMO) aos 60 dias.

4.3 Avaliação morfométrica

Como observado na tabela 1, aos 30 e 60 dias, os grupos QUI e QUIMO diferiram estatisticamente dos demais em ambos os momentos pós-cirúrgicos. Essa maior reação está associada à capacidade da quitosana de aumentar a produção de matriz extracelular e de osteopontina (fosfoproteína) além de formar estruturas porosas contendo fatores de crescimento, estimular a citodiferenciação e ser um biomaterial osteoindutor, biodegradável e biocompatível (UENO *et al.*, 2001).

Não foi constatada diferença estatística entre os grupos QUI e QUIMO, HA e HAMO, mas histologicamente houve um maior crescimento de tecido ósseo nos grupos em que os biomateriais foram associados à medula óssea. Isso ocorreu pois a MO é uma grande fonte de células mesenquimais indiferenciadas (CMIs), também chamadas de células tronco, as quais migram para o foco da fratura por meio de osteoindução onde se diferenciam em osteoblastos e condroblastos atuando na recuperação do local, formando calos ósseos (MARTINEZ & WALKER, 1999). Outro fator importante está relacionado à sua utilização que deve ser realizada logo após a coleta aumentando a quantidade de células viáveis introduzidas no local (DEL CARLO, 2004).

Tabela 1: Média e desvio padrão da área em μm^2 obtidos pela histomorfometria do tecido ósseo neoformado na interface osso/implante, segundo o grupo e o momento pós-operatório.

Grupos/Momentos	30 dias	60 dias
HA	52.527,3169±29.733,2081 ^c	56.587,5992±16.742,0147 ^f
HAMO	58.748,0503±20.275,7217 ^b	64.552,6166±21.093,5182 ^e
QUI	488.450,5034±124.395,9069 ^a	462.643,7979±94.332,4295 ^d
QUIMO	533.884,3533±248.355,9503 ^a	542.955,1836±204.994,4271 ^d

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna denotam diferença estatística ($p < 0,05$).

5. CONCLUSÃO

Os biomateriais mostraram-se biocompatíveis, pois não causaram sinais de rejeição ou reações inflamatórias.

Em todos os grupos ocorreu o favorecimento ao processo de reparação óssea, sendo que à quitosana isolada e associada à medula óssea propiciou um crescimento ósseo mais acentuado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BURWELL, R. G. The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. **Clinical orthopaedics and related research**, United States. Nov. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3905105>>. Acesso em: 24 Mar. 2010.

CAMILLI, J. A.; CUNHA, M. R.; BERTRAN, C. A.; KAWACHI, E. Y. Subperiosteal hydroxyapatite implants in rats submitted to ethanol ingestion. *Arch Oral Biol*. 2004;49(9):747-53.

CALIXTO, R. F. E. Implante de um floculado de resina derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*) em alvéolo de rato imediatamente após a extração dental. Avaliações histológicas e histométrica da biocompatibilidade e da cronologia do reparo ósseo. 2001. 72p. **Tese (Mestrado)** Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

CEHRELI, M. C.; SAHIN, S.; KESENCI, K. et al. Biological reactions to a poly(L-lactide)-hydroxyapatite composite: A study in canine mandible. **J. Biomat. Appl.** v. 17, p. 265-276, 2003.

CHEN, J.; LI, Q.; XU, J.; HUANG, Y.; DING, Y.; DENG, H.; et al. Study on biocompatibility of complexes of collagenchitosan- sodium hyaluronate and cornea. **Artif Organs**, China. 29 fev. 2005. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15670279>>. Acesso em: 25 mar 2010.

CONNOLLY, J. F. Injectable bone marrow preparation to stimulate osteogenic repair. **Clinical orthopaedics and related research**, Orlando. Abr. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7641502>>. Acesso em: 25 Mar. 2010.

DEL CARLO, R. J. et al. Medula ossea autogena. Uma alternativa de enxerto em ortopedia veterinária. **Revista Ceres**. V. 51, p. 411-418, 2004.

FEHLBERG, A. F. **Hidroxiapatita sintética na regeneração de falha óssea provocada em fratura completa de terço intermédio de tíbia imobilizada pela fixação percutânea em cães**. 2001. 42p. **Tese (Mestrado)** Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

FANTONI, D. T.; MASTROCINQUE, S. Fisiopatologia e controle da dor. In: FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. Anestesia em cães e gatos. 1ed. São Paulo: Roca, p.323-336, 2002.

FITCH, R. et al. Bone autografts and allografts in dogs. **Compend Cont Educ Pract Vet**, Princeton Junction, v. 19, n. 558, 1997.

FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Roca L, 2002. cap p.848-853.

HOLMES R, MOONEY V, BUCHOLZ R, TENCER A. A coralline hydroxyapatite bone graft substitute: preliminary report. *Clin Orthop Relat Res*. 1984;(188):252-62.

JOHNSON, A. L. Fundamentos da cirurgia ortopédica e manejo de fraturas. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2008. cap. 31, p. 930-1114.

KEATING, J. F.; McQUEEN, M.M. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. **Journal of bone and Joint. Surgery**, London. 1 jan. 2001. Disponível em: <<http://web.jbjs.org.uk/cgi/reprint/83-B/1/3>>. Acesso em: 24 Mar. 2010. JOHNSON, A. L. Fundamentos da cirurgia ortopédica e manejo de fraturas. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2008. cap. 31, p. 930-1114.

KEITH M. DYCE, W. O. SACK, C. J. G. WENSING. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Ed. Elsevier, 2004. p. 813.

KOKUBO, T.; KIM, H.; HAWASHITA, M. Novel bioactive materials. With different mechanical properties. **Biomaterials**. Japan: Kyoto University, v.24, n.13, p.2161-2175, jun. 2003.

LEE, M.J.; SOHN, S. K.; KIM, K. T.; KIM, C. H.; AHN, H. B.; RHO, M. S.; JEONG, M. H.; SUN, S. K. Effect of Hydroxyapatite on Bone Integration in a Rabbit Tibial Defect Model. **Clinics in Orthopedic Surgery**. Vol. 2, No. 2, 2010.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthop. Rel. Res.** n.395,p.81-98,2002. New York. Fev.2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11937868>>. Acesso em: 25 Mar. 2010.

MADHALLY, S. V.; MATTHEW, H. W. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**. 1999; 20: 1133-42.

MARTINEZ, S.A.; WALKER, T. Bone grafts. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v.29, p.1207-1220, 1999.

MÉIER, B.; VAISMAN, C. A relação milenar entre homens e bichos de estimação entrou numa nova fase. Mais do que amigos, eles agora são como filhos. E a convivência pode ser tão complicada quanto a dos pais com um adolescente temperamental. **Revista Veja**, v.1, p 84,2009.

MILLIS, D. L.; MARTINEZ, S. A. Enxertos ósseos. . In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3 ed. São Paulo: Manole, v. 2, p.1875-1891, 2007.

MIRANDA, ELAN SOUZA; et al. Estudo experimental comparativo no uso do enxerto ósseo orgânico e inorgânico no reparo de fraturas cirúrgicas em rádio de coelhos. **Acta ortop.bras**, São Paulo, vol13, n.5, p. 1-10, 2005.

MONCHAU, F., et al. In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate, calcium carbonate. **Biomolecular engineering**, France: UPRES EA 1049, V.19, n.26, p.143-152, Aug. 2002.

MORAES, P. C. **Biocompatibilidade e comportamento do cimento de fosfato de cálcio, reforçado com diferentes tipos de fibras, implantado no rádio de coelhos**. 2002. 73f. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

MUZZARELLI, C.; MUZZARELLI, R. A. Natural and artificial chitosan-inorganic composites. *J Inorg Biochem*. 2002; 92: 89-94.

Nandi SK, Kundu B, Ghosh SK, De DK, Basu D. Efficacy of nano-hydroxyapatite prepared by an aqueous solution combustion technique in healing bone defects of goat. *J Vet Sci*. 2008; 9(2):183-91.

NETO, S. R. **Desenvolvimento e aplicação de biomateriais à base de quitosana para reconstrução óssea: avaliação radiográfica e histológica**. 2008. 130p. Tese (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.

NILSON, M., WANG, J. S., WIELANEK, L., et al. Biodegradation and biocompatibility of a calcium sulphate-hydroxyapatite bone substitute. **J. Bone Joint Surg. Br.** V.86, n.1, 2004.

OWEN, M. The origin of bone cells in the postnatal organism. **Arthritis and rheumatism**, v.23, n10, p.1073-1077, Oct.1980.

PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. São Paulo: Ed. Manole Ltda, 1999. p.139-140.

POLLICK, S.; SHORS, E. C.; HOLMES, R. E. et al. Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramics placed in bone and ectopic sites. **J. Oral Maxillofac. Surg.** V. 53, p.915-922, 1995.

RODRIGUEZ, A., I., R. Avaliação da reconstituição óssea do rádio de cadelas submetidas ou não a ovariossalpingohisterectomia, utilizando hidroxiapatita com alandronato e hidroxiapatita com colágeno (avaliações densitométricas e radiográficas) 2004. 58p. Tese (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

SENEL, S.; IKINCI, G.; KAS, S.; YOUSEFI-RAD, A.; SARGON, M. F.; HINCAL, A. A. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. **Int J Pharm.** Turquia. 5 Jan. 2000. Disponível em: <<http://translate.google.com.br/translate?hl=ptBR&sl=en&tl=pt&u=http%3A%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2Fpubmed%2F10606782&anno=2>>. Acesso em: 25 Mar 2010.

SENEL, S.; McCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Turquia: Ankara. vol. 56: 1467-80. June.2004.

SINGLA, A.K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update. **J Pharm Pharmacol.** India. 8 Ago.2001. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518015>>. Acesso em: 26 Mar. 2010.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O; MILAM, S. B. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. **J.Oral Maxillofac. Surg.** U.S.A. 9 set. 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484115>>. Acesso em: 26 Mar. 2010.

STEVENSON, S. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. **Clin Orthop**, v.355 (Suppl), n. 239, 1998.

STEVENSON, S. Biology of bone graft. **Orthop. Clin North Am**, v. 30, n. 543, 1999.

UENO H, MURAKAMI M, OKUMURA M, KADOSAWA T, UEDE T, FUJINAGA T. Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. **Biomaterials.** 2001; 22: 1667-73.

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. O trabalho encontra-se aprovado para publicação, aguardando paginação. **Arq. Brás. Méd Vet. Zootec.** 2005.

VITAL, C. C.; BORGES, A. P. B.; FONSECA, C. C.; TSIOMIS, A. C.; CARVALHO, T. B.; FONTES, E. B.; SENA, M. P.; FÓFANO, G. 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.

ZANG, Y.; CHENG, X.; WANG, J.; WANG, Y.; SHI, B.; HUANG, C. et al. Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor-beta 1 DNA for periodontal tissue engineering. **Biochem Biophys Res Commun.** 2006; 344:362-9.

WU, T.; HUANG, H.; LAN, C. Studies on the microspheres comprised of reconstituted collagen and hydroxyapatite. **Biomaterials.** v. 25, n.4, p.651-658, 2003.

