

# **AValiação DE DIFERENTES PROPORÇÕES DE CÁLCIO E FÓSFORO NA REGENERAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO EM DEFEITO PROVOCADO NA METÁFISE FEMORAL DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*). ESTUDO CLÍNICO-CIRÚRGICO, RADIOLOGICO E HISTOLOGICO.**

**Clécio H Limeira<sup>1</sup>, Marcelo J C Sá<sup>2</sup>, Adílio S Azevedo<sup>3</sup>, Marcos V L Fook<sup>4</sup>, Paulo V T Marinho<sup>1</sup>, Ana L Araújo<sup>3</sup>, Layse L Warderlei<sup>1</sup>, José A O Lucena<sup>1</sup>, Graziane M Silva<sup>1</sup>, Aline A Leal<sup>1</sup>, Sayonara A Silva<sup>1</sup>, Roseane A Portela<sup>3</sup>, Sérgio S Azevedo<sup>2</sup>**

## **RESUMO**

O experimento foi desenvolvido nas dependências do Hospital Veterinário da UFCG, campus de Patos. Foram utilizados 20 coelhos, de ambos os sexos, SRD, pesando em média 2,5 kg, provenientes de um criatório situado na cidade de Patos – PB. Os animais foram divididos ao acaso em dois grupos de 10 animais de acordo com o período em que foram eutanasiados (30 ou 60 dias após o procedimento cirúrgico), para avaliação comparativa entre quatro enxertos de biomateriais com preparações diferentes de Ca/P. Os animais foram colocados em gaiolas individuais 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 implantes em cada animal, dois em cada fêmur, situados nas metáfises proximal e distal. Os implantes de biomateriais foram colocados em cada orifício realizado com trefina 2,0 mm após ter sido acessado o osso cirurgicamente. Na metáfise proximal do membro pélvico esquerdo utilizou-se o implante de CPP700, na metáfise distal do membro pélvico esquerdo utilizou-se CPP900, na metáfise proximal do membro pélvico direito utilizou-se TCP/HA e na metáfise distal do membro pélvico direito utilizou-se HA, em cada animal. Após a introdução dos implantes, foi realizada a sutura da musculatura, subcutâneo e pele. Os animais apresentaram evolução clínica normal, sem sinais de infecção, complicação, ou deiscência da ferida, ocorrendo cicatrização por primeira intenção em todas feridas cirúrgicas. Não houve diferença estatística na avaliação radiográfica em relação à indução de cicatrização induzida pelos biomateriais entre os grupos, porém pode-se observar uma tendência de indução cicatricial óssea nos animais do grupo 60 dias que utilizaram os implantes TCP/HA e HA. Na avaliação histológica, os materiais TCP/HA e HA proporcionaram maior estimulação da cicatrização óssea tanto no grupo 30 dias como no de 60 dias, tendo sido no grupo 60 dias esta estimulação mais evidente. Os resultados obtidos neste experimento permitem concluir que os biomateriais utilizados mostraram-se biocompatíveis e os implantes TPC/HA e HA proporcionaram indução na cicatrização óssea mais rápida que os demais implantes.

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

---

<sup>1</sup> Aluno do Curso de Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFCG, Patos, PB. E-mail: [cleciolimeira@hotmail.com](mailto:cleciolimeira@hotmail.com)

<sup>2</sup> Médico Veterinário, Prof. Doutor, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFCG, Patos, PB. E-mail: [mjcdesa@gmail.com](mailto:mjcdesa@gmail.com)

<sup>3</sup> Médico (a) Veterinário (a), Mestrando (a), Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFCG, Patos, PB.

<sup>4</sup> Engenheiro Químico, Prof. Doutor, Depto. de Engenharia de Materiais, UFCG, Campina Grande, PB.

# EVALUATION OF DIFFERENT PROPORTIONS OF CALCIUM AND PHOSPHORUS IN THE REGENERATION OF BONE IN FABRIC DEFECT CAUSED IN FEMORAL METAPHYSIS OF RABBITS (*Oryctolagus cuniculus*). CLINICAL-SURGICAL STUDY, RADIOLOGICAL AND HISTOLOGICAL STUDY

## ABSTRACT

The experiment was developed in the Veterinary Hospital of UFCG, campus of Patos, PB. Twenty rabbits of both sexes, weighing on average 2,5 kg, were purchased from a creation situated in the city of Patos – PB. The animals were divided randomly in two groups of 10 animals in accordance with period that they were euthanized (30 or 60 days after the surgical procedure). For comparative evaluation among them, four types of biomaterials graft with different preparations of Ca/P have been used. The animals were housed individually in hutches, fed a commercial dog food and given water *ad libitum*. They had a period of adaptation of seven days before the beginning of the experiment. Four implants, two in each femur, were used in each animal. The implants were situated in proximal and distal metaphysis. The biomaterial implants were placed in each hole carried out with a 2,0 mm trefina after the bone has been accessed surgically. In proximal metaphysis of the left pelvic member the CPP700 implant was used, in distal metaphysis of the left pelvic member a CPP900 implant was used, in proximal metaphysis of the right pelvic member TCP/HA implant was used, and in distal metaphysis of the right pelvic member HA was used, in each animal. After the introduction of the implants, the suture of the muscle, subcutaneous tissue and skin was carried out. The animals presented normal clinical evolution, without signs of infection, complication, or dehiscence of the wound and all surgical wounds had first intention healing. It did not have statistical difference in the radiographic evaluation in relation to the healing induction of influenced by the biomaterials between groups, however, it could be observed a trend of bone healing induction in the animals of group 60 days that have been used TCP/HA and HA implants. Histological evaluation has shown that TCP/HA and HA materials had, in such a way, provided a greater stimulation of bone healing in group 30 days and in the one of 60 days, although in the group 60 days the healing was more evident. The results gotten in this experiment allow to conclude that the biomaterials used revealed biocompatible and TCP/HA and HA implants provided induction in the bone healing faster than the others implants.

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

## INTRODUÇÃO

Observa-se na prática da clínica veterinária o emprego cada vez maior de materiais sintéticos que podem ser utilizados como substitutos ósseos.

A utilização desses substitutos sintéticos é justificada em defeitos ósseos causados por traumatismos, processos infecciosos, neoplasias ósseas, união-retardada ou não-uniões nas quais seja necessária uma remodelação e reconstrução desses defeitos (MORAES, 2004), ou em artrodese onde se queira proporcionar imobilizações de articulações com o mínimo de desconfortos para os pacientes (DÓRIA NETO, 2007) e onde o uso de enxertos autógenos e alógenos seja inviável devido a problemas como disponibilidade limitada, dificuldade de armazenamento e um tempo cirúrgico maior dos enxertos orgânicos (BORGES, 2000).

No decorrer dos últimos anos, constatou-se que as cerâmicas microporosas destacam-se em aplicações de substituição e regeneração de tecidos ósseos, principalmente as cerâmicas formadas pela composição Ca/P, os fosfatos de cálcio (KARVAT et al. 2005), sendo esse grupo de biomateriais o que mais se assemelha à composição do osso (LEGEROS, 2002), apresentando-se como materiais biocompatíveis e bioativos (CORSETTI, 2005). Algumas desvantagens no uso dessas cerâmicas incluem baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade e alta densidade (KAWACHI, 2000), ficando seu uso limitado a locais onde não seja exigida respostas de esforços mecânicos (VAZ, 2007).

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

Os materiais cerâmicos empregados na confecção de implantes podem ser divididos, de acordo com sua reatividade química, em três categorias: os inertes, os com superfície reativa e os completamente reabsorvíveis, sendo que os fosfatos de cálcio podem tanto se comportar como cerâmica de superfície ativa

como serem totalmente reabsorvidos (MARIOLANI et al, 1991). A tabela abaixo mostra o resumo da classificação das biocerâmicas e alguns exemplos.

Tabela 1: Classificação das biocerâmicas

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

Fonte: KAWACHI, 2000.

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

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

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

Não obstante às pesquisas que estão sendo desenvolvidas, atualmente ainda existem dúvidas com relação à utilização de biomateriais, o que muitas vezes pode levar o cirurgião ortopedista a obter resultados poucos significativos ou indesejáveis quando os mesmos são utilizados.

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

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

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

### Preparação do material de implante

Para a obtenção dos pós de fosfato de cálcio foi realizada uma reação de neutralização entre as soluções de ácido fosfórico [H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>] e hidróxido de cálcio [Ca(OH)<sub>2</sub>]. As quantidades das soluções foram estequiometricamente determinadas de acordo com os valores das relações atômicas entre os átomos de cálcio e fósforo - Ca/P. Neste estudo foram utilizadas quatro preparações diferentes do biomaterial: o Piro fosfato de Cálcio de razão 1.0 com tratamento térmico a 700°C (CPP700), Pirofosfato de Cálcio de razão 1.0 com tratamento térmico a 900°C (CPP900), Fosfato Tricálcio de razão 1.5 associado à Hidroxiapatita de razão 1.67 (TCP/HA) e Hidroxiapatita de razão 1,67 (HA). A solução ácida foi adicionada com controle de vazão à solução básica previamente aquecida à temperatura de +/- 80°C, sob agitação constante. Após a completa adição o produto obtido ficou sob agitação à temperatura de 100°C até a evaporação da água. Em seguida, o produto foi seco em estufa a 110°C por 24 horas e sintetizado em temperaturas variadas de acordo com as fases dos fosfatos de cálcio desejadas.



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

### Procedimento cirúrgico

Foram utilizados quatro implantes em cada animal, dois em cada fêmur, situados nas metáfises proximal e distal. No pré-operatório cada animal foi submetido a jejum sólido por 12 horas e líquido por 06 horas. A tricotomia foi realizada com tosador automático na área compreendida desde a região dorso-lombar até o calcâneo. A medicação pré-anestésica utilizada foi Acepromazina (1mg/kg IV) e para indução anestésica utilizou-se anestesia dissociativa com a associação Zolazepan + Tiletamina (15mg/kg IV) e se necessário fazia-se re-administração de 1/3 da dose de indução. A antisepsia da área operatória foi realizada com solução de Clorexidina a 0,05%. Após a delimitação da área operatória com panos de campo, foi efetuada uma incisão cutânea ao longo da margem craniolateral da diáfise femoral desde o trocanter maior até a crista troclear lateral (figura 2A), a gordura subcutânea e fáscia superficial foram seccionadas abaixo da incisão cutânea, a fáscia lata seccionada ao longo da margem cranial da aponeurose do músculo bíceps femoral. Em seguida, a retração caudal do bíceps e afastamento cranial do músculo vasto lateral revelou a metafisária femoral (figura 2B). O músculo adutor da coxa foi rebatido na região subperiosteal para propiciar maior exposição do aspecto caudal do osso.

Foi feita ressecção longitudinal do perióstio e dois orifícios construídos, um na metáfise proximal e outro na distal (figura 3A) com trefina de 2,0 mm de diâmetro em cada membro pélvico. Durante a penetração da trefina solução fisiológica foi usada para minimizar aquecimento ósseo e conseqüente osteólise. Após a confecção de cada orifício, foram colocados os implantes de fosfato de cálcio previamente esterilizados distribuídos da seguinte maneira: na metáfise proximal do membro pélvico esquerdo utilizou-se o implante de CPP700, na metáfise distal do membro pélvico esquerdo utilizou-se CPP900, na metáfise proximal do membro pélvico direito utilizou-se TCP/HA e na metáfise distal do membro pélvico direito utilizou-se HA, em cada animal. Após a introdução dos implantes, o perióstio e o músculo tensor da fáscia lata foram suturados com catagut 3-0 em plano contínuo. Redução de espaço morto foi feita com sutura em zigue-zague com catagut 3-0. A pele foi unida com mononylon 3-0 empregando-se sutura simples contínua.

No período pós-operatório os animais receberam Enrofloxacin na dose de 10mg/kg IM uma vez ao dia durante 5 dias e Meloxicam 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 assepsia da ferida cirúrgica foi realizada com solução fisiológica 0,9% e Rifamicina spray durante os 10 primeiros dias pós-operatório, tendo sido retirado os pontos após esse período.

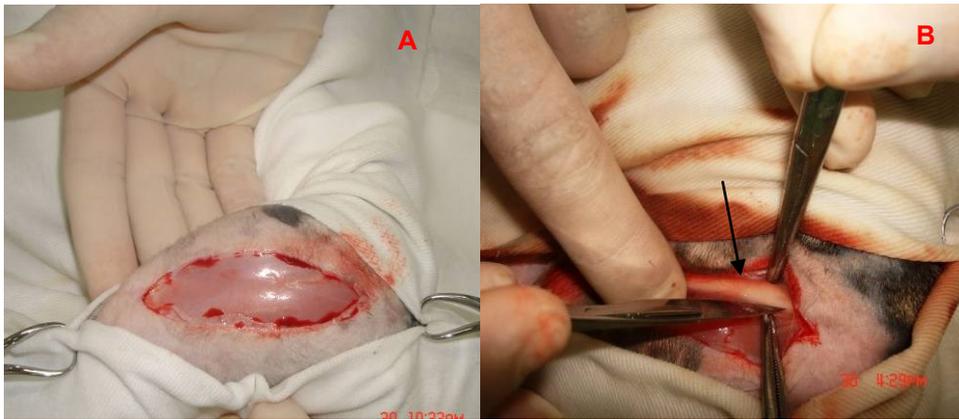


Figura 2: Fotografia mostrando incisão cutânea ao longo da margem crâniolateral da diáfise femoral (A) e exposição da metáfise femoral (B)

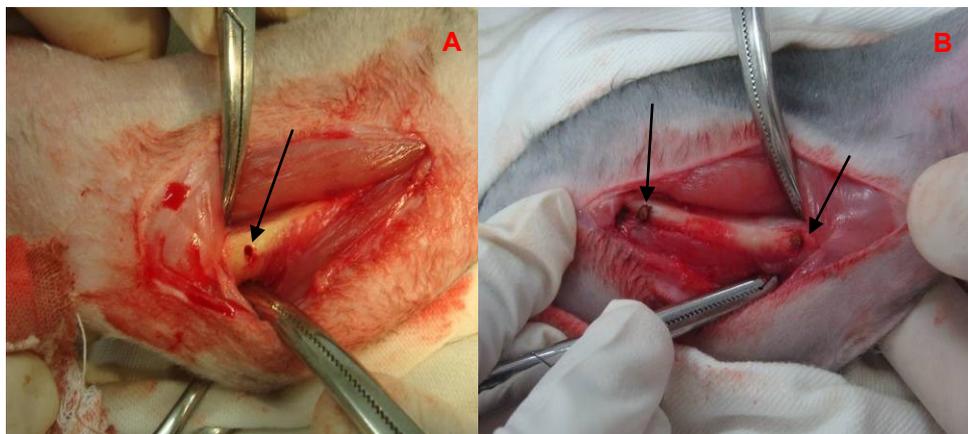


Figura 3: Fotografia mostrando orifício de 2 mm de diâmetro produzido na metáfise femoral distal (A) e orifícios distal e proximal (B) após a introdução dos implantes (setas)

### Avaliação clínica

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

### Avaliação radiológica

Foram realizadas radiografias na posição craniocaudal (CC) e mediolateral (ML) dos membros operados, antes e imediatamente após a cirurgia, com 30 e 60 dias de pós-operatório, visando acompanhar o processo de reparação óssea. Para a avaliação radiográfica foi proposto uma escala gradual de radiopacidade exemplificada na tabela 1. Essa avaliação foi realizada por três veterinários experientes em exames radiográficos, tendo sido obtido a média dos valores atribuídos para cada orifício avaliado, conduta essa tomada para isentar a avaliação de tendências e erros.

Tabela 1: Escala gradual quanto ao grau de radiopacidade da cicatriz óssea.

Graus de radiopacidade	Quantidade de cruzeiras recebidas
Radiopacidade intensa	+++
Radiopacidade moderada	++
Radiopacidade leve	+
Ausência de Radiopacidade	Sem cruz

### Avaliação histológica

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

Foram colhidos os fêmures (figura 4A) e em seguida retirados os fragmentos do tecido ósseo que continham os implantes, realizando-se um corte transversal com 2 cm de extensão, de modo que foi colhido 1cm de osso proximal e distal em relação aos implantes e foram submetidos a fixação com formalina tamponada a 10% durante 10 dias (figura 4B). Logo após o material foi lavado em água corrente e descalcificado em mistura de partes iguais de solução de ácido fórmico 5% + ácido clorídrico 5% durante cinco dias. Terminada a descalcificação os fragmentos foram enviados ao laboratório de Histopatologia Veterinária, no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), campus de Patos. No laboratório os fragmentos foram incluídos em parafina líquida previamente colocada em moldes de papel de forma cúbica. Posteriormente foram cortadas fatias transversais de 5µm de espessura dos blocos e montados em lâminas de vidro. De cada bloco foram obtidas quatro lâminas que foram submetidas às técnicas de hematoxilina-eosina e em seguida observado o padrão de regeneração tecidual com base nos graus de proliferação e diferenciação celular no tecido cicatricial, de neoformação óssea, de incorporação do compósito ao osso, de sua desintegração e de maturação do osso neoformado. A regeneração óssea foi caracterizada, segundo a escala atribuídas pelos patologistas, em discreta, discreta-moderada, moderada, moderada-acentuada e acentuada.

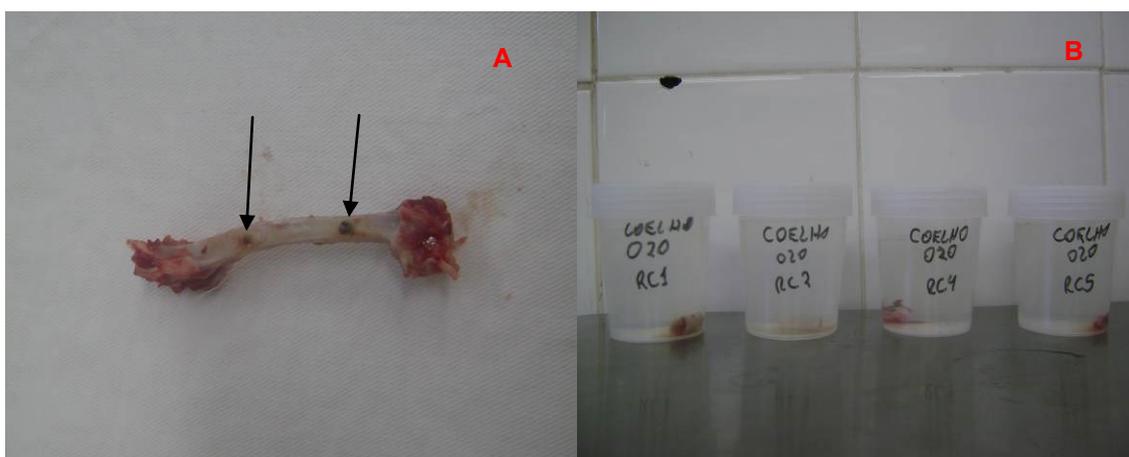


Figura 4: Fotografia mostrando o fêmur (A) após coleta, onde pode se observar os implantes proximal e distal (setas) e os quatro fragmentos de cada animal, dois de cada fêmur, imersos em formol a 10% (B)

### **Análise estatística**

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

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Avaliação clínico-cirúrgica**

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

Os animais apresentaram evolução clínica normal, não se observando quaisquer sinais de infecção, complicação, ou deiscência da ferida, ocorrendo cicatrização por primeira intenção em todas feridas cirúrgicas, justificada pela rigorosa assepsia, anti-sepsia e técnica cirúrgica adequada durante todo o procedimento, em conjunto com uma antibioticoterapia adequada, uso de antiinflamatório para um adequado manejo da dor, concordando com os resultados relatados por Freitas et al (2008). Nenhum

animal apresentou sinais de rejeição aos enxertos, comprovando a característica de biocompatibilidade dos fosfatos de cálcio descritos na literatura (MORAES, 2004; VITAL et al, 2006).

Cinco animais apresentaram edema leve e sensibilidade dolorosa durante os três primeiros dias 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, quando os pontos de sutura foram retirados e a ferida cirúrgica estava totalmente cicatrizada (figura 5), resultados que podem ser considerados normais devido à manipulação cirúrgica dos tecidos moles. Esses achados são similares aos encontrados por Duarte et al (2007).

### **Avaliação radiológica**

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

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

### **Avaliação histológica**

Os exames histológicos realizados neste estudo possibilitaram analisar os processos ocorridos durante o tempo de pesquisa em relação ao estímulo induzido pelos biomateriais em relação à cicatrização óssea e aos eventos celulares.

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

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



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

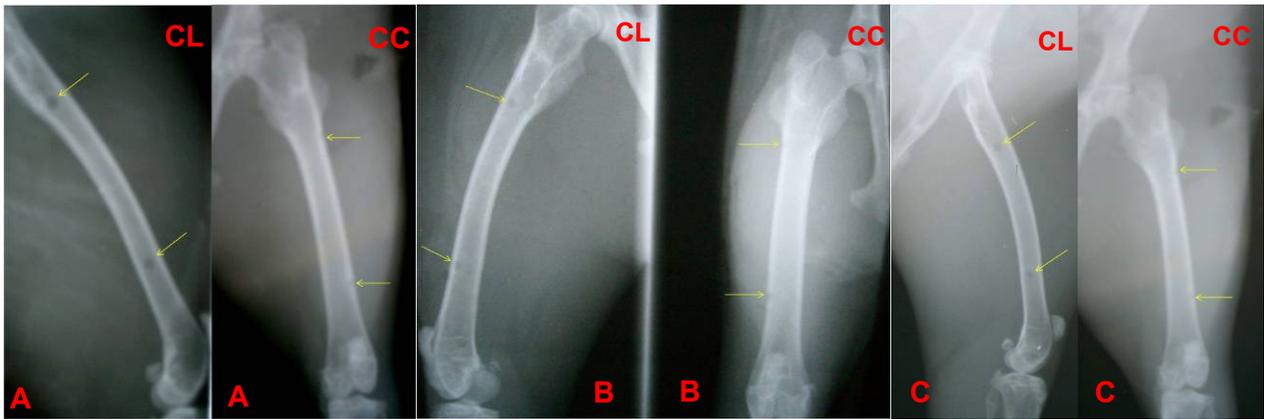


Figura 6: Fotografia dos raios-x nas projeções craniolateral (CL) e craniocaudal (CC) mostrando os orifícios (setas), produzidos logo após a cirurgia (A), 30 dias pós-cirúrgico (B) e 60 dias pós-cirúrgico (C)

Os biomateriais são utilizados nas cirurgias ósseas com o objetivo de reconstrução óssea, e seu desempenho neste quesito depende de alguns fatores como composição e poder osteogênico (TADJOEDIN et al, 2003). A formação óssea depende do contato dos materiais com o perióstio e endóstio (MIRANDA, 2005), já que estes participam na nutrição, formação e reparo do tecido ósseo (ROCHA, 2008), pois apresentam células osteoprogênitoras que são ativadas durante o processo de regeneração óssea (CORSETTI, 2005). Sendo assim, a irregularidade do endóstio e do perióstio observada neste estudo (figura 7) indica a atividade destas estruturas no processo de reparo ósseo, sendo essa irregularidade mais acentuada nos animais do grupo de 60 dias em relação ao de 30 dias, no entanto não se observou diferenças significativas entres os quatros tipos de biomateriais testados, exceto o biomaterial CPP900, que apresentou certa regularidade periosteal (figura 8).

Dentre as várias células que compõem o tecido ósseo, os osteoclastos e os osteoblastos são as principais. Os osteoclastos são células multinucleadas que participam dos processos de reabsorção e remodelação do tecido ósseo, sendo também as responsáveis pela reabsorção dos biomateriais, e os osteoblastos são responsáveis pela síntese dos constituintes orgânicos da matriz óssea e também armazenam fosfato e cálcio, participando da mineralização da matriz (ROCHA, 2008). Neste estudo, os materiais TCP/HA e HA proporcionaram maior estimulação destas células tanto no grupo 30 dias como no de 60 dias, tendo sido no grupo 60 dias esta estimulação mais evidente. Esses resultados são devidos à ação osteocondutiva e da osteotransdutividade desses biomateriais, concordando com o observado por Dória Neto (2007). Através desses processos (osteocondutividade e osteotransdutividade) os substitutos ósseos são degradados, reabsorvidos e substituídos por tecido ósseo neoformado, conforme observado por Borges et al. (2000).

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



Figura 7: Fotomicrografia mostrando lâmina histológica corada pela Hematoxilina-Eosina (H.E), em objetiva de 40X. Notar irregularidade endosteal (seta preta), neoformação óssea primária (seta amarela) e interface osso/implante (seta vermelha).



Figura 8: Fotomicrografia de lâmina corada pela Hematoxilina-Eosina (HE). Regularidade endosteal (seta amarela) e biomaterial (seta preta). Notar ausência de neoformação óssea primária. Aumento 40X.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste o experimento, onde se buscou avaliar clinica-cirurgica, radiológica e histologicamente enxertos de quatro biomateriais a base de fosfato de cálcio, permitem concluir que:

- Os quatro biomateriais utilizados mostraram-se biocompatíveis, pois nenhum animal apresentou rejeição aos enxertos.
- Não houve diferença radiológica significativa entre os quatro implantes nos dois grupos, porém os implantes TCP/HA e HA induziram uma média de cicatrização maior que os outros implantes.

- O implante de HA induziu uma neoformação óssea mais precoce no grupo de 30 dias, enquanto que o grupo de 60 dias o implante que melhor induziu a neoformação óssea foi o TCP/HA, seguido do HA e por último o CPP900, não sendo observada melhora na atividade osteogênica com o uso de CPP700 em nenhum dos dois grupos.
- Estudos mais prolongados com esses materiais são necessários, já que o processo de cicatrização dos ossos é lento e pode durar 180 dias ou mais.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica, ao Laboratório de Histopatologia Animal da UFCG (CSTR) e ao Setor de Cirurgia do Hospital Veterinário do Campus de Patos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.D.; CARVALHO, Y. R.; ROCHA, R. F. et al. Estudo da reparação óssea em mandíbula de ratos. **Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol**, São José dos Campos, v.3, n.1, p.49-53, 2000.
- BARTH, E.; RAEMINGEN, H.; SOLLHEIM, L.F. Tissue reactions to ceramics and glass ceramics. **Acta Orthop scand**. Sweden. v. 59, p. 219-20, 1988.
- BORGES, A.P.B. **O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea do defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia de cães. Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodisperção** Tese (Doutorado), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 1998.112f.
- BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B. et al. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.6, p. 616-620, 2000.
- CORSETTI, A. **Avaliação do reparo ósseo em fêmures de rato após implante de blocos de fosfato de cálcio e enxerto ósseo autógeno**. Dissertação (Mestrado Clínica Odontológica), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.2005. 122f.
- DÓRIA NETO, F. A. **Avaliação do cimento de alfa-fosfato tricálcico em artrodeses tarsocrurais experimentais em cães**. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 2007. 67f.
- DUARTE, T. S.; BORGES, A.P.B.; LAVOR, M.S.L. et al. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos clínicos e radiográficos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.1, p.114-118, 2007.
- FREITAS, S. H.; DÓRIA, R. G. S.; MENDONÇA, F. S. et al. Aspecto radiológico de heteroenxerto ósseo cortical fragmentado na reparação de falhas ósseas em coelhos. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Niterói, v.15, n.3, p. 107-110, 2008.
- KARVAT, F.; CAMARGO, N.H.A.; SOARES, C. et al. Elaboração e caracterização de um biomaterial compósito a partir de uma matriz fosfato de cálcio/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-α para aplicação como implante e restituição óssea. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 43 – 50, 2005.
- KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, Campinas, vol.23, n.4, p.518-522, 2000.
- MARIOLANI, J. R. L. **Metodologia para avaliação da interface biomaterial - tecido ósseo: estudo teórico e experimental**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Centro de Tecnologia, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 1991. 113f.
- MIRANDA, E.S.; CARDOSO, F.T.S.; FILHO, J.F.M. et al. Estudo experimental comparativo no uso de enxerto ósseo orgânico e inorgânico no reparo de fraturas cirúrgicas em rádio de coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, vol.13, n.5, p.245-248, 2005.
- MORAES, P. C.; PADILHA FILHO, J. G.; CANOLA, J. C. et al. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. Disponível em: <http://www.scielo.br/acb>. Acesso em: 17 jun. 2009.
- REZENDE, C.M.F.; BORGES, A.P.B.; BERNIS, W.O. et al. Aspectos clínico-cirúrgicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães. **Arquivo Brasileira Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.50, p.537-545, 1998.

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

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

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

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

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