

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**UTILIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO, QUITOSANA E MEDULA ÓSSEA
NO REPARO ÓSSEO EM COELHOS. ESTUDO CLÍNICO-CIRÚRGICO,
RADIOLÓGICO E HISTOLÓGICO.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Campina Grande – UFCG em
cumprimento do requisito
necessário para obtenção do
título de Mestre em Medicina
Veterinária.

ADÍLIO SANTOS DE AZEVEDO

**PATOS-PB
2011**



**CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL - CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**UTILIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO, QUITOSANA E MEDULA ÓSSEA
NO REPARO ÓSSEO EM COELHOS. ESTUDO CLÍNICO-CIRÚRGICO,
RADIOLÓGICO E HISTOLÓGICO.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Campina Grande – UFCG em
cumprimento do requisito
necessário para obtenção do
título de Mestre em Medicina
Veterinária.

ADÍLIO SANTOS DE AZEVEDO

Prof. Dr. Pedro Isidro da Nóbrega Neto
Orientador

**PATOS-PB
2011**

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

A944u

2011 Azevedo, Adílio Santos de

Utilização de fosfatos de cálcio, quitosana e medula óssea no reparo ósseo em coelhos. Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico. / Adílio Santos de Azevedo. - Patos - PB: UFCG/PPGMV, 2011.

60p.: il. Color.

Inclui Bibliografia.

Orientador: Pedro Isidro da Nóbrega Neto.

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

1-. Cirurgia. 2- Biomateriais 3 - Engenharia de tecidos

CDU: 616.089:619

FICHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AZEVEDO, Adílio Santos de

Título: Utilização de fosfatos de cálcio, quitosana e medula óssea no reparo ósseo em coelhos. Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande – UFCG em cumprimento do requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

DATA: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Isidro da Nóbrega Neto
Orientador

Prof. Dr. Marcelo Weinstein Teixeira
(1º membro)

Profa. Dra. Rosemary Sousa Cunha Lima
(2º membro)

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai todo poderoso, criador do céu e da terra, e em Jesus Cristo seu único filho e nosso senhor, criador do céu e da terra.

A minha mãe e ao meu irmão pelo auxílio, compreensão e carinho em todos os momentos de minha vida. Vocês são a fonte do meu viver.

Aos meus familiares: vovó Iraci, Buinha, Lúcia, Isaías, tio José, e aos demais familiares, pelo apoio de vocês.

A minha namorada Patrícia, pelo apoio, amizade, compreensão e por passar por todos os momentos comigo.

Aos meus orientadores: Prof. Pedro Isidro e Prof. Marcelo Sá, pela confiança e amizade. Agradeço por terem confiado em minha capacidade e sempre me ajudarem na minha formação profissional.

Ao Prof. Marcus Vinícius, por ter fabricado os biomateriais.

Ao Prof. Assis, da UFPI, por colaborar com a parte de morfometria.

Aos colegas de faculdade: Adriana, Fabrícia, Ana Lulu, Alan, Rose e todos os outros. Muito Obrigado pela contribuição.

Aos amigos Toni e Segundo, pela amizade e respeito. Gosto muito de vocês.

A FAPESQ, por ter financiado este trabalho.

Aos funcionários do HV, em nome de dona Céu, dona Joana, dona Neuma, dona Neném, dona Fátima, dona Socorro, Neide, Edgar, Adriano, Jaílson, Finha, Rilva, Edinho, Solange e em especial a Cuité. Vocês foram muito importantes no meu crescimento profissional.

Aos professores em geral, pela contribuição e carinho.

A Érico, Isabella, Clécio, Layze e todos os outros que contribuíram com este trabalho. Sem vocês eu não teria conseguido.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho. Meu Muito Obrigado

SUMÁRIO

	Pag.
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
INTRODUÇÃO.....	10
REFERÊNCIAS.....	11
Capítulo I - Avaliação de diferentes proporções de fosfato de cálcio no reparo do tecido ósseo em defeito provocado na metáfise femoral de coelhos: estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
REFERÊNCIAS.....	25
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	29
Capítulo II - Avaliação da utilização da hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea no reparo do tecido ósseo em coelhos. Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico.....	31
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	45

RESUMO.....	51
ABSTRACT.....	51
CONCLUSÕES.....	53
ANEXO.....	54

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Pag.

Tabela 1	Média ou mediana e desvio padrão ou intervalo interquartil da radiopacidade da lesão óssea, conduzida pelos biomateriais entre os momentos e grupos.....	21
Tabela 2	Média ou mediana e desvio padrão ou intervalo interquartil da área em μm^2 obtidos pela histomorfometria do tecido ósseo neoformado conduzida pelos biomateriais entre os momentos e grupos.....	24

Capítulo II

Tabela 1	Média ou mediana e desvio padrão ou intervalo interquartil da espessura óssea em mm, utilizada para acompanhar o processo de cicatrização óssea induzida pelos tratamentos entre os momentos e grupos.....	39
-----------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I		Pag.
Figura 1	Radiografias nas projeções ML e CC dos fêmures. Os círculos indicam os locais das osteotomias. a – Imediatamente após a cirurgia; b – 30 dias após o procedimento (notar aumento de radiopacidade nas bordas da osteotomia); c – 60 dias de pós-operatório (locais osteotomizados totalmente cicatrizados).....	19
Figura 2	As linhas pontilhadas demarcam o local onde foi realizada a osteotomia e colocação dos implantes de fosfato de cálcio (interface osso-implante). A (●) representa o tecido ósseo neoformado. A figura A demonstra a interface osso-implante que recebeu o TCP/HA 30 dias. A figura B recebeu o CPP900 60 dias. Notar quantidade significativamente maior de tecido ósseo neoformado em A em relação a B . Obj. 4x (HE).	24
 Capítulo II 		
Figura 1	Desenho esquemático (esquerda) e radiografias com processo de mensuração da osteotomia (direita). Medição logo após a cirurgia (letra A) e com presença de calo ósseo (letra B).....	37

Figura 2 A - tecido ósseo imaturo em volta do implante na região medular do osso (●) e seta vermelha mostrando a quitosana Obj. 4x (HE). B - setas pretas mostrando vasos sanguíneos Obj. 10x (HE). C - intensa neoformação óssea (●) em contato com a quitosana (seta vermelha) Obj. 4x (HE). D - grande quantidade de tecido conjuntivo (●) acima da lesão óssea já preenchida por tecido ósseo Obj 4x (HE). E - pouco tecido ósseo neoformado preenchendo a lesão (seta vermelha) em comparação aos grupos QUI e QUIMO e endósteo regular em contato com a hidroxiapatita (seta preta) Obj. 4x (HE). F - interface osso/implante com muita celularidade em contato com a quitosana (seta preta), com muito tecido ósseo neoformado (●) Obj. 10x (HE). G - células mesenquimais em diferenciação (setas pretas) Obj. 40x (HE). H - presença de muito tecido ósseo neoformado (●) em volta do implante (seta vermelha) Obj. 4x (HE). I - hidroxiapatita (●) com pouco tecido ósseo em volta (setas pretas) sem presença de celularidade Obj.4x (HE)..... 42

INTRODUÇÃO

No decorrer da última década, vem sendo crescente a associação de várias áreas tecnológicas e médicas, com o objetivo de desenvolver terapias capazes de maximizar e acelerar processos regenerativos de tecidos orgânicos sem provocar efeitos adversos aos pacientes, sendo essa associação profissional chamada de engenharia de tecidos. Neste contexto, a utilização de biomateriais como algumas biocerâmicas de fosfato de cálcio, no intuito de acelerar a reparação óssea, são muito estudadas e documentadas na literatura (BORGES, 1998; FLEMING et al., 2000), porém os biopolímeros como a quitosana, vêm merecendo posição de destaque no que se refere a estudos que avaliam sua capacidade de interação em meios orgânicos para atuar como adjuvante no tratamento de várias afecções (BURKATOVSKAYA et al., 2006; LI et al., 2005).

Entre as biocerâmicas mais utilizadas nas áreas médicas, a hidroxiapatita, o trifosfato de cálcio e o pirofosfato de cálcio ocupam lugar de destaque por apresentarem-se quimicamente muito similar à fase mineral do osso, preenchendo pré-requisitos biológicos importantes para sua interação com meios orgânicos (GUASTALDI e APARECIDA, 2010; CAMARGO et al., 2009)

A quitosana é obtida da quitina, que é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose. A quitosana vem ganhando destaque em pesquisas médicas nos últimos anos (KHAN e PEH, 2003), por ser um material biocompatível, atóxico e biodegradável (SENEL e McCLURE, 2004). Várias pesquisas apontam sua capacidade em estimular a osteogênese sem causar danos à matriz óssea (WANG et al., 2002).

A medula óssea é rica em células osteoprogenitoras e fatores de crescimento que são importantes no processo de regeneração de tecidos, dentre eles o tecido ósseo (JIANG et al., 2002; KRZYMANSKI et al., 1997). Sua capacidade osteogênica é bem conhecida, uma vez que os enxertos de osso esponjoso são ricos em medula óssea e seu poder em acelerar a osteogênese é fato confirmado (BLOCK, 2005).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os processos celulares e o tecido ósseo neoformado na interface osso-implante promovidos pelos biomateriais utilizados neste experimento.

REFERÊNCIAS

BLOCK, J. E. The role and effectiveness of bone marrow in osseous regeneration. **Medical Hypotheses**. v. 65, p. 740–747, 2005.

BORGES, A.P.B. *O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia, de cães (Canis familiares). Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodispersão*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1998. 112p. (Tese, Doutorado).

BURKATOVSKAYA, M.; TEGOS, G. P.; SWIETLIK, E.; DEMIDOVA, T. N.; CASTANO, A. P.; HAMBLIN, M. R. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. **Biomaterials**. v. 27. p. 4157-4164, 2006.

CAMARGO, N. H. A.; DELIMA, S. A.; AGUIAR, J. F.; GEMELLI, E.; TOMIYAMA, M. Synthesis and Characterization of Nanostructures Calcium Phosphates Powders and Calcium Phosphates/-Al₂O₃ Nanocomposites. **Journal of Advanced Materials**, vol. 41, p. 33-43, 2009.

FLEMING, J. E.; CORNELL, C. N.; MUSCHLER, G. F. Bone cells and matrices in Orthopedic Tissue Engineering. **Orthop Clin North Am**. v. 31, p. 357-37, 2000.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Quim. Nova**. vol. 33, p. 1352-1358, 2010,

JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B. N.; REINHARDT, R. L.; SCHWARTZ, R. E.; KEENE, C. D; ORTIZ-GONZALEZ, X. R.; REYES, M.; LENVIK. T.; LUND, T.; BLACKSTAD, M.; DU, J.; ALDRICH, S.; LISBERG, A.; LOW, W. C.; LARGAESPADA, D. A.; VERFAILLIE, C. M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**. v. 418, p. 41–49, 2002.

KHAN, T. A.; PEH, K. K. A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science*. v. 6, p. 20-26, 2003.

KRZYMANSKI, G.; KALEZAK, M.; WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W. The use of bone-marrowderived fibroblastoid cells and fresh bone marrow in the treatment of bone defects: an experimental study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* v. 26, p. 55-60, 1997.

LI, Z. S.; RAMAY, H. R.; HAUCH, K. D.; XIAO, D. M.; ZHANG, M. Q. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. v. 26, p. 3919-3028. 2005.

SENEL, S.; McCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Review*. v. 56, p.1467–1480, 2004.

WANG, X.; MA, J.; WANG, Y.; HE, B. Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. *Biomaterials*. v. 23, p. 4167-4176, 2002.

CAPÍTULO I

Avaliação de diferentes proporções de fosfato de cálcio no reparo do tecido ósseo em defeito provocado na metáfise femoral de coelhos: estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico.

Manuscrito submetido à revista
Brasílian Journal of veterinary
Research and Animal Science –
ISSN 1413-9596.

Avaliação de diferentes proporções de fosfato de cálcio no reparo do tecido ósseo em defeito provocado na metáfise femoral de coelhos: estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico

Adílio Santos de Azevedo , Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá, Marcus Vinícius Lia Fook, Roseane de Araújo Portela, Sérgio Santos de Azevedo, Pedro Isidro da Nóbrega Neto.

Evaluation of different proportions of calcium phosphate in the repair of bone tissue in defects caused by surgery in femoral metaphysis of rabbits: clinical-surgical, radiological and histological study. Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, 58700-970, Brazil. E-mail: adílio_vet@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Atualmente, observa-se na rotina cirúrgica veterinária o emprego cada vez maior de materiais sintéticos que podem ser utilizados como substitutos ósseos com a característica de estimular um processo de cicatrização mais rápido, sendo justificada a utilização destes biomateriais em vários tipos de lesões, tais como as ocasionadas por traumatismos, processos infecciosos e neoplasias ósseas, objetivando uma remodelação e reconstrução desses defeitos¹. Outra possibilidade é utilizar em artrodeses, proporcionando imobilizações de articulações com o mínimo de desconforto para os pacientes², ou ainda onde o uso de enxertos autógenos e alógenos sejam inviáveis, devido a problemas como disponibilidade limitada, dificuldade de armazenamento e tempo cirúrgico maior na obtenção dos enxertos orgânicos³.

No decorrer dos últimos anos, constatou-se que as biocerâmicas microporosas destacam-se em aplicações de substituição e regeneração de tecidos ósseos, principalmente as biocerâmicas formadas pela composição Ca/P (os fosfatos de cálcio)⁴, sendo esse grupo de biomateriais o que mais se assemelha à composição do osso, apresentando-se como materiais biocompatíveis e bioativos^{5 6}. Esses biomateriais devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos

dos hospedeiros, caracterizando a biocompatibilidade⁷. A bioatividade é caracterizada pela similaridade química do biomaterial com a parte mineral do tecido ósseo, permitindo a osteocondução⁶, que é a capacidade de promover o crescimento ósseo sobre a superfície e através dos poros do material⁷, servindo como arcabouço passivo sobre o qual células osteoprogenitoras podem produzir novo osso².

Entre os materiais biocerâmicos empregados com relevância na medicina para a confecção de implantes, podemos citar os fosfatos de cálcio, que apresentam várias subdivisões de acordo com a relação de Ca/P^{8,9}, e os que merecem posição de destaque são: pirofosfato de cálcio com fórmula molecular $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ e razão Ca/P igual a 1.0, fosfato tricálcio com fórmula molecular $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e razão Ca/P de 1.5 e a hidroxiapatita com fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e razão Ca/P de 1.67, por serem os mais estudados, por exemplo, nas reparações cirúrgicas ósseas, devido apresentarem composição inorgânica semelhante ao osso, estimulando assim o processo de osteocondução^{10,5}.

Miranda et al.¹¹, em estudo comparativo entre enxerto inorgânico e orgânico autógeno, concluiu que o enxerto sintético estimula precocemente o processo de reparação óssea e os achados radiográficos e histológicos mostram melhor evolução na formação do calo ósseo. Já Moraes et al.¹, concluiu que o cimento à base de fosfato de cálcio em contato com o tecido ósseo não induz rejeição, sendo desta forma biocompatível.

Com o intuito de averiguar o processo de osteocondução dos biomateriais disponíveis para as reconstruções do tecido ósseo, o objetivo deste trabalho foi comparar o uso de diferentes fosfatos de cálcio na correção de defeitos ósseos na metáfise femoral de coelhos, através da observação clínica, radiográfica e dos aspectos histológicos em relação ao processo de reparação óssea, obtidos pelo método da reação direta.

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/UFPG), segundo protocolo de aprovação nº 100/2008.

Foram utilizados 20 coelhos adultos, de ambos os sexos, da raça Nova Zelândia, pesando em média $2,5\pm 0,4$ kg, provenientes de um criatório situado na cidade de Patos – PB. Os animais foram divididos ao acaso, em dois momentos experimentais com 10 animais cada momento, de acordo com o período em que foram eutanasiados (30 ou 60 dias após o procedimento cirúrgico). Os animais foram alocados em gaiolas individuais, vermifugados com albendazol^a 5% na dose de 20mg/kg por via oral 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.

Foram utilizados quatro fosfatos de cálcio que compreenderam os quatro grupos estudados: 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). Os implantes apresentavam formato cilíndrico com 2 mm de diâmetro e 5 mm de comprimento, e 100 a 300 µm de porosidade. Todos os substitutos ósseos foram autoclavados antes do uso.

Os quatro implantes foram aplicados por animal, dois em cada fêmur, situados nas metáfises proximal e distal. Após a tricotomia, realizou-se a medicação pré-anestésica com acepromazina^b, na dose de 1mg/kg por via intravenosa (IV) e anestesia com zoletil^c, na dose de 15mg/kg IV. Após antisepsia da área operatória com solução de clorexidine^d a 0,5%, fez-se uma incisão cutânea ao longo da margem craniolateral da diáfise femoral e divulsão do tecido subcutâneo e muscular para facilitar a exposição da metáfise proximal e distal do fêmur. Foi feita ressecção longitudinal do perióstio e dois orifícios foram construídos, um na metáfise proximal e outro na distal com broca de 2,0 mm de diâmetro em cada membro pélvico para colocação dos implantes. Durante a penetração da broca, foi utilizada solução fisiológica para minimizar o aquecimento ósseo. Na metáfise proximal do membro pélvico esquerdo utilizou-se o implante de CPP700, e na metáfise distal utilizou-se CPP900. Na metáfise proximal do membro pélvico direito utilizou-se TCP/HA e na metáfise distal utilizou-se HA. Após a introdução dos implantes foi realizado a síntese dos tecidos.

^a Ibazole 5% - IBASA

^b Acepran 1% - VETNIL

^c Zoletil 100 – VIRBAC

^d Riohex 0,5% - RIOQUÍMICA

No pós-operatório os animais receberam enrofloxacin^e na dose de 10mg/kg por via intramuscular (IM), uma vez ao dia durante 5 dias e meloxicam^f na dose de 0,2 mg/kg IM no primeiro dia (fármaco administrado 30 minutos antes do procedimento cirúrgico) e 0,1 mg/kg nos dois dias subseqüentes. A higienização da ferida cirúrgica foi realizada com solução fisiológica e kuraderm prata^g durante os 10 primeiros dias do pós-operatório, tendo sido retirado os pontos após esse período.

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

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 avaliar a morfologia óssea dos fêmures e acompanhar o processo de reparação óssea (Figura 1). Para a avaliação radiográfica foi proposto uma escala gradual de radiopacidade, a saber: 0 = ausência de reação periosteal; 1 = reação periosteal apenas nas bordas da lesão óssea; 2 = reação periosteal nas bordas da lesão com radiopacidade evoluindo concentricamente sem consolidação completa da lesão óssea; 3 = consolidação completa da lesão óssea. Essa avaliação foi realizada por três avaliadores, tendo sido somados os valores e obtido a média para cada lesão óssea avaliada e submetido à análise estatística, conduta essa tomada para isentar a ocorrência de tendências.

Os animais foram eutanasiados ao final do período de observação destinado a cada momento, tendo sido colhido os fêmures e em seguida retirados os fragmentos do tecido ósseo que continham os implantes. Os fragmentos ósseos foram submetidos à fixação com formalina tamponada a 10% durante 10 dias. 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. Os fragmentos foram incluídos em parafina líquida e posteriormente cortados em fatias transversais de 5µm de espessura dos blocos e montados em lâminas de vidro. De cada bloco foram obtidas quatro lâminas, sendo estas submetidas às técnicas de hematoxilina-eosina para visualização histológica, avaliando-se a interface osso-implante os graus de reação endosteal e periosteal,

^e Biofloxacin 2,5% - BIOVET

^f Maxicam 0,2% - OURO FINO

^g Kuraderm Prata - AVIPEC

proliferação e diferenciação celular no tecido cicatricial e presença de tecido conjuntivo. A neoformação óssea conduzida pelos biomateriais foi quantificada através da análise morfométrica das lâminas.

A comparação da cicatrização óssea conduzida pelos diferentes biomateriais foi realizada por momento experimental e entre os vários 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 (ZAR¹²). O nível de significância adotado foi de 5% e as análises foram feitas com o programa estatístico MINITAB versão 14.0.

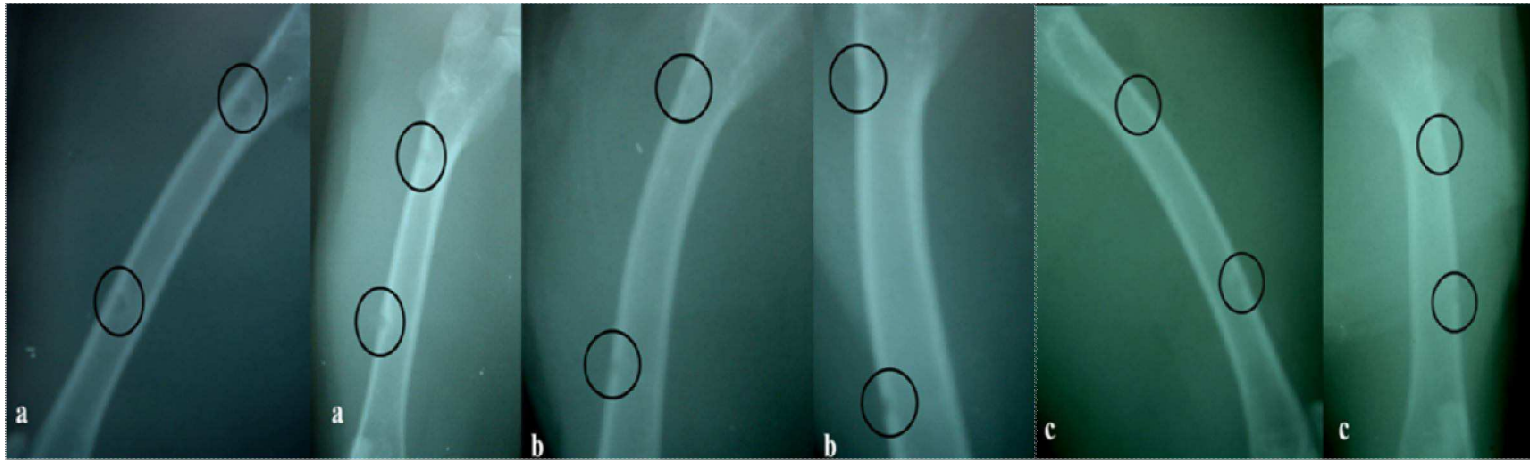


Figura 1: Radiografias nas projeções ML e CC dos fêmures. Os círculos indicam os locais das osteotomias. a – Imediatamente após a cirurgia; b – 30 dias após o procedimento (notar aumento de radiopacidade nas bordas da osteotomia); c – 60 dias de pós-operatório (locais osteotomizados totalmente cicatrizados).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O período trans-operatório transcorreu normalmente sem complicações. Todos os animais apoiaram os membros operados no pós-operatório imediato e não apresentaram nenhum grau de claudicação, provavelmente devido ao pequeno tamanho da lesão óssea provocada e ao uso da analgesia empregada. Resultados similares foram relatados por Rezende et al.¹³.

Os animais apresentaram evolução clínica normal, não se observando quaisquer sinais de infecção ou complicação, ocorrendo cicatrização por primeira intenção em todas feridas cirúrgicas, justificada pela rigorosa assepsia e técnica cirúrgica adequada durante o procedimento, em conjunto com uma antibioticoterapia e manejo da dor adequado, concordando com os resultados relatados por Freitas et al.¹⁴. Nenhum animal apresentou sinais de rejeição aos implantes, comprovando a característica de biocompatibilidade dos fosfatos de cálcio, conforme relatado por Moraes et al.¹ e Vital et al.¹⁵.

Cinco animais apresentaram edema leve e sensibilidade dolorosa ao toque na região operada durante os três primeiros dias de pós-operatório, 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, resultados que podem ser considerados normais devido à manipulação cirúrgica dos tecidos moles. Esses achados são similares aos encontrados por Duarte et al.¹⁶.

Segundo Kealy e Mcallister¹⁷, o aumento da radiopacidade óssea está relacionado com a neoformação tecidual do osso. No presente estudo, evidenciou-se diferença estatística significativa entre TCP/HA e HA aos 60 dias em relação ao CPP700 e CPP900 do grupo 30 dias e ao CPP700 do grupo 60 dias (Tabela 1), podendo esse fato ser atribuído a característica da hidroxiapatita e do trifosfato de cálcio, que são excelentes osteocondutores e favorecerem o processo de cicatrização óssea mais rápida¹⁸. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Miranda et al.¹¹ e Vital et al.¹⁵.

Tabela 1: Média ou mediana e desvio padrão ou intervalo interquartil da radiopacidade da lesão óssea, conduzida pelos biomateriais entre os momentos e grupos

Implantes/Grupos	30 dias	60 dias
CPP700	6,0±1,3 ^{AB}	5,9±1,3 ^{a b}
CPP900	5,9±1,1 ^C	6,2±1,6
TCP/HA	6,0±1,0	6,8±0,9 ^{aA}
HA	6,0±1,0	7,0±1,2 ^{bBC}

Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais em colunas diferentes denotam diferença estatística ($p < 0,05$).

Os exames histológicos realizados neste estudo possibilitaram analisar os estímulos induzidos pelos biomateriais durante o período de reparação óssea proposto neste experimento. Foi observado aos 30 dias, na interface osso-implante que recebeu o CPP700 e CPP900, pequena irregularidade do endóstio e perióstio, pequena atividade osteoblástica e osteoclástica com pouca deposição de tecido conjuntivo. Já com os implantes TCP/HA e HA aos 30 dias, foi observado irregularidade do endóstio e perióstio, atividade osteoblástica e osteoclástica e deposição de tecido conjuntivo mais evidente que os demais biomateriais.

Aos 60 dias, todas as reações observadas foram mais evidentes que aos 30 dias, e os implantes TCP/HA e HA estimularam ainda mais essas reações, demonstrando maior capacidade de estímulo. Observou-se também que o tecido conjuntivo aos 60 dias diminuiu, e houve maior deposição de tecido ósseo primário nos biomateriais TCP/HA e HA, enquanto no CPP700 e CPP900 o tecido conjuntivo aumentou com pouca deposição de tecido ósseo.

Os biomateriais são utilizados nas cirurgias ósseas com o objetivo de reconstrução óssea, e seu desempenho depende de alguns fatores como composição e poder osteogênico¹⁹. A formação óssea depende do contato dos materiais com o perióstio e endóstio, já que nestes tecidos há presença de células osteoprogênicas que são ativadas durante o processo de regeneração óssea^{6 11}. Sendo assim, a irregularidade do endóstio e do perióstio observada neste estudo indica a atividade destas estruturas no processo de reparo ósseo, sendo essa irregularidade mais evidente aos 60 dias em todos os grupos.

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 matriz²⁰. Neste estudo, os materiais TCP/HA e HA proporcionaram maior estimulação destas células tanto aos 30 dias como aos 60 dias, tendo sido aos 60 dias esta estimulação mais evidente. Esses resultados são devidos à ação osteocondutiva e da osteotransdutividade desses biomateriais, concordando com Dória Neto². Através desses processos os substitutos ósseos são degradados, reabsorvidos e substituídos, na mesma proporção, por tecido ósseo neoformado, conforme observado por Borges et al.³.

De acordo com Vital et al.¹⁵, o tecido conjuntivo é substituído por tecido ósseo no decorrer do processo cicatricial, que segundo Fehlbeg²¹ é um evento considerado normal nas cirurgias ósseas, o que justifica a diminuição gradativa de tecido conjuntivo encontrado na interface osso-implante TCP/HA e HA aos 60 dias, enquanto no CPP700 e CPP900 houve um aumento desse tecido, demonstrando uma capacidade osteocondutiva menor que os demais implantes.

Como pode ser observado na Tabela 2, a formação óssea primária foi maior nos biomateriais TCP/HA e HA tanto aos 30 como aos 60 dias ($P < 0,05$), sendo ainda mais expressivo aos 60 dias (Figura 2). Esse fato comprova capacidade osteocondutiva e uma osteotransdutividade diferentes entre os fosfatos de cálcio, de modo que a regeneração óssea possa acontecer de forma mais rápida, dependendo do implante utilizado²². Isso se deve pela característica físico-química de cada biomaterial, que quanto menor a relação de Ca/P, mais facilmente e rapidamente esse implante é absorvido pelo organismo, não sendo formada matriz óssea na mesma proporção de absorção, para reparar a lesão óssea²³. Dessa forma pode-se observar que os CPP700 e 900 foram absorvidos muito mais rapidamente que os demais implantes com formação óssea menor nos dois momentos. Pôde-se notar aos 30 dias, que o TCP/HA conduziu uma deposição de tecido ósseo maior, isso por que o TCP é absorvido mais rapidamente que a HA, pois é um material mais denso. Essa associação é importante, pois o TCP é biodegradado e substituído por tecido ósseo mais rapidamente e a HA mantém esse processo por mais tempo²³ como observado aos 60 dias.

Tabela 2: Média ou mediana e desvio padrão ou intervalo interquartil da área em μm^2 obtidos pela histomorfometria do tecido ósseo neoformado conduzido pelos biomateriais entre os momentos e grupos.

Grupos/Momentos	30 dias	60 dias
CPP700	37.458±27.398 ^{abABC}	74.135±32.497 ^{abA}
CPP900	49.847±115.705	82.742±47.714 ^c
TCP/HA	105.202±59.411 ^a	115.566±35.902 ^{aB}
HA	88.975±105.591 ^b	140.021±42.690 ^{bcC}

Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais em colunas diferentes denotam diferença estatística ($p < 0,05$).

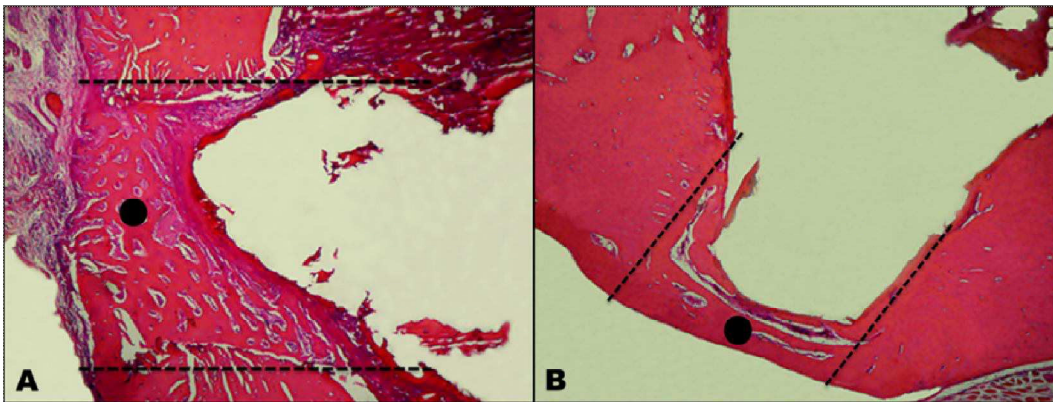


Figura 2: As linhas pontilhadas demarcam o local onde foi realizada a osteotomia e colocação dos implantes de fosfato de cálcio (interface osso-implante). A (●) representa o tecido ósseo neoformado. A figura **A** demonstra a interface osso-implante que recebeu o TCP/HA 30 dias. A figura **B** recebeu o CPP900 60 dias. Notar quantidade significativamente maior de tecido ósseo neoformado em **A** em relação a **B**. Obj. 4x (HE).

REFERÊNCIAS

1 MORAES, P. C.; PADILHA FILHO, J. G.; CANOLA, J. C.; SANTOS, L. A.; MARCORIS, D. G.; ALESSI, A. C.; CASTRO, M. B.; DÓRIA NETO, F. A. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. **Acta Cir Bras**, v. 19, jul-ago. 2004.

2 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.

3 BORGES, A. P. B.; REZENDE, C. M. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MELO, E. G.; NÓBREGA NETO, P. I. 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.

4 KARVAT, F.; CAMARGO, N. H. A.; SOARES, C.; BELLINI, O. J.; SILVA, R. F.; TOMIYAMA, M.; FOLGUERAS, M. V.; E GEMELLI, E. Elaboração e caracterização de um biomaterial compósito a partir de uma matriz fosfato de cálcio/ Al_2O_3 - α para aplicação como implante e restituição óssea. **Revista Matéria**, v. 10, n. 1, p. 43 – 50, 2005.

5 LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v.395, p.81-98, 2002.

6 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.

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

8 EISENBERGER, P. Biomaterials and medical implant science: present and future perspectives:a sumary report. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.32, p. 143-147, 1996.

9 RHEE, S. H. Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical tretment. **Biomaterials**, v.23, n.6, p.1143-1150, 2002.

10 LOPES, M. A.; MONTEIRO, F. J.; SANTOS, J. D. Glass reinforced hydroxyapatite composites: secondary phase proportions and densification effects on bioactive bending strength. **J Biomed Mater Res**, vol. 48, p.734-740, 1999.

11 MIRANDA, E. S.; CARDOSO, F. T. S.; FILHO, J. F. M.; BARRETO, M. D. R.; TEIXEIRA, R. M. M.; WARDERLEY, A. L.; FERNANDES, K. E. 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.

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

13 REZENDE, C. M. F.; BORGES, A. P. B.; BERNIS, W. O.; MELO, E. G.; NÓBREGA NETO, P. I. 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.

14 FREITAS, S. H.; DÓRIA, R. G. S.; MENDONÇA, F. S.; NETO, J. E.; CAMARGO, L. M. Aspecto radiológico de heteroenxerto ósseo cortical fragmentado na reparação de falhas ósseas em coelhos. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.15, n.3, p. 107-110, 2008.

15 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.

16 DUARTE, T. S.; BORGES, A. P. B.; LAVOR, M. S. L.; FILGUEIRAS, R.; TSIOMIS, A. C.; FÓFANO, G.; ODENTHAL, M. E.; PONSTESL, K. C. S. 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.

17 KEALY, J. K.; McALLISTER, H. **Radiografia e ultra-sonografia do cão e do gato**. Barueri: Manole, 2005.

18 FRANCO, K. L.; BORGES, A. P. B.; VILÓRIA, M. I. V.; FERNANDES, E. S.; FEHLBERG, A. F. Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tíbia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, p.431-436, 2001.

19 TADJOEDIN, E. S.; DE LANGE, G. L.; BRONKER, A. L. J. J.; LAYARUU, D. M.; BURGER, E. H. Scanning electron microscopy (SEM) and mycroanalysis (EDS) applied to the study of biomaterial for dental use. **Minerva Stomatol.**, vol.44, n.1-2, p.55-68, 2003.

20 MARX, R. E.; GARG, A. K. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. **Implant Dent**, vol. 7, p.267-276, 1998.

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

22 DRIESSENS, F. C.; PLANELL, J. A., BOLTONG, M. G.; KHAIROUN, I.; GINEBRA, M. P. Osteotransductive Bone Cements. **Proc Inst Mech Eng [H]**. v.212, n.6, p.427-35, 1998.

23 GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Quim. Nova**. Vol. 33, p. 1352-1358, 2010.

RESUMO. – O objetivo deste trabalho foi comparar o uso de diferentes fosfatos de cálcio na reparação óssea em coelhos. Foram utilizados 20 coelhos adultos, de ambos os sexos, da raça Nova Zelândia, pesando em média $2,5 \pm 0,41$ kg. 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. Foram utilizados quatro implantes de fosfatos de cálcio que constituíram os grupos. Os materiais foram introduzidos em defeitos criados cirurgicamente na metáfise proximal e distal de cada fêmur, de modo que os CPP 700 e 900 foram introduzidos no membro esquerdo, enquanto o TCP/HA e HA no membro direito. Foram realizadas avaliações clínico-cirúrgicas diárias e radiográficas antes e após a cirurgia e aos 30 e 60 dias do pós-operatório. Os animais apresentaram evolução clínica normal. Na avaliação radiográfica observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos, com maior grau de radiopacidade nas lesões preenchidas pelos implantes TCP/HA e HA. Na avaliação histológica, por meio de microscopia de luz e análise morfométrica, os materiais TCP/HA e HA proporcionaram maior neoformação óssea ao redor dos implantes do que com os CPP700 e CPP900, fato este observado aos 30 e 60 dias de avaliação.

Palavras-chave: Biomateriais, fosfatos de cálcio, cicatrização óssea, cirurgia.

ABSTRACT. - The aim of this study was to compare the use of different calcium phosphates in bone repair in rabbits. Twenty rabbits of both sexes, New Zealand breed, weighing in average 2.5 ± 0.41 kg were used. Animals were randomly divided according with two experimental moments, being 10 animals euthanized 30 days after surgery, and 10 euthanized 60 days after surgery. Four implants of calcium phosphate which constituted the groups were used. Materials were introduced into the proximal and distal metaphysis of each femur so that CPP 700 and 900 were introduced into the left limb, while TCP/HA and HA in the right limb. Clinical-surgical assessments were performed daily, and radiographic assessments were made before and after surgery and at 30 and 60 days post-operatively. All animals showed normal clinical progression. At the radiographic assessments statistical difference ($p < 0.05$) was observed between groups, with higher radiopacity in lesions filled by TCP/HA and HA implants. At the histological evaluation by light microscopy and morphometric analysis, materials TCP/

HA and HA showed better bone formation around the implants than CPP700 and CPP900, and that was also observed at 30 and 60 days of evaluation.

Key-words: Biomaterials, calcium phosphate, bone healing, surgery.

CAPÍTULO II

Avaliação da utilização da hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea no reparo do tecido ósseo em coelhos. Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico.

Manuscrito a ser submetido à revista *Brasílian Journal of veterinary Research and Animal Science* – ISSN 1413-9596.

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA E QUITOSANA
ISOLADAS E ASSOCIADAS À MEDULA ÓSSEA NO REPARO DO TECIDO
ÓSSEO EM COELHOS. ESTUDO CLÍNICO-CIRÚRGICO, RADIOLÓGICO E
HISTOLÓGICO.**

Adílfo Santos de Azevedo , Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá, Marcus Vinícius Lia Fook,
Pedro Isidro da Nóbrega Neto, José Alan S. Araújo, Sérgio Santos de Azevedo.

**Evaluation of the utilization hydroxyapatite and chitosan isolated and associated
with bone marrow in repair of bone tissue in rabbits. Clinical-surgical, radiological
and histological study.** Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde
e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, 58700-970,
Brazil. E-mail: adílfo_vet@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Atualmente, estamos vivenciando o advento da ciência e tecnologia no desenvolvimento de estudos que visam buscar alternativas viáveis para serem aplicadas nas diversas áreas profissionais. Neste contexto, vem sendo crescente a associação da cirurgia reparadora com a engenharia de materiais, no que se diz respeito ao desenvolvimento de estudos científicos acerca da regeneração óssea com auxílio dos biomateriais e células da medula óssea. Essas pesquisas tentam disponibilizar alternativas para maximizar e acelerar o processo de reparo ósseo em várias patologias inerentes a este tecido sem risco a saúde dos pacientes.

Vários são os biomateriais desenvolvidos e aplicados em modelos animais para obtenção de uma regeneração óssea mais rápida, tais como os cimentos de fosfato de cálcio e os biopolímeros^{1 2 3 4}. Mais recentemente vem sendo crescente a associação destes materiais a células da medula óssea, com o objetivo de se obter a cito diferenciação das células tronco em osteoblastos e assim ocorrer a formação mais rápida

do calo ósseo^{5 6}. Dentre os cimentos de fosfatos de cálcio mais utilizados em cirurgias óssea, a hidroxiapatita é a que apresenta maior destaque, pois, apresenta formulação físico-química semelhante a do osso, possibilitando assim substrato para que ocorra o processo de osteocondução⁷. Sua estrutura química é representada pela fórmula $C_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, sendo assim um material bioativo e biocompatível, proporcionando assim boa incorporação no tecido ósseo^{8 9}.

A quitosana é extraída da quitina, que é um dos biopolímeros mais abundantes na natureza. Pode ser extraída da carapaça dos crustáceos, do exoesqueleto de insetos e até mesmo da parede celular dos fungos. A quitosana vem ganhando destaque em pesquisas médicas nos últimos anos por sua possível capacidade reparadora tecidual^{10 11}. Sua fórmula química é representada por 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranoose, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$. Genericamente sua estrutura molecular é $(C_6H_{11}O_4)_N$, sendo classificado como um polissacarídeo e apresentando estrutura molecular bem semelhante a celulose^{12 11}. Apresenta-se como um material biocompatível, atóxico e biodegradável, caracterizando-se clinicamente como adsorvente de gorduras, cicatrizante, antimicrobiano, analgésico, hemostático e também vem sendo utilizado como meio de liberação controlada de drogas¹³. Experimentos realizados apontam que a quitosana tem capacidade de favorecer neoformação óssea por estimular a liberação de fatores indutores celulares, as citocinas, favorecendo a angiogênese e osteogênese^{14 15}.

A medula óssea (MO) é o principal órgão hematopoiético nos animais e no homem, apresentando várias linhagens celulares que a compõe. Dentre essas células, estão incluídas as células-tronco multipotentes, conhecidas também como mesenquimatosas, responsáveis pela origem de vários tipos celulares. Essas células apresentam-se em repouso, sendo ativadas pelos estímulos ambientais e humorais inerentes dos tecidos e dos fatores de crescimento^{16 17}. As principais características destas células são proliferação indefinida, multifuncionalidade, auto-renovação e capacidade de regeneração tecidual¹⁸. As principais vantagens da utilização da MO em cirurgias é a mínima invasão na extração, simplicidade do procedimento e não requerer material especializado¹⁹. Inúmeros trabalhos vêm sendo realizados com células da MO com a perspectiva de regeneração do tecido lesionado, tais como tecido cardíaco, nervoso, dentário e ósseo^{20 21 22}, porém várias informações a respeito da interação entre a MO e os biomateriais ainda faltam para a utilização rotineira dessa associação.

Devido à busca constante de materiais e procedimentos que possam acelerar o processo de regeneração óssea com o mínimo de efeitos indesejáveis nos pacientes, o

presente trabalho teve como objetivo avaliar o processo de regeneração óssea em coelhos através da utilização da hidroxiapatita e da quitosana isoladas e associadas a MO, observando qual dos tratamentos empregados estimula uma maior e mais rápida neoformação óssea.

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/UFCEG), segundo protocolo de aprovação nº 100/2008.

Neste experimento utilizou-se 20 coelhos adultos, de ambos os sexos, da raça Nova Zelândia, pesando em média $3,0\pm 0,41$ 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 momento, de acordo com o período de eutanásia (30 ou 60 dias após o procedimento cirúrgico). Os animais foram alocados em gaiolas individuais, vermifugados com albendazol^a 5% na dose de 20mg/kg por via oral 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.

Os tratamentos utilizados e a aplicação dos implantes foram distribuídos da seguinte forma: quitosana (QUI) na metáfise proximal e hidroxiapatita de razão 1,67 (HA) na metáfise distal, ambas no fêmur esquerdo. No fêmur direito, além dos implantes introduzidos na mesma posição utilizada no fêmur esquerdo, ainda foi acrescido 0,25mL de MO cobrindo a interface osso/implante. A MO foi aspirada do trocanter maior do fêmur direito imediatamente antes de ser utilizada. Os implantes utilizados neste estudo foram fornecidos pelo Grupo de Biomateriais do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCEG) e apresentavam formato cilíndrico com 2 mm de diâmetro e 5 mm de comprimento, com 100 a 300 µm de porosidade, tendo sido auto-clavados antes do uso.

Após a tricotomia, realizou-se a medicação pré-anestésica com acepromazina^b, na dose de 1mg/kg por via intravenosa (IV) e anestesia com zoletil^c na dose de 15mg/kg

^a Ibazole 5% - IBASA

^b Acepran 1% - VETNIL

IV. Após antissepsia da área operatória com solução de clorexidine^d a 0,5%, fez-se uma incisão cutânea ao longo da margem craniolateral da diáfise femoral e divulsão do tecido subcutâneo e muscular. Foi feita ressecção longitudinal do perióstio e dois orifícios foram construídos, um na metáfise proximal e outro na distal com broca cirúrgica de 2,0 mm de diâmetro para colocação dos implantes. Após a introdução dos implantes foi realizado a síntese dos tecidos. Este procedimento foi realizado nos dois membros pélvicos.

No pós-operatório os animais receberam enrofloxacin^e na dose de 10mg/kg por via intramuscular (IM) uma vez ao dia durante 5 dias e meloxicam^f na dose de 0,2 mg/kg IM 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 fisiológica e kuraderm prata^g 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.

Foram realizadas radiografias na projeção craniocaudal e mediolateral dos membros operados, antes e imediatamente após a cirurgia, com 30 e 60 dias de pós-operatório, visando acompanhar o processo de reparação óssea. A avaliação radiográfica foi realizada de forma objetiva, em que se mediu com auxílio de um paquímetro a espessura do osso em uma linha reta entre as duas margens do córtex ósseo, a qual compreendeu desde o final da osteotomia da margem do córtex do osso que foi introduzido o implante até a margem contralateral (Figura 1), tendo sido utilizado apenas à projeção craniocaudal para a obtenção das medidas. Os valores obtidos com a medição em cada animal foram somados e calculados para obtenção da média para cada lesão óssea que foi introduzida os implantes, avaliada e submetido à análise estatística.

Os animais foram eutanasiados ao final do período de observação destinado a cada momento, tendo sido colhido os fêmures e em seguida retirados os fragmentos do tecido ósseo que continham os implantes. Os fragmentos ósseos foram submetidos à fixação com formalina tamponada a 10% durante 10 dias. Logo após o material foi lavado em

^c Zoletil 100 – VIRBAC

^d Riohex 0,5% - RIOQUÍMICA

^e Biofloxacin 2,5% - BIOVET

^f Maxicam 0,2% - OURO FINO

^g Kuraderm Prata - AVIPEC

água corrente e descalcificado em mistura de partes iguais de solução de ácido fórmico 5% + ácido clorídrico 5% durante 14 dias. Os fragmentos foram incluídos em parafina líquida e posteriormente cortados em fatias transversais de 5µm de espessura dos blocos e montados em lâminas histológicas. De cada bloco foram obtidas quatro lâminas, sendo estas submetidas às técnicas 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.

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.

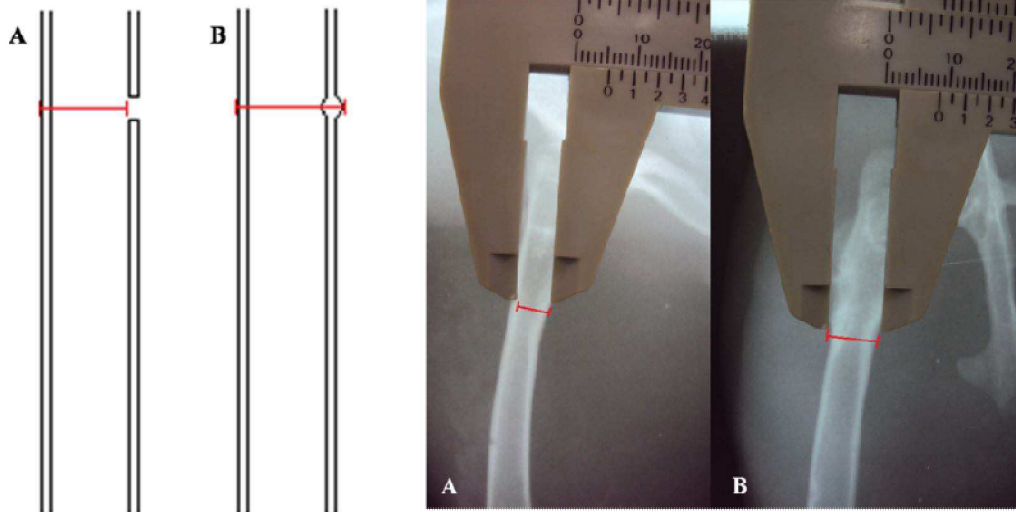


Figura 1: Desenho esquemático (esquerda) e radiografias com processo de mensuração da osteotomia (direita). Medição logo após a cirurgia (letra A) e com presença de calo ósseo (letra B).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhum animal deste experimento apresentou sinais de dor no pós-operatório, e não foi observado claudicação dos membros operados durante todo o período experimental. Esses fatos podem ser explicados pelo tamanho da lesão óssea provocada que foi pequena não provocando processo inflamatório exacerbado e ao uso da analgesia empregada com o meloxicam, fármaco muito eficaz para minimizar dor óssea uma vez que atua no local da lesão diminuindo o processo inflamatório²⁴.

A evolução clínica dos animais procedeu-se de forma normal, sem presença de processo infeccioso nem deiscência de pontos, ocorrendo cicatrização em todas feridas cirúrgicas nos 10 primeiros dias de pós-operatório. A ausência de complicações só é conseguida através da prática adequada da assepsia e técnica cirúrgica apropriada durante o procedimento, em conjunto com uma antibioticoterapia bem executada²⁵. Nenhum animal apresentou sinais de rejeição aos implantes, comprovando a característica de biocompatibilidade dos mesmos^{26 27}.

O estudo radiográfico realizado neste experimento é justificado para isentar qualquer tipo de alteração na morfologia óssea dos animais, e também para acompanhar o processo de cicatrização das osteotomias realizadas. A avaliação da cicatrização óssea pela obtenção dos valores justifica-se pela mineralização das lesões que são recobertas por calo ósseo, os quais podem ser mensurados.

Na comparação estatística das médias dos grupos e seus respectivos controles radiográficos, houve diferença estatística em todos, com exceção dos grupos HA e HAMO 60 dias. Esse fato pode ser explicado pelo tempo de 60 dias de avaliação, pois nesse período o tecido ósseo neoformado entra em processo de remodelação e o calo ósseo formado é absorvido e substituído por tecido maturo²⁸. Na avaliação entre os grupos, houve diferença estatística entre o QUIMO 30 dias com o HA e HAMO 60 dias, entre o QUI e QUIMO 30 dias com o HA 30 dias, QUIMO 60 dias com HA 30 dias, HAMO 30 dias com HA 60 dias e HAMO 30 COM HAMO 60 dias (Tabela 1).

Tabela 1: Média ou mediana e desvio padrão ou intervalo interquartil da espessura óssea em mm, utilizada para acompanhar o processo de cicatrização óssea induzida pelos tratamentos entre os momentos e grupos.

Grupos/Momentos	Controle radiográfico 30 dias	30 dias	Controle radiográfico 60 dias	60 dias
QUI	6,25±0,92	9,1±1,95	6,5±0,96	8,8±1,50
HA	6,6±0,49	7,8±0,96	6,6±1,20	7,6±1,02
QUIMO	6,9±0,69	9,75±0,88	6,7±0,99	9,0±0,87
HAMO	6,8±0,70	8,6±0,51	6,8±0,63	7,6±0,83

Pôde-se observar na avaliação radiográfica que a quitosana associada à medula óssea foi superior no processo de cicatrização óssea. Esse fato pode ser explicado devido à quitosana ser um biopolímero bioativo e que induz a mineralização do tecido conectivo oriundo do processo de reparação tecidual, pois atua atraindo íons de fosfato de cálcio^{29 30}. Ratificando esse processo Muzzareli et al.¹⁴, observou em seu estudo que a quitosana participa no processo de liberação de citocinas, favorecendo assim a osteogênese. Aliado à característica da quitosana em regeneração óssea, a medula óssea é fonte de células-tronco multipotentes, tendo assim capacidade de diferenciação de várias linhagens celulares, incluído as células ósseas. Assim o processo regenerativo é maximizado, pois há associação de fatores com capacidade de crescimento tecidual como as citocinas e estímulos locais para a diferenciação celular^{31 32 33}. Também se observou que a Hidroxiapatita associada à medula óssea proporcionou mineralização da osteotomia superior em relação à utilização da hidroxiapatita isolada, atribuindo esse fato possivelmente ao poder terapêutico regenerativo da medula óssea com a capacidade osteocondutiva da hidroxiapatita^{34 35}.

Na avaliação histológica, pôde-se observar aos 30 dias de pós-operatório, na interface osso-implante que recebeu a quitosana, endósteo e periósteo irregular com reação celular intensa, muitos osteoblastos e osteoclastos ativos, grande quantidade de fibroblastos e tecido conjuntivo, intensa neoformação vascular (Figura 2B), tecido ósseo imaturo em volta de todo o implante (Figura 2A) com cicatrização avançada da lesão e presença de células mesenquimais em processo de diferenciação. A interface preenchida pela associação de quitosana e medula óssea apresentava-se com as mesmas reações observadas com a quitosana isolada (Figura 2C e D), porém havia maior quantidade de células mesenquimais em processo de diferenciação. Já na interface que recebeu a HA, observou-se endósteo e periósteo bem regulares com presença de pouca celularidade, pequena atividade osteoblástica e osteoclástica, presença de pequena quantidade de fibroblastos com pouca deposição de tecido conjuntivo, pouca neoformação vascular e menos tecido ósseo neoformado (Figura 2E) em comparação com o grupo QUI e QUIMO. Na avaliação da lesão óssea que foi preenchida pela HA associada à medula óssea, observaram-se as mesmas reações encontradas na HA isolada, porém havia maior quantidade de fibroblastos e fibras colágenas, neovascularização e neoformação óssea comparado ao grupo HA.

Nos animais eutanasiados aos 60 dias de pós-operatório, na interface osso-implante que recebeu a quitosana, foi observado que o periósteo apresentava-se menos irregular

em relação aos 30 dias, os osteoclastos estavam em maior quantidade, ainda com muito tecido ósseo neoformado em volta de todo o implante (Figura 2F) e presença de células mesenquimais em diferenciação (Figura 2G). A interface preenchida pela associação de quitosana e medula óssea permanecia com intensa atividade celular e a cicatrização da lesão óssea encontrava-se avançada com muito tecido ósseo neoformado em volta do implante (Figura 2H), ainda com presença de células mesenquimais indiferenciadas em atividade na região da interface osso/implante. Na interface que recebeu a HA, observou-se que as reações permaneciam muito discretas, com defeito ósseo em processo de cicatrização. Na avaliação da lesão óssea que foi preenchida pela HA associada à medula óssea, observou-se regularidade endosteal e periosteal com pouca celularidade (Figura 2I), pouca quantidade de osteoblastos, porém os osteoclastos estavam em maior quantidade comparada ao grupo HAMO 30 dias.

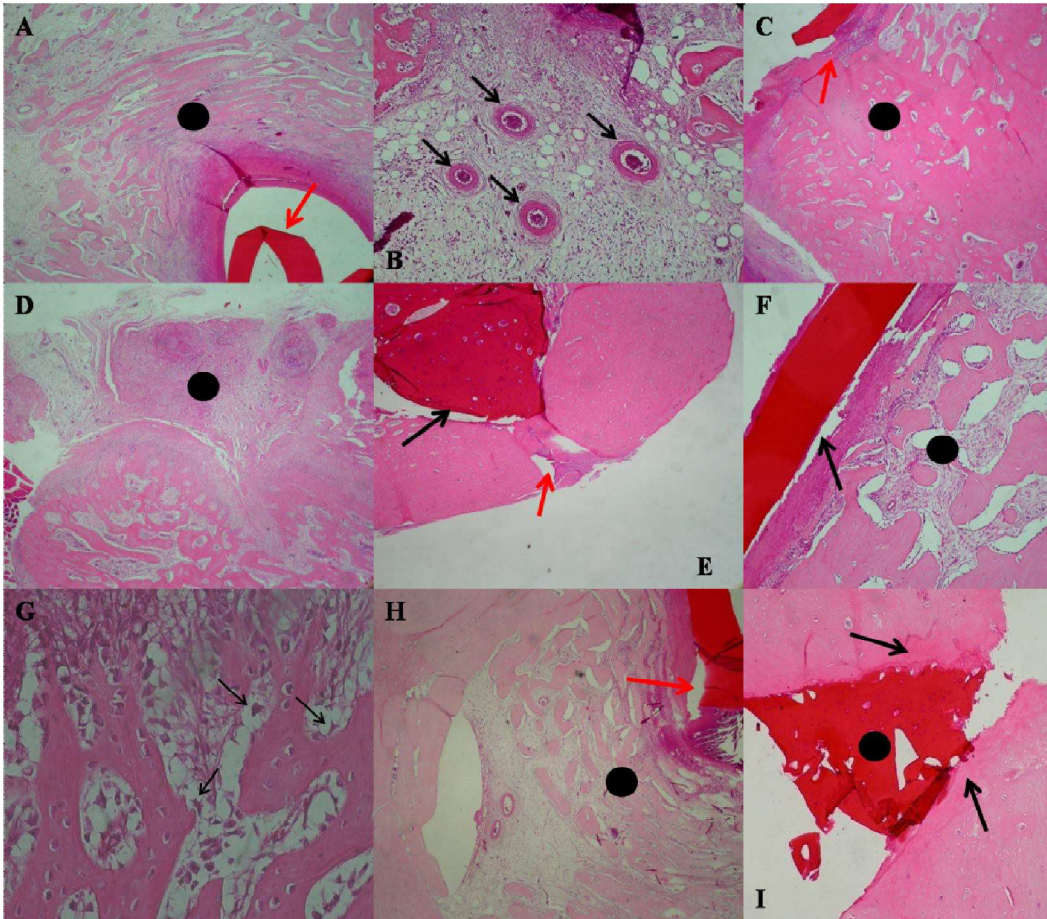


Figura 2: A - tecido ósseo imaturo em volta do implante na região medular do osso (●) e seta vermelha mostrando a quitosana Obj. 4x (HE). B - setas pretas mostrando vasos sanguíneos Obj. 10x (HE). C - intensa neoformação óssea (●) em contato com a quitosana (seta vermelha) Obj. 4x (HE). D - grande quantidade de tecido conjuntivo (●) acima da lesão óssea já preenchida por tecido ósseo Obj 4x (HE). E - pouco tecido ósseo neoformado preenchendo a lesão (seta vermelha) em comparação aos grupos QUI e QUIMO e endósteo regular em contato com a hidroxiapatita (seta preta) Obj. 4x (HE). F - interface osso/implante com muita celularidade em contato com a quitosana (seta preta), com muito tecido ósseo neoformado (●) Obj. 10x (HE). G - células mesenquimais em diferenciação (setas pretas) Obj. 40x (HE). H - presença de muito tecido ósseo neoformado (●) em volta do implante (seta vermelha) Obj. 4x (HE). I - hidroxiapatita (●) com pouco tecido ósseo em volta (setas pretas) sem presença de celularidade Obj.4x (HE)

Na avaliação histológica descritiva comparativa, observou-se que os grupos QUI e QUIMO em ambos os momentos estudados, estimularam reações mais acentuadas que os outros grupos. Esse fato é explicado pelas características da quitosana, que é um polissacarídeo catiônico que apresenta estrutura semelhante aos glicosaminoglicanos, os quais se apresentam como principais componentes da matriz extracelular de cartilagens e ossos²⁶. Esse biopolímero tem a capacidade de ativar os macrófagos³⁶, porém não se sabe exatamente como ocorre esse processo. A hipótese mais provável foi proposta no estudo de Feng et al.³⁷, no qual foi referido que o processo é mediado por receptores presentes na estrutura do biopolímero, estimulando dessa forma os macrófagos. Essas células em contato com a quitosana liberam citocinas e outros fatores de crescimento que atuam no processo de proliferação celular, promovendo a cicatrização dos tecidos³⁸³⁹. Dessa forma evidenciou-se no presente estudo que a quitosana acelerou e maximizou o reparo ósseo, apresentando grande potencial osteogênico, atuando como um biomaterial osteoindutor, processo esse também observado no trabalho de Ge et al.⁴⁰.

Em relação à implantação da HA isolada e associada à medula óssea durante o tempo experimental, foi evidenciado que o tecido ósseo neoformado por esses dois tratamentos foi discreto comparado aos demais grupos, fato esse explicado pela capacidade deste biomaterial de estimular apenas a osteocondução, porém sem capacidade osteoindutora⁴¹⁷, diferentemente da quitosana que estimula a citodiferenciação⁴⁰. Como sua relação de Ca/P é 1,67 e seus poros são relativamente pequenos, a HA apresenta um tempo maior de biodegradação que outros fosfatos de cálcio⁴², nesse contexto puderam ser notados menores reações e celularidades na interface osso/implante da HA em relação à quitosana, durante o tempo experimental.

No presente trabalho, foi evidenciado que a associação da medula óssea com a quitosana promoveu um aumento na diferenciação das células mesenquimais, porém as demais reações histológicas não diferiram muito daquelas observados com o grupo QUI. Já a associação da MO com a HA, observou-se apenas melhores resultados comparado com a HA isolada. Esse fato pode ser explicado pela composição da MO que é rica em células mesenquimais indiferenciadas e fatores de crescimento, que atuam acelerando o processo de osteogênese⁴³⁴⁴. No estudo de Krzymanski et al.⁴⁵, ele ratificou outros estudos demonstrando que a aplicação de medula óssea a fresco diretamente na lesão óssea promovia a indução celular, acelerando assim o processo de cicatrização óssea. Em outro experimento desenvolvido por Muschler e Midura⁴⁵, foi

evidenciado que a associação da MO com biomateriais promovia maior deposição de osso em defeitos em comparação a MO isolada.

REFERÊNCIAS

- 1 EISENBERGER, P. Biomaterials and medical implant science: present and future perspectives: a summary report. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.32, p. 143-147, 1996.
- 2 KLOKKEVOLD, P.R.; VANDEMARK, L.; KENNEY, E. B.; BERNARD, G.W. Osteogenesis enhanced by chitosan poly(*N*-acetyl glucosaminoglycan) in vitro. **J Periodontol.** p. 1170–1175, 1996.
- 3 RHEE, S. H. Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical treatment. **Biomaterials**, v.23, n.6, p.1143-1150, 2002.
- 4 SAKATA, M. M.; ALBERTO-RINCON, M. C.; DUEK, E. A. R. Estudo da Interação Polímero/Cartilagem/Osso Utilizando Poli (Ácido Lático-co-Ácido Glicólico) e Poli (p-Dioxanona) em Condilo Femural de Coelhos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia.** vol. 14, n. 3, p. 176-180, 2004.
- 5 ABUKAWA, H. et al. Formation of a mandibular condyle *in vitro* by tissue engineering. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.61, p.94-100, 2003.
- 6 SHIMAKURA, Y.; YAMZAKI, Y.; UCHINUMA, E. Experimental study on bone formation potential of cryopreserved human bone marrow mesenchymal cell/hydroxyapatite complex in the presence of recombinant human bone morphogenetic protein-2. **J Craniofac Surg.** v. 14, p. 108–116, 2003.
- 7 LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v.395, p.81-98, 2002.
- 8 GAO, T. J.; LINDHOM, B.; KOMMONEN, P.; RAGNI, P.; PARONZINI, A.; LINDHOLM, T. C. Microscopic evaluation of bone implant contact between hydroxyapatite, bioactive glass and tricalcium phosphate implanted in sheep diaphyseal defects. **Biomaterials.** v. 16, p. 1175-1179, 1995.

- 9 BORGES, A.P.B. *O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia, de cães (Canis familiares). Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodispersão.* Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1998. 112p. (Tese, Doutorado).
- 10 KHAN, T. A.; PEH, K. K. A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science.* v. 6, p. 20-26, 2003.
- 11 AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M.V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos.** v. 23, p. 27-34, 2007.
- 12 TONHI, E.; PLEPIS, A. M. G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **QUÍMICA NOVA.** v. 25, p. 943-948, 2002.
- 13 SENEL, S.; McCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Review.** v. 56, p.1467–1480, 2004.
- 14 MUZZARELI, R. A. A.; MATTIOLI-BELMONTE, M.; TIETZ, C.; BIAGINI, R.; FERIOLI, G.; BRUNELLI, M. A.; FINI, M.; GIARDINO, R.; ILARI, P.; BIAGINI, G. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. **Biomaterials.** v. 15. p. 1075-1081, 1994.
- 15 WANG, X.; MA, J.; WANG, Y.; HE, B. Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. **Biomaterials.** v. 23, p. 4167-4176, 2002.
- 16 TYLER, R. D.; COWELL, R. L. Sistema Hematopoiético Fisiologia e Fisiopatologia. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais.** 1ed. São Paulo: Manole, p.1120-1128, 1998.

17 DOSS, M.; KOEHTER, C.; GISSEL, C.; HESCHELER, G.; SOCHIRINDIA, A. Embryonic Stem Cell: a promising tool for cell replacement therapy. **J Cell Mol Med.** v. 8, p.465-473, 2004.

18 SILVEIRA, C. D.; VIEIRA, S.; SOUZA, F. S. L.; OLIVEIRA, F. T.; MATTOS, V. Z.; MARINS, A. L. C.; MOURA, S. M. Stem cell therapy for cardiology: a new path to humanity and a new care for nurses - a case report. **Online Brazilian Journal of Nursing** [online] 2005 Apr; v.4 n.1, Disponível em: www.uff.br/nepae/objn401silveiraetal.htm. Acesso em 11 de setembro de 2010.

19 LUCARELLI, E.; DONATI, D.; CENACCHI, A.; FORNASARI, P. M. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. **Transfusion and apheresis science**, Oxford, v. 30, p. 169-174, 2004.

20 COLOMÉ, L. M.; GOMES, C.; CROSIGNANI, N.; PAZ, A. H.; LUGO, A. A.; GUIMARÃES, K. M.; FOERSTROW, P. F.; TESSARI, J. P.; COLOMÉ, L. M.; GRAÇA, D. L.; MEURER, L.; PASSOS, E. P. P.; PIPPI, N. L.; CONTESINI, E. A.; LIMA, E. O. C. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. **Ciência Rural.** v. 38, p. 2529-2534, 2008.

21 KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 32, p. 232-242, 2006.

22 SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; CARVALHO, A. C. C. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 37, p. 490-495, 2004.

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

- 24 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.
- 25 McCURNIN, D. M.; JONES, R. Métodos cirúrgicos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 1ed. São Paulo: Manole, p.143-155, 1998.
- 26 KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, vol. 24, no. 13, pp. 2339–2349, 2003.
- 27 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.
- 28 KEALY, J. K.; McALLISTER, H. **Radiografia e ultra-sonografia do cão e do gato**. Barueri: Manole, 436 p. 2005.
- 29 WAN, A. C. A., KHOR, E., WONG, J. M., HASTINGS, G. W. Promotion of calcification on carboxymethylchitin discs. **Biomaterials**. v. 17. p. 1529-1534, 1996.
- 30 KIM, S. K., RAJAPAKSE, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. **Carbohydrate Polymers**. v. 62. p. 357–368, 2005.
- 31 STRAUER, B. E.; BREHM, M.; ZEUS, T.; KÖSTERING, M.; HERNANDEZ, A.; SORG, R. V.; KÖGLER, G.; WERNET, P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. **Circulation**. v. 106. p. 1913-1918, 2002.

- 32 GROTTO, H., NORONHA, J. Identificação de células tronco hematopoiéticas: citometria de fluxo convencional versus contador hematológico automatizado. **Rev Bras Hematol Hemoter.** v. 25. p. 169-172, 2003.
- 33 BITTENCOURT, R., PEREIRA, H., FELISBINO, S., MURADOR, P., OLIVEIRA, A., DEFFUNE, E. Isolamento de células tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta. Ortop. Bras.** v. 14, p. 22-24, 2006.
- 34 FRANCO, K. L.; BORGES, A. P. B.; VILÓRIA, M. I. V.; E.S. FERNANDES, E. S.; FEHLBERG, A. F. Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tíbia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, p.431-436, 2001.
- 35 SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F; MELLO, L. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2005.
- 36 GORZELANNY, C.; PÖPPELMANN, B.; PAPPELBAUM, K.; MOERSCHBACHER, B. M.; SCHNEIDER, S. W. Human macrophage activation triggered by chitotriosidase-mediated chitin and chitosan degradation. **Biomaterials.** v. 31, p. 8556-8563, 2010.
- 37 FENG, J.; ZHAO, L.; YU, Q. Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 317, p. 414-420, 2004.
- 38 UENO, H.; NAKAMURA, F.; MURAKAMI, M.; OKUMURA, M.; KADOSAWA, T.; FUJINAGA, T. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. **Biomaterials.** v. 22, p. 2125-2130, 2001.
- 39 DIPIETRO, L. A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. **Shock.** v. 4, p. 233-240, 1995.

40 GE, Z.; BAGUENARD, S.; LIM, L. Y.; WEE, A.; KHOR, E. Hydroxyapatitechitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. **Biomaterials**. v. 25, p. 1049–1058, 2004.

41 LOPES, M. A.; MONTEIRO, F. J.; SANTOS, J. D. Glass reinforced hydroxyapatite composites: secondary phase proportions and densification effects on bioactive bending strength. **J Biomed Mater Res**, vol. 48, p.734-740, 1999.

42 GUTIERRES, M.; LOPES, M. A.; HUSSAIN, N. S.; CABRAL, A. T.; ALMEIDA, L.; SANTOS, J. D. Substitutos ósseos – Conceitos gerais e estado atual. **Arquivos de Medicina**. v. 19, p. 153-162, 2006.

43 SOUZA, L. C. G.; CARVALHO, K. A. T.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.; HANSEN, P.; FURUTA, M.; MIYAGUE, N.; FRANCISCO, J. C.; OLANDOSKI, M.; WOITOWICZ, V.; SIMEONI, R.; NETO, J. R. F.; BROFMAN, P. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**. v. 20, p. 270-278, 2005.

44 KRZYMANSKI, G.; KALEZAK, M.; WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W. The use of bone-marrowderived fibroblastoid cells and fresh bone marrow in the treatment of bone defects: an experimental study. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg**. v. 26, p. 55-60, 1997.

45 MUSCHLER, G. F.; MIDURA, R. J. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. **Clin Orthop**. v. 395, p. 66–80, 2002.

RESUMO. – O objetivo do presente trabalho foi avaliar o processo de regeneração óssea em coelhos através da utilização da hidroxiapatita e da quitosana isoladas e associadas à medula óssea. Foram utilizados 20 coelhos adultos, de ambos os sexos, da raça Nova Zelândia e pesando em média $3,0 \pm 0,41$ kg. 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. Foram utilizados quatro implantes que constituíram os grupos. 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. A avaliação clínica das feridas cirúrgicas foi feita durante os 10 primeiros dias de pós-operatório. Foram realizadas radiografias dos membros operados, antes e imediatamente após a cirurgia, e com 30 e 60 dias de pós-operatório, visando acompanhar o processo de reparação óssea. Para a avaliação histológica foi realizado estudo comparativo das reações entre os grupos e momentos. A evolução clínica dos animais procedeu-se de forma normal, sem presença de processo infeccioso nem deiscência de pontos, ocorrendo cicatrização em todas feridas cirúrgicas nos 10 primeiros dias de pós-operatório. Na avaliação radiográfica entre os grupos, a quitosana (QUI) isolada e associada à medula óssea (QUIMO) proporcionou um processo de cicatrização óssea superior, caracterizado pela diferença estatística ($p < 0,05$). Na avaliação histológica descritiva comparativa, constatou-se que os grupos QUI e QUIMO em ambos os momentos estudados, estimularam reações mais acentuadas e aceleraram o reparo ósseo.

Palavras-chave: Biomateriais, hidroxiapatita, quitosana, cicatrização óssea, medula óssea.

ABSTRACT. - The aim of this study was to evaluate the process of bone regeneration in rabbits by the use of hydroxyapatite and chitosan only and associated with bone marrow. Twenty rabbits of both sexes, New Zealand breed and weighing in average 3.0 ± 0.41 kg were used. Animals were randomly divided according with two experimental moments, being 10 animals euthanized 30 days after surgery, and 10 euthanized 60 days after surgery. Four implants that constituted the groups were used. Materials were

introduced into the proximal (MP) and distal metaphysis (MD) of each femur, so that chitosan was introduced into the MP and hydroxyapatite into the MD of the left limb, and in the right limb bone marrow was added beyond the implants. Clinical-surgical evaluation of the wounds was made during the first 10 days post-operatively. Radiographs were performed in the operated limbs, before and immediately after surgery, and with 30 and 60 days after surgery aiming to monitor the process of bone repair. For the histological evaluation a comparative study of reactions between groups and moments was carried out. 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. At the radiographic evaluation between groups, chitosan (QUI) alone and associated with bone marrow (QUIMO) resulted in a higher bone healing process with statistical difference ($p < 0.05$). At the comparative descriptive histological evaluation, it was found that the QUI and QUIMO groups in both periods stimulated more pronounced reactions and accelerated bone repair.

Key-words: Biomaterials, hydroxyapatite, chitosan, bone healing, bone marrow.

CONCLUSÕES

Capítulo I

Os resultados obtidos neste experimento permitem concluir que os quatro biomateriais utilizados mostraram-se biocompatíveis, pois nenhum animal apresentou rejeição aos enxertos. Houve diferença radiológica e histomorfométrica significativa em relação aos graus de radiopacidade e formação de tecido ósseo primário respectivamente, demonstrando que os biomateriais TCP/HA e HA proporcionaram uma cicatrização maior que os outros implantes. O método de obtenção dos fosfatos de cálcio utilizado por ser de baixo custo e demonstrou ser um método efetivo de obtenção de biomateriais para regeneração óssea.

Capítulo II

Concluimos neste estudo que os tratamentos empregados mostraram-se biocompatíveis. Na avaliação radiológica, os grupos QUI e QUIMO proporcionaram maior grau de radiopacidade nas lesões preenchidas pela quitosana isolada e associada à medula óssea, evidenciando maior cicatrização óssea. Na avaliação histológica, os grupos QUI e QUIMO estimularam reações celulares mais intensas com deposição de tecido ósseo em maior proporção em relação aos grupos HA e HAMO tanto aos 30 como 60 dias.

ANEXO

Capítulo I submetido à revista: **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.**

São Paulo, 25 de Maio de 2010.

Prezado Autor,

Recebemos o artigo intitulado **“Avaliação de diferentes proporções de fosfato de cálcio na regeneração do tecido ósseo em defeito provocado na metáfise femoral de coelhos: estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico.”**

de autoria de **“Adílio Santos de Azevedo , Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá, Marcus Vinícius Lia Fook, Roseane de Araújo Portela, Sérgio Santos de Azevedo.”**

na categoria de Artigo Completo, cadastrado com o número **037/10.**

Qualquer informação a respeito deste artigo pode ser solicitada diretamente à Seção de Publicação da FMVZ/USP, com as funcionárias da FUMVET, Sra. Cristiane Santos Torralba Orbêa e ou Vânia de Almeida dos Santos

Tel/Fax: 011 – 3091 – 7636/ Tel: 3091- 1472

Pelos e-mails: **cristiane.fumvet@gmail.com/cristiane@fumvet.com.br** e ou

[vania.fumvet@gmail.com/ vania@fumvet.com.br](mailto:vania.fumvet@gmail.com/vania@fumvet.com.br)

Atenciosamente,



Prof.^a. Helenice de Souza Spinosa

Professora Titular FMVZ/USP

Editora Científica do BJVRAS 2009-2012.do

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Normas editoriais

O periódico *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* é publicado bimestralmente pela Fundação de Medicina Veterinária (FUMVET) e destina-se a publicar trabalhos científicos sobre medicina veterinária e ciências afins. Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Comissão Editorial, com assessoria de especialistas da área (*peer review*). A lista de colaboradores (relatores) é publicada no último fascículo/ano de cada volume. Os trabalhos cujos textos necessitem de revisões ou correções que não puderem ser feitas pelos editores serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade dessa revista. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. No momento da submissão do trabalho à revista é obrigatório apresentar a aprovação do protocolo experimental por Comitê de Ética. Qualquer que seja o tipo do trabalho deverá ser inédito e destinar-se exclusivamente a esse periódico, sendo obrigatório anexar declaração assinada por todos os autores expressando concordância no pagamento de tarifa como condicionante à sua publicação. Os trabalhos para publicação deverão ser encaminhados a: Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science Setor de Publicação Av. Prof. Dr. Orlando de Marques Paiva, 87 Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira” CEP 05508-270 – São Paulo – SP – Brasil Telefone: 0055 11 3091 1472/ 3091 7636 Fax: 0055 11 3091 7636 e-mail: bjvras@fumvet.com.br

Artigo completo

1 - Limitar-se ao máximo de dez páginas digitadas, dentro da estrutura do item cinco, não sendo contadas as páginas onde constem tabelas e ilustrações. **2** - Ser escrito em língua portuguesa ou em língua inglesa. **3** - Usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas, não empregando abreviaturas no título do artigo. **4** – Ser estruturado dentro dos seguintes itens: a) Introdução; b) Materiais e Métodos; c) Resultados; d) Discussão; e) Conclusões; f) Referências; g) Resumo/Palavras-chave; Abstract/Key-words. **5** - Apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, nos idiomas inglês e português, não devendo ultrapassar 250 (duzentas e cinquenta) palavras, seguidos das palavras-chave, limitadas a cinco, que correspondem a palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo.

Nota prévia

1 - Limitar-se ao máximo de três páginas digitadas. **2** - Ser escrita em língua portuguesa ou em língua inglesa. **3** – Usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas, não empregando abreviaturas no título do artigo. **4** - Não devem ser subdivididos em seções separadas (Introdução, Materiais e Métodos etc.), mas devem apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, com palavras-chave, conforme descrito na apresentação de Artigo completo, além de referências.

Artigos de revisão

Só poderão ser publicados por especialistas de renome a convite da Comissão Editorial. Não devem ser subdivididos em seções separadas (Introdução, Materiais e Métodos etc.), mas devem apresentar, obrigatoriamente, dois resumos, com palavras-chave, conforme descrito na apresentação de Artigo completo, além de referências.

Apresentação dos trabalhos

1 - Digitação: original em CD, devidamente identificado com o título do artigo e nome do(s) autor(es) e três cópias impressas, inclusive suas tabelas e referências; deve ser digitado, obrigatoriamente, em formato A4 (21,0 x 29,7cm), espaço duplo, em uma só face de papel, margens de 2,5cm, fonte Times New Roman tamanho 10 e numeração consecutiva das páginas. Ilustrações e legendas devem ser relacionadas em folhas separadas. O texto dos artigos deve ser apresentado utilizando-se o editor de texto Microsoft Word. **2 - Página de rosto:** elemento obrigatório, onde deve conter o título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e instituição de origem. **Observar que unicamente nesta página conste a identificação dos autores, para o devido sigilo e imparcialidade.** No rodapé da página deve-se mencionar o endereço completo (inclusive e-mail) do autor para correspondência. Se o artigo for subvencionado, mencionar a instituição que o patrocinou, assim como os agradecimentos; **3 - Tabelas:** devem ser numeradas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, seguido de local e data. Na montagem das tabelas seguir: IBGE. **Normas de apresentação tabular.** 3. ed. Rio de Janeiro: IBGE, 1993. 61 p. O limite de tabelas por trabalho é de cinco. Em casos excepcionais, conhecida a opinião da Comissão Editorial, este número poderá ser ultrapassado. No texto devem ser indicadas pela palavra Tabela (por extenso). **4 - Ilustrações** (fotografias, gráficos, quadros, desenhos ou esquemas): devem

ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras no texto. As fotografias devem ser identificadas somente com o título do artigo, além de conter no verso a indicação de seu correto posicionamento. Fotos fornecidas em papel fotográfico devem ter ótima resolução, em CD com a extensão.TIF e resolução mínima de 300 dpi's. As legendas de ilustrações coloridas devem estar referenciadas somente por setas, símbolos e pontos quando publicadas em preto e branco. Gráficos, desenhos ou esquemas devem ser fornecidos no CD, impressos em folha à parte identificada somente com o título do artigo, além das respectivas legendas. Todas as ilustrações devem ser fornecidas em três vias. Os gráficos devem trazer sempre os valores numéricos que lhes deram origem. Desenhos e esquemas devem apresentar boa qualidade técnica e artística. Aceitar-se-á um número máximo de nove ilustrações por artigo, sugerindo-se a seguinte distribuição: três fotografias, três gráficos e três desenhos/ esquemas. Acima deste limite, as despesas com reprodução correrão por conta do autor. Ilustrações coloridas, independentemente do número, serão cobradas. No texto devem ser indicadas pela palavra Figura (por extenso). Indicar junto ao título da ilustração o local e data. **5 - Referências:** devem ser numeradas, ao final do artigo, de forma consecutiva de acordo com a ordem em que forem sendo citadas no texto. Os títulos de periódicos devem ser mencionados de maneira uniforme, de preferência todos por extenso. As referências seguem a normalização da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023, que deve ser consultada para outros tipos de documentos aqui não exemplificados. **Exemplos de Apresentação dos Autores nas Referências:** BONAGURA, J. D. (**um autor**) SANTOS, J. A.; MELLO, M. R. (**dois autores**) BENNETT, B. T.; ABEE, C. R.; HENRICKSON, R. (**três autores**) VILELA, D.; MARTINS, C. E.; BRESSAN, M.; CARVALHO, L. A. [...] (**quatro autores ou mais**) ou VILELA, D. et al. (sem itálico).

Exemplo de periódico

1 KOTZEKIDOV, P.; BLOUKAS, J. G. Effect of protective cultures and packaging film permeability on shelflife of sliced vacuum-pocked cooked ham. **Meat Science**, v. 42, n. 3, p. 333-345, 1996.

Exemplo de livro

2 HALLIWELL, R. E. W.; GORMAN, N. T. **Veterinary clinical immunology**. London: W. B. Saunders, 1989. 548 p.

Exemplo de autor diferente para o livro e capítulo

3 FENNER, W. R. Avaliação neurológica dos pacientes. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 577-606.

Exemplo de mesmo autor para o livro e capítulo

4 THORTON, H. Deleterius changes in meat. In: THORTON, H. **Aspects of meat inspection**. London: Thindall & Cassel, 1973. p. 63-72.

Exemplo de tese

5 BIRGEL, E. H. **Estudo do quadro eritrocitário de caprinos (Capra hircus, L.) normais criados no Estado de São Paulo**: influências de fatores raciais, sexuais, etários e alimentares. 1973. 92 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1973.

Exemplo de evento

6 OLIVEIRA, C. A. Hormonoterapia em cadelas e gatas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., 1991, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991. p. 100-111.

Exemplo de livro eletrônico

7 POORE, M. H. **Alternative feeds for beef cattle**. North Carolina: North Carolina Corporative Extension Service, 1994. Disponível em: <<http://www.ces.ncsu.edu/drought/dro-28.html>>. Acesso em: 23 abr. 2007.

Exemplos de artigos de periódicos eletrônicos

8 MENDONÇA JR., C. X.; MARTINS, A. P.; MORI, A. V.; SILVA, A. B.; MORI, C. S. Efeito da adição de óleo de peixe à dieta sobre o desempenho e níveis de lípideos plasmáticos e de colesterol no ovo de galinhas poedeiras. **Brazilian Journal of**

Veterinary Research and Animal Science, v. 37, n. 1, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/cgi_bin/wxis.exe/iach/scielo>. Acesso em: 31 jan. 2001

6 - Citações: utilizar o Sistema Numérico. As citações devem ser feitas por numeração única e consecutiva em sobrescrito, utilizando-se algarismos arábicos, remetendo à lista de referências na mesma ordem em que aparecem no texto. Quando indispensável para a compreensão do texto, combinar o(s) sobrenome(s) do(s) autor(es) com a indicação do número. Neste caso, a citação será pelo sobrenome de cada autor ou pelo nome da entidade responsável que aparece na respectiva referência. Quando se tratar de três autores, todos devem ser citados. No caso de mais de três autores, a citação deve ser acompanhada pelo sobrenome do primeiro autor seguido da expressão et al. (sem itálico). Se a citação estiver inserida no texto utilizar letras maiúsculas e minúsculas; se estiver entre parênteses utilizar somente letras maiúsculas. Exemplos:

Um autor

Segundo Yanaguita⁹ ou (YANAGUITA⁹)

Dois autores

Soares e Alves¹³ ou (SOARES; ALVES¹³)

Três autores

Bennett, Abee e Henrickson¹² ou (BENNETT; ABEE; HENRICKSON¹²)

Quatro ou mais autores

Vilela, Martins, Bressan e Carvalho²⁶ ou Vilela et al.²⁶ (VILELA; MARTINS; BRESSAN; CARVALHO²⁶) OU (VILELA et al.²⁶)

Tarifa de publicação: A tarifa de publicação de R\$ 40,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores.

APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE BIOÉTICA

Os dois experimentos realizados neste trabalho foram aprovados no dia 11/07/2008 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP), da Universidade Federal de Campina Grande, em Patos-PB.

Protocolo de aprovação: nº 100/2008.

E-mail: coep@cstr.ufcg.edu.br