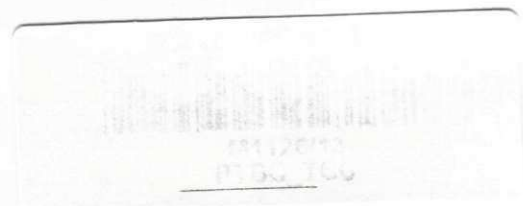


UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Análise tomográfica da utilização de quitosana e β -trifosfato de cálcio isolado
e associado na regeneração óssea de coelhos

Thiago Henrique Carneiro Formiga



2013



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

MONOGRAFIA

Análise tomográfica da utilização de quitosana e β -trifosfato de cálcio isolado e associado na regeneração óssea de coelhos

Thiago Henrique Carneiro Formiga
Graduando

Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá
Orientador

Prof. Msc. Adílio dos Santos Azevedo
Co-orientador

Patos-PB
Setembro/2013



Biblioteca Setorial do CDSA. Junho de 2022.

Sumé - PB

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

THIAGO HENRIQUE CARNEIRO FORMIGA

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

APROVADA EM 26/09/2013

MÉDIA: 10,0

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá

Nota: _____

Adílio Santos de Azevedo
Prof. Msc. Adílio dos Santos Azevedo

Nota: 10,0

Ana Lucélia de Araújo
Med. Vet. Msc. Ana Lucélia de Araújo

Nota: 10,0

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

THIAGO HENRIQUE CARNEIRO FORMIGA
Graduando

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

APROVADO EM/...../.....

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá

Prof. Msc. Adílio dos Santos Azevedo

Ana Lucélia de Araújo
Med. Vet. Msc. Ana Lucélia de Araújo

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar força, sabedoria e paciência para superar os obstáculos que surgiram no caminho.

Aos meus pais, Fábio Luciano e Aurinete Rufino, pelo incentivo e apoio no decorrer dessa caminhada e por se orgulharem de mim, estando sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Aos meus Avós, pelas orações e pelas infinitas ajudas, sempre visando o meu aprendizado e crescimento. Jamais esquecerei o que vocês fizeram e fazem por mim. Muito obrigado!

Aos animais, que contribuíram para a realização deste estudo.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá e ao meu Co-orientador Prof. Msc. Adílio dos Santos Azevedo, não só pela orientação no desenvolvimento deste trabalho, mas pela amizade, disponibilidade, paciência e por acreditar na realização desta pesquisa.

À Turma de Concluintes 2012.2, por todos os desafios que superamos juntos.

À toda a minha FAMÍLIA, que acreditou e torceu pelo meu sucesso.

Aos amigos e Médicos Veterinários (Renato Otaviano, Ana Lucélia, Jefferson Cordeiro, Marie Borges) pela ajuda, companheirismo e aprendizado que adquiri com eles.

Ao CNPq pela concessão da bolsa PIBIC que financiou este trabalho de pesquisa.

Aos Professores, pelo ensino transmitido que contribuiu de forma direta na minha formação profissional.

Aos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

À todos muito obrigado!

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Tecido ósseo.....	13
2.1.1 Reparação do tecido ósseo	14
2.2 Quitosana	15
2.3 β-trifosfato de cálcio	16
2.4 Tomografia Computadorizada	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Animais	18
3.2 Aquisição dos implantes	18
3.3 Procedimento cirúrgico	19
3.4 Pós-operatório e avaliação clínica.....	20
3.5 Tomografia computadorizada	20
3.6 Análise estatística.....	22
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	23
5 CONCLUSÃO.....	25
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	26

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Aparelho helicoidal GE Hi-Speed FXI.....	20
Figura 2: Software para análises tomográficas E-film.....	20

LISTA DE TABELA

	Pág.
Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão do valor de atenuação em HU (unidades Hounsfield) do osso, a partir da média das quatro regiões de interesse avaliadas, em 45 e 90 dias.....	23

RESUMO

FORMIGA, THIAGO HENRIQUE CARNEIRO. Análise tomográfica da utilização de quitosana e β -trifosfato de cálcio na regeneração óssea de coelhos. Patos, UFCG, 2013. 33p. (Trabalho de conclusão de curso em Medicina Veterinária).

O Objetivo do presente trabalho foi avaliar o emprego da quitosana e β -trifosfato de cálcio na cicatrização óssea por meio da avaliação clínica e tomografia computadorizada. Para tanto foram utilizados 12 coelhos, adultos, machos, pesando 3 kg em média. Em cada animal foram feitas quatro osteotomias tibiais, uma metáfise proximal e outra metáfise distal de cada tibia. Na metáfise da tibia esquerda foi feita a osteotomia sem a introdução de nenhum biomaterial (grupo controle), na osteotomia distal foi colocado o implante de quitosana. Na osteotomia proximal da metáfise da tibia direita foi introduzido o β -trifosfato de cálcio e na distal o compósito quitosana/ β -trifosfato de cálcio. Os animais foram avaliados clinicamente por um período de 10 dias. Neste intervalo não houve deiscência das feridas e deambularem normalmente. Ao final desse período as animais foram eutanasiados e as tíbias retiradas para avaliação tomográfica. Na avaliação tomográfica não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre os grupos por momento, nem entre os momentos por grupo, no entanto, as imagens tomográficas dos implantes apresentaram uma maior radiopacidade, o que implica em uma maior quantidade de tecido neoformado em relação ao grupo controle.

PALAVRAS CHAVE: Biomateriais, compósito, ortopedia.

ABSTRACT

FORMIGA, THIAGO HENRIQUE CARNEIRO. Analysis tomográfica of quitosana utilization and β -trifosfato of calcium in the bony regeneration of rabbits. Patos, UFCG, 2013. 33p. (Course conclusion work in Veterinary Medicine).

The objective of this study was to evaluate the use of chitosan and β -triphosphate calcium in bone healing by means of clinical evaluation and computed tomography. Therefore, we used 12 adult rabbits, weighing 3 kg on average. In each animal were made four tibial osteotomies, one proximal tibia and distal metaphysis of each other tibia. The metaphysis of the left tibia osteotomy was performed without introducing any biomaterial (control group) was placed in the osteotomy distal implant chitosan. In proximal metaphyseal osteotomy of the right tibia was introduced β -triphosphate and calcium in the distal composite chitosan / β -calcium triphosphate. The animals were evaluated clinically for a period of 10 days. Meanwhile there was no wound dehiscence and ambulate normally. After this period the animals were euthanized and the tibias removed for tomographic analysis. In the tomographic evaluation there was a statistically significant difference ($p > 0.05$) between groups for time between times or by group, however, the tomographic images of the implants showed greater radiopacity, which implies a greater amount of tissue newly formed in relation to the control group.

KEYWORDS: Biomaterials, composite, orthopedics.

INTRODUÇÃO

No decorrer dos últimos anos a engenharia de materiais está se desenvolvendo bastante, com a produção de polímeros bioreabsorvíveis, que proporcionam o restabelecimento das funções normais do tecido ou órgão afetado, podendo ser chamados também de biomateriais (BARBANTI et al., 2005).

A associação de biomateriais na cirurgia está sendo uma prática bem rotineira em cirurgias veterinárias, que tem como objetivo, acelerar o processo de cicatrização dos tecidos orgânicos sem que haja efeitos colaterais aos pacientes (AZEVEDO et al., 2011). Eles atuam como adjuvantes em processos reparativos de vários tecidos e órgãos (SAKATA; ALBERTO-RINCON; DUEK, 2004). Sendo assim, uma alternativa de tratamento para defeitos ósseos ocasionados por patologias e traumas (FILGUEIRA, 2012), já que, o método usual com enxerto autólogo tem sido restringido devido à disponibilidade limitada do material, complicações cirúrgicas, e ao dano causado no local da colheita (FOOK et al. 2010).

Dentre os biomateriais, a quitosana vem ganhando destaque em pesquisas médicas nos últimos anos por sua possível capacidade reparadora tecidual (AZEVEDO et al., 2007; KHAN e PEH, 2003). Experimentos realizados apontam que a quitosana tem capacidade de favorecer neoformação óssea e de cartilagens por estimular a liberação de fatores indutores celulares, as citocinas, favorecendo a angiogênese, osteogênese e condrogênese (WANG et al., 2002; MUZZARELI et al., 1994). Essas características acontecem em função da sua estrutura que é semelhante aos glicosaminoglicanos, os quais se apresentam como principais componentes da matriz extracelular de cartilagens e ossos (KHOR; LIM, 2003).

Outro biomaterial que vem ganhando espaço na área da ortopedia são as biocerâmicas, que estão sendo usados cada vez mais como implantes, as quais são compostas por carbono, alumínio, cálcio e oxigênio, apresentando em sua grande maioria uma característica inerte, mas também podem ser reabsorvíveis e reativas superficialmente (SLATTER, 2007). Dentre elas temos o trifosfato de cálcio que é um mineral da família dos fosfatos de cálcio de grande importância na área dos biomateriais. Utilizado como implante para auxiliar no processo de cicatrização óssea e também em sistemas de liberação controlada de fármacos. Encontrados sob duas formas alotrópicas, β e α . (CORRÊA, 2008).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia do uso de quitosana e β -trifosfato de cálcio e sua associação, na cicatrização óssea de coelhos, descrevendo e quantificando por meio da tomografia computadorizada, o osso neoformado na interface entre o tecido ósseo e os implantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

É um tecido conjuntivo especial formado pela calcificação de sua matriz extracelular (HIB, 2003). Um sistema vivo sobre o qual tem a capacidade de proporcionar sustentação da musculatura funcional, além das funções de homeostasia do cálcio no organismo, proteção a órgãos vitais, também como abrigar a medula óssea, essa responsável pela produção celular para o sistema hematopoiético e imune (DENNY; BUTTERWORTH, 2006). Apresenta em sua estrutura, minerais e matriz orgânica representada por quatro tipos de células: as osteoprogenitoras, os osteoclastos, osteoblastos e osteócitos (SANTOS; ALESSI, 2011). Encontra-se continuamente em renovação por meio de processos catabólicos e anabólicos (LANDA, 2005).

As osteoprogenitoras são as células de reserva ou de repouso, que podem ser estimuladas por um osteoindutor para diferenciar-se em osteoblastos e produzir matriz óssea (LANDA, 2005). São encontradas próximo aos vasos sanguíneos e a na superfície óssea, podendo entrar em atividade para produzir tecido ósseo ou permanecer em repouso (ROSS; ROWRELL, 1993; LANDA, 2005).

Os osteoclastos são considerados os macrófagos do tecido ósseo, pois implica-se atualmente que eles são derivados dos mesmos progenitores que os monócitos do sistema imune. São células grandes, com vários núcleos geralmente encontrados na extremidade da célula, encontradas nas superfícies ósseas que passam constantemente por reabsorção (DUKES; REECE, 2006).

Os osteoblastos são células jovens capazes de promover a síntese de proteoglicanos, glicoproteínas e colágeno tipo I, como também participam da mineralização do tecido, concentrando fosfato de cálcio na matriz óssea. Apresentam-se nas superfícies ósseas, formando um arranjo que lembra um epitélio simples (BELLINI, 2007; JUNQUEIRA, 2008).

Os osteócitos são células presentes em maior número no tecido ósseo maduro e encontra-se localizado em lacunas no interior do tecido ósseo (COWIN, 2002; TATE et al, 2004 citado por OCARINO et al., 2006). Essas células se comunicam entre si e com os osteoblastos através de uma rede de conexões formada por processos intracanaliculares (OCARINO et al., 2006). Esse sistema de canaliculos conectam as lacunas dos osteócitos

entre si e com os espaços tissulares que permitem trocas bioquímicas e metabólicas entre os osteócitos e a corrente sanguínea (RABELO, 2009).

Macroscopicamente os ossos são denominados como cortical e esponjoso, o primeiro é o que se refere a cobertura externa, ele é compacto e denso, compõe cerca de 80% do esqueleto e detêm principalmente funções biomecânicas, é recoberta pelo perióstio, uma camada especializada do tecido conjuntivo, que é aderida ao osso por um feixe de colágeno conhecido como fibras de Sharpey (BATISTA, 2007). Já o segundo, podendo ser chamado também de osso medular ou osso trabecular, apresenta um melhor suprimento vascular (BATISTA, 2007) e é encontrado em sua grande parte, dentro do canal medular de ossos longos (RUBIN et al., 2006). Ambas superfícies são compostas por células com capacidade de promover a osteogênese, sendo que no endóstio são encontradas em maior quantidade (CARVALHO, 2004).

Histologicamente o tecido ósseo é composto por dois tipos, o primário ou imaturo e o secundário ou maturo, podendo ser chamado também de lamelar (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O imaturo é composto por uma grande quantidade de osteócitos, menor teor mineral e apresenta fibras colágenas dispostas aleatoriamente (SILVEIRA, 2007). Ele surge primeiro tanto no processo de cicatrização óssea quanto no desenvolvimento embrionário, que posteriormente é substituído pelo secundário onde a fibras colágenas estão arranjadas em lamelas organizadas paralelamente ou em camadas concêntricas em volta de canais com vasos formando os canais de Havers, apresentando menor quantidade de osteócitos e maior substância mineral (KARINNE, 2009).

2.1.1 Reparação do tecido ósseo

A cicatrização da fratura é o processo biológico que ocorre posteriormente a ruptura do osso, que promove a restauração da continuidade tecidual necessária a sua função (FOSSUM, 2008).

Os eventos que acontecem no processo de cicatrização normal das feridas e tecidos moles (inflamação, fibroplastia e remodelação) também ocorrem durante a cicatrização de um osso lesado, sendo que no tecido ósseo, osteoblastos e osteoclastos também participam na fase de remodelação (SOUSA, 2010).

Segundo DAHLIN et al. (1996), podemos classificar a cicatrização óssea por primeira e segunda intenção, termos estes, originados de muitos anos de estudo da

reparação de tecidos. Se um osso for fraturado e suas extremidades livres estiverem com distância de mais de 1mm, o osso cicatriza por segunda intenção, isto é, durante a fase fibroblástica da cicatrização uma grande quantidade de colágeno deve ser depositada para preencher o espaço ósseo. A reparação por primeira intenção ocorre quando o osso não é fraturado completamente ou quando a reaproximação é cirúrgica, vindo a estabilizar rigidamente as extremidades fraturadas do osso (COSTA et al., 2008; PETERSON et al., 2005 citado por SOUSA, 2010). Outro fator que determina se vai ocorrer cicatrização por primeira ou segunda intenção, é a quantidade de movimentação no foco da fratura, que irá variar de acordo com o método de estabilização utilizado (SLATTER, 2007 citado por FILGUEIRA, 2012).

Os enxertos podem atuar de três maneiras distintas no processo de reparação óssea, sendo elas a osteogênese, a osteoindução e a osteocondução (FOSSUM, 2002). A osteogênese é o processo de neoformação óssea promovido através de enxerto ósseo com células vivas, transplantadas ao foco da lesão do receptor (SILVEIRA, 2007). A osteoindução é a formação de tecido ósseo a partir de células osteoprogenitoras, que são derivadas das células mesenquimais induzida por um ou mais indutores implantados na matriz óssea, atraindo para o local, células que se diferenciam em osteoblastos (MEIRELLES, 2010). A Osteocondução é o processo de neoformação óssea pela migração e proliferação de células ósseas do receptor através da superfície do enxerto que age como arcabouço. (BATISTA, 2007).

2.2 Quitosana

A quitosana é um polímero natural obtida pela desacetilação com álcalis a partir da quitina, substância que é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos, como o camarão e caranguejo, sua presença ocorre também em nematoides e em fungos pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (DAROZ et al., 2008; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). Sua estrutura é formada pela repetição de unidades beta (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina) apresentando uma cadeia polimérica similar à da celulose. Possui elevada massa molecular o que confere baixa solubilidade em meio aquoso como álcool e acetona, mas dissolve-se completamente em soluções de ácidos orgânicos quando o pH da solução é inferior a seis (YOSOF et al citado por LIMA, 2010). Apresenta grandes

propriedades biológicas como atividade antimicrobiana, efeito coagulante, analgésico, como também, é empregada no tratamento de osteoartrite, redução de peso, estimulantes do sistema imune, manifestadas pela aceleração em processos de cicatrização de feridas (LIMA, 2010). Também apresentam ação antifúngica, inibição de células tumorais, atividade antiácida e antiúlcera, hemostática e hipocolesterolêmica (DAMIAN et al, 2005). Possui grupos amínicos que permitem propriedades como agente quelante, polieletrólito e também a formação de filmes, fibras e membranas (DAMIAN et al.,2005). Na avaliação histológica descritiva comparativa de AZEVEDO (2011), pode se observar que a quitosana apresenta a capacidade de ativar macrófagos, que ao entrarem em contato, liberam citocinas e outros fatores de crescimento que promovem o processo de proliferação celular, favorecendo o processo cicatricial dos tecidos.

2.3 β -trifosfato de cálcio

Os trifosfatos de cálcio são obtidos por diferentes técnicas de síntese e apresentam sua fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (RAYMAY; ZAHANG, 2004). São atualmente os principais materiais empregados e estudados como biomaterial para a reposição e regeneração do tecido ósseo, pois apresentam como características: similaridade com a fase mineral de dentes, ossos e tecidos calcificados; excelente biocompatibilidade, bioatividade, osteocondutividade e não apresentam toxicidade (GUASTALDI; APARECIDA, 2010). É utilizado com sucesso no preenchimento de defeitos e extensão de contornos do tecido ósseo bem como em sistemas de liberação controlada de fármacos (MARTINS, 2011). Pode ser encontrado sob duas formas alotrópicas: a romboédrica (β -TCP) e a monocíclica (α -TCP), com relação molecular de Ca/Pa = 1,5, contendo cerca de 39% de cálcio e 20% de fósforo (MARTINS, 2011), sendo que a primeira ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \beta$) é estável a temperaturas inferiores a 1125°C e também é mais empregada em aplicações clínicas, como enxertos ósseos e em arcabouços para engenharia tecidual (SILVA, 2009 citado por LIMA et al., 2011), já a segunda é formada acima desta temperatura (DALMÔNICO et al., 2012; CORRÊA, 2008). Podem ser encontrados nas formas granular, macroporosa e em gel, sendo que a primeira, é a mais eficiente, devido aos espaços entre os grânulos, que aumentam a porosidade da matriz e a sua superfície de contato (GUTIERRES, 2006)..

Estudos comprovam que os fosfatos de cálcio apresentam a propriedade osteocondutiva, pois estimulam a neoformação óssea através da reabsorção do implante

pelos osteoclastos e os osteoblastos que participam da mineralização dos tecidos (MORAES et al., 2004). Este funde-se fortemente com os osteoblastos, permitindo o aumento da resistência mecânica que se aproxima rapidamente do osso cortical, esta característica explica o fato dela agir mais rápido na reconstituição óssea do que quando são usados material biológico, homólogo, autólogo ou xenólogo (GARRIDO; WYKROTA, 2007).

2.4 Tomografia Computadorizada

A Tomografia Computadorizada (TC) é um método complementar de diagnóstico por imagem que utiliza a radiação X, que permite a reprodução de uma secção de cortes de tecidos em qualquer um dos três planos espaciais (FREITAS et al, 2012) com diferenças de densidade da ordem de 0,5% entre os tecidos e com uma precisão bem maior que a radiologia convencional que limita-se em torno de 5% (PINA et al, 2009) . Com a avaliação através de TC, é possível distinguir regiões com índices de absorção de raios X diferentes, com isso detectar órgãos e tecidos doentes e é útil para o diagnóstico de doenças da cabeça, tórax, abdômen e pélvis (RÚBIO, 2003). Proporciona riscos ao paciente quando existe a necessidade de injeção de material de contraste intravenoso, assim como no raio x contrastado, mas apresenta vantagens como rapidez, ótima resolução espacial e avaliação simultânea de órgãos do corpo (RÚBIO, 2003), sendo que há a necessidade de que o animal esteja anestesiado, para evitar que o animal se mexa e provoque alterações nas imagens, como também facilitar o posicionamento dependendo do local a ser avaliado e ainda possui grande custo como exame complementar (GRÜN et al., 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo experimental foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (UAMV/UFCG), segundo protocolo de aprovação 10/2012.

3.1 Animais

Foram utilizados 12 coelhos jovens, machos, da raça Nova Zelândia, pesando em média 3 kg, provenientes da Fazenda Experimental do Campus de Bananeira da UFPB, situado no município de Bananeiras-PB. Os animais foram divididos ao acaso em dois momentos experimentais, e cada animal recebeu quatro tratamentos.

-Grupo C: grupo que não foi utilizado nenhum implante, usado como controle do processo regenerativo ósseo;

-Grupo QUI: grupo tratado apenas com quitosana;

-Grupo TCP: grupo tratado com a utilização do β -trifosfato de cálcio;

-Grupo QUI+TCP: grupo tratado com a associação quitosana/ β -trifosfato de cálcio.

Antes do início do experimento, os animais passaram por um período de adaptação de sete dias. Durante o período experimental, os animais foram alocados em gaiolas individuais. Os coelhos foram vermifugados e alocados em gaiolas individuais, alimentados com ração comercial balanceada e água potável fornecida *ad libitum*. Seis animais foram eutanasiados aos 45 e seis aos 90 dias após o procedimento cirúrgico.

3.2 Aquisição dos implantes

A quitosana e o β -trifosfato de cálcio foram fornecidos pelo Grupo de Biomateriais do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

3.3 Procedimento cirúrgico

No pré-operatório cada animal foi submetido a jejum sólido por 2 horas. A tricotomia foi feita com aparelho de tricotomia compreendendo toda a região medial da tíbia. A medicação pré-anestésica foi constituída de acepromazina¹ na dose de 1 mg/kg administrado pela via intravenosa (IV) e após 10 minutos, para manutenção anestésica foi utilizado zoletil² na dose de 15 mg/kg IV. Foi realizada anestesia epidural com lidocaína sem vaso³ com concentração de 2% na dose de 0,22 ml/kg associado ao tramadol⁴ na dose de 1 mg/kg em todos os animais. A anti-sepsia das áreas operatórias foi empregada com solução alcoólica de clorexidina 0,5%. Após a delimitação da área operatória com panos de campo, iniciou-se a cirurgia com incisão cutânea foi efetuada ao longo da margem medial da metáfise tibial de aproximadamente 3 cm, em seguida o tecido subcutâneo foi divulsionado até expor o periósteo, sendo este tecido incisado e expondo o osso. Foi realizado em cada metáfise proximal duas osteotomias com uma broca ortopédica de 3 mm, com aproximadamente 2 cm de distância entre as lesões. O processo de osteotomia foi realizado com instilação local de solução fisiológica, evitando assim osteólise. Esse processo foi realizado nas metáfises tibiais de ambos os membros pélvicos. A osteotomia dorsal da tíbia esquerda não foi colocado nenhuma substância (grupo controle) e na osteotomia ventral foi colocado o implante de quitosana. Nas osteotomias realizadas na metáfise tibial direita, na lesão dorsal, foi colocado o β -trifosfato de cálcio e na osteotomia ventral foi colocado a associação de quitosana/ β -trifosfato de cálcio. Após a introdução dos implantes, o periósteo e o tecido subcutâneo foram suturados com categut 3-0⁵ em plano simples contínuo. A aproximação dos bordos da ferida cirúrgica foi feita com sutura em zigue-zague com categut 3-0. A pele foi unida com mononailon 3-0⁶ empregando-se sutura simples interrompida.

¹ Acepran 1%® (Vetnil)

² Zoletil 10%® (Vibrac)

³ Lidovet @%® (Bravet)

⁴ Tramal 5%® (Pfizer)

⁵ Categut 3-0® (Technofio)

⁶ Nylon 3-0® (Technofio)

3.4 Pós-operatório e avaliação clínica

Nos primeiros dez dias de pós-operatório (PO) as feridas cirúrgicas eram limpas com solução fisiológica a 0,9%, secas com gaze e colocado spray de sulfadiazina de prata⁷ até a remoção dos pontos externos. Nos primeiros cinco dias de PO foi administrado pela via intramuscular (IM) enrofloxacina⁸ na dose de 10mg/kg para evitar assim processo infeccioso. Para o controle da dor e também evitar processo inflamatório exacerbado, foi administrado pela via IM, nos três primeiros dias de PO, meloxicam⁹ na dose de 0,2 mg/kg no primeiro dia e nos dois dias subsequentes 0,1 mg/kg.

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

3.5 Tomografia computadorizada

6 animais foram eutanasiados aos 45 dias e 6 aos 90 dias, para avaliação da cicatrização óssea por meio da tomografia computadorizada (TC). Os valores obtidos com a medição em cada animal foram somados e calculados para obtenção da média para cada lesão óssea, avaliada e submetida à análise estatística. Para a realização dos exames de TC, foi realizado a excisão das tíbias dos animais, onde foram posicionadas paralelamente sobre a mesa, sendo realizados os exames de TC com o aparelho helicoidal GE Hi-Speed FXI (Figura 1) e protocolo com 120 kVp (quilovoltagem) e auto mA (miliamperagem) na velocidade de uma rotação por segundo.

A aquisição das imagens foi obtida em cortes transversais de 1 mm de espessura com filtro para partes ósseas. Antecedendo os exames, o aparelho foi devidamente calibrado para melhor padronização dos resultados. Após o exame tomográfico e digitalização das imagens, foi calculado o valor de atenuação em HU (unidades Hounsfield) do osso a partir da média de três das regiões de interesse avaliadas. Cada ROI

⁷ Kuraderm spray® (KÖNIG)

⁸ Flobiotic 10%® (Syntec)

⁹ Maxicam 2%® (Ouro fino)

(área de interesse) teve sua área previamente padronizada para melhor uniformidade dos resultados. O software para análises tomográficas foi o E-film (Figura 2).



Figura 1: Aparelho helicoidal GE Hi-Speed FXI.
(Fonte: Arquivo pessoal).

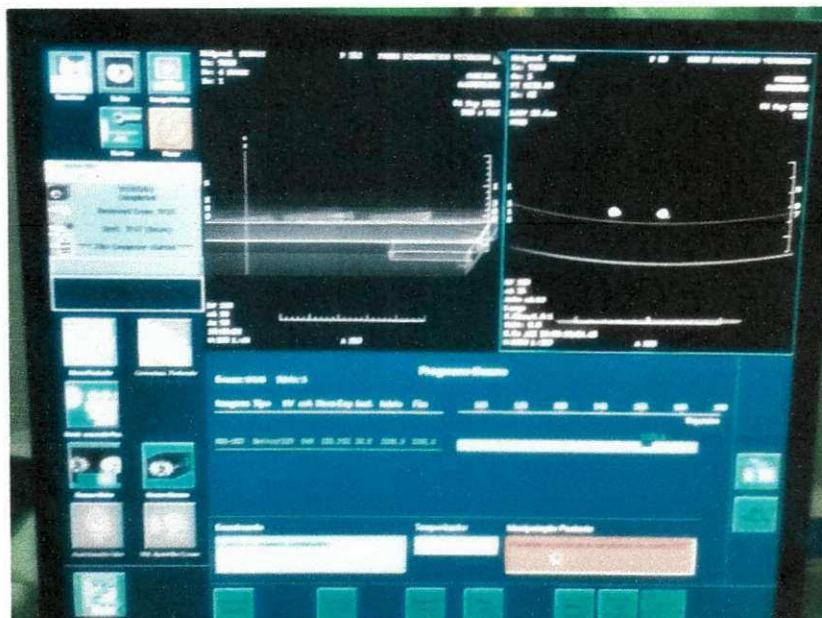


Figura 2: Software para análises tomográficas E-film.
(Fonte: Arquivo pessoal).

3.6 Análise estatística

Para a comparação dos grupos quanto à cicatrização óssea na avaliação por tomografia computadorizada, foi utilizado o teste *t* de Student para dados com distribuição normal. O nível de significância adotado em todas as análises foi de 5% (Zar, 1999).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pós-operatório dos animais foi realizado com sucesso, nenhum animal apresentou sinais de claudicação ou dor nos membros operados durante todo o período do experimento, este fato ocorreu provavelmente devido a pequena lesão óssea produzida, e a associação de meloxicam, que é um fármaco muito eficiente na redução do processo inflamatório e analgesia. (FANTONI, 2002).

Clinicamente os animais apresentaram-se sadios, não houve deiscência de pontos ou processo infeccioso, a cicatrização das feridas cirúrgicas aconteceu de forma normal nos primeiros 10 dias de pós-operatório. O não aparecimento de complicações decorre possivelmente da prática adequada de assepsia, técnica cirúrgica bem executada e emprego de antibioticoterapia (McCURNIN; JONES, 1998). Nenhum dos animais exibiu sinais de rejeição aos implantes, fato este, que comprova a característica de compatibilidade dos mesmos (VITAL, 2006).

Na interface da avaliação tomográfica não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os grupos por momento, nem entre os momentos por grupo, porém o grupo QUI+TCP foi o que se observou melhores resultados entre os tratamentos (Tabela-1). Na interface do compósito foi constatado maior radiopacidade na imagem tomográfica, o que caracteriza maior quantidade de tecido neoformado. Este fato se justifica pela associação dos biomateriais QUI+TCP, pois o trifosfato de cálcio em sua forma alotrópica β , proporciona facilidade na reabsorção do biomaterial pelo organismo por meio dos osteoclastos e os osteoblastos promovendo uma nova formação de tecido ósseo (MORAES et al., 2004). Já a quitosana com sua capacidade osteoindutora, que propicia a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos, como também a ploriferação de macrófagos e liberação de citocinas que aceleram o processo cicatricial dos tecidos (AZEVEDO, 2011). Dessa forma foi observado no presente trabalho que a quitosana maximizou e acelerou o reparo ósseo, apresentando grande potencial osteogênico, atuando como um biomaterial osteoindutor, processo esse também observado no trabalho de Ge et al.(2004).

Tabela 1- Valores médios e desvio padrão do valor de atenuação em HU (unidades Hounsfield) do osso, a partir da média de três das regiões de interesse avaliadas em 45 e 90 dias.

Tempo pós-operatório	Tratamentos			
	C	QUI	QUI+TCP	TCP
45 dias	385,8 ±207,5	588,7±282,6	630,6±109,6	505,5±314,8
90 dias	380,5±283,1	582,8±151,2	624,7±381,1	439,1±265,2

Confirmando nossos resultados, MARTINS (2011) comparou o comportamento de biomateriais constituídos à base de fosfato de cálcio e hidroxiapatita, e verificou que na avaliação morfológica, que o grupo que utilizou TCP, demonstrou a presença de células fagocitárias (células gigantes multinucleadas e macrófagos) promovendo a reabsorção das partículas do biomaterial formando tecido conjuntivo, e a presença de vasos sanguíneos, favorecendo o processo de cicatrização da lesão. Também neste trabalho, foi possível evidenciar na análise histomorfométrica que o percentual médio de tecido ósseo foi aumentando, enquanto que, o percentual de material enxertado foi diminuindo gradualmente até o final do período experimental. Constatando assim, a reabsorção do TCP com posterior formação de tecido ósseo.

SIQUEIRA (2011), que utilizou quitosana para regeneração de falha óssea em fêmur de coelhos, apresenta em sua avaliação histológica a presença de reação celular intensa no sítio da lesão, com a presença de células mesenquimais, osteoblastos e osteoclastos ativos, com grande quantidade de fibroblastos, tecido conjuntivo e intensa neoformação vascular. Desta forma evidenciando assim, o potencial osteoindutor do biomaterial. Resultado também obtido no trabalho de MARIA et al. (2009), que utilizou quitosana no reparo da falha óssea em rádio de coelhos.

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste experimento, conclui-se que o emprego de quitosana e β -trifosfato de cálcio como implante em tecido ósseo, contribuiu no processo cicatricial, acelerando e promovendo neoformação óssea, sendo que a quitosana associada ao TCP propiciou um crescimento ósseo mais acentuado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, A. S. **Utilização de fosfatos de cálcio, quitosana e medula óssea no reparo ósseo em coelhos.** Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico. Patos: UFCG, 2011. p.61. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2011. p.43.

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, dez. 2007.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. **Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos.** Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 15, nº 1, p. 13, 2005.

BATISTA, J. D. **Enxerto ósseo autógeno mantido em diferentes meios de armazenagem no período trans-cirúrgico. Análise histomorfométrica em coelhos.** p. 14, 2007. Disponível em: <http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/2658/1/EnxertoOsseoAutogeno_parte%201.pdf>. Acesso em: 19 de abril de 2013.

BELLINI, O. J. **Síntese e Caracterização de uma Matriz Óssea de Fosfato de Cálcio e Nanocompósitos Fosfato de Cálcio/SiO₂n para Substituição e Regeneração Óssea.** Dissertação (mestrado) - CCT/UDESC, p. 30, 2007. Disponível em: <<http://oatd.org/oatd/record?record=oai%5C:udesc.br%5C:368>> Acesso em: 16 de abril de 2013.

BILLOTTE, W.G. ; LAKES, R. in CORRÊA, R. U.; KUMTA, P.N. et al.; PARK, Y.M. et al.; **Síntese do mineral β -trifosfato de cálcio para uso em biomateriais.** Florianópolis, 2008. p. 7-8.

BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K. Regeneração óssea guiada na Implantologia. São Paulo: Quintessence Books, 1996. in LANDA, L. V. **Estudo comparativo entre terapia com laser de baixa potência e terapia ultra-sônica na promoção da osteogênese em rádio de coelho.** p. 7, 2005. Disponível em: <<http://biblioteca.univap.br/dados/000001/00000117.pdf>>. Acesso em: 13 de abril de 2013.

CARVALHO, V. G. G. **Ossos do sistema temporomandibular de cães e gatos: enfoque anátomo cirúrgico.** p. 24, 2004. Disponível em: <<http://www.usp.br/locfmvz/download/DISS2004-VANESSACARVALHO.pdf>>. Acesso em: 15 de abril de 2013.

DAHLIN, C.; BUSER, D.; SCHENK, RK. **Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia.** São Paulo: Quintessence, 1996. p.31-41.

DALMÔNICO, G. M. L.; D.F.Silva; L.S.; Passoni; R. Prandi; N.H.A. Camargo; E. Gemelli. **Elaboração e caracterização de biomateriais nanoestruturados de fosfatos de cálcio granulados para aplicações odontológicas.** p. 9, 2011. Disponível em: <<http://colaob.com.br/anais>> Acesso em: 15 de abril de 2013.

DAMIAN, César; BEIRÃO, Luiz Henrique; FRANCISCO, Alicia de; ESPIRITO SANTO, Miton L.P.; TEIXEIRA, Evanilda. **Quitosana: um amino polissacarídeo com Características funcionais**. Alim. Nutr., Araraquara. v. 16, n. 2, p. 196-198, abr./jun. 2005.

DAROS, K.A.C. Avaliação das doses de radiação X em exames pediátricos de tomografia computadorizada de crânio com base em estudos de otimização. Tese (Doutorado), 2005. In: PINA, D. R. de; DUARTE, S. B.; NETTO, T. G.; MORDELI, J.; CARBI, E. D. O.; SOUZA R. T. F.; NETO A. C.; RIBEIRO, S. M. **Controle de qualidade e densitometria em equipamentos de tomografia computadorizada**. p. 172, 2009.

DAROZ, L.R.D. et al. Prevention of postoperative pericardial adhesions using thermal sterile carboxymethyl chitosan. Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular, v.23, n.4, p.480-487, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-76382008000400005>. Acesso em: 20 set. 2011.

DENNY, H.R.; BUTTERWORTH, S.J. **Cirurgia ortopédica em cães e gatos**. 4 ed. São Paulo: Roca, 2006. p. 2.

DUKES, H. H.; REECE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.559.

DYCE, K.M. et al, 1997 in ROSA JUNIOR, Anacleto de Souza; RAMOS, Roney dos Santos; PINTO FILHO, Saulo Tadeu Lemos; RAPPETI-PEDROZO, Josaine Cristina da Silva; STAINKI, Daniel Roulim. **Trocleoplastia com broca diamantada para a redução de luxação patelar medial em cães**. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/cic/2010/cd/pdf/CA/CA_00320.pdf>. Acesso em: 15 de novembro de 2011.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G.. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p.12.

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em cães e gatos**. 1ed. São Paulo: Roca, 2002

FILGUEIRA, F. G. F. **Hidroxiapatita associada à quitosana na reparação óssea – Revisão de literatura e estudo experimental em coelhos**. Tese(Mestrado), Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Centro de Saúde e Tecnologia Rural-CSTR, Patos/PB, 2012.

FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 31, p. 930.

FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2002. Cap. 30, p. 847.

FREITAS, S.H.; DÓRIA, R.G.S.; MENDONÇA, F.S.; SANTOS, M.D.; MOREIRA, R.; SIMÕES, R.S.; CAMARGO, L.M.; MARQUES, A.T.C.; SIMÕES, M.J. **Tomografia computadorizada da matriz óssea mineralizada heteróloga e metilmetacrilato na reparação de falhas ósseas segmentares produzidas em tibia de coelhos**. Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia, v.64, n.6, p.1548, 2012.

GAO, Y.; CAO W.I.; WANG X.Y., GONG Y.D., TIAN J.M., ZHAO N.M. Characterization and osteoblast-like cell compatibility of porous scaffolds: bovine hydroapatite and novel hydroxyapatite artificial bone, 2006. In: BATISTA J.D. **Enxerto autógeno mantido em diferentes meios de armazenagem no período trans cirúrgico. Análise histomorfométrica em coelhos.** p.16, 2007. Disponível em: <<http://repositorio.ufu.br/handle/123456789/2658>>. Acesso em: 10 de abril de 2013.

GARRIDO, C.A., WYKROTA, F.H.L. **Uso de Biocerâmica Bifásica Micro-Macro Porosa de Fosfatos de Cálcio na Reconstituição de Grandes Perdas Ósseas em Fraturas Expostas Infectadas de Tibia.** p.7, 2007. Disponível em: <<http://www.uh.cu/centros/biomas/Congresos/biomas99/PIC6.pdf>> Acesso em: 15 de abril de 2013.

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.

GRÜN, R. L.; TEIXEIRA, M. A. C.; LUNARDI, V. B.; FISCHER, C. D. B.; GARRAFIELO, K.; MOREL, A. P.; ALVES, L. C. **Imagem radiográfica, ultrasonográfica e por tomografia computadorizada de cálculos vesicais de estruvita em um cão (relato de caso).** Periódico -Veterinária em Foco v.4, n.1, jul./dez. p. 71, 2006.

GUASTALDI A.C. ; APARECIDA, A.H.. **Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos.** Revista Química. Nova, Vol. 33, No. 6, p.1353-1354, 2010.

GUTIERRES, M.; et al. **Substitutos Ósseos, Conceitos Gerais e Estado Actual.** *ArquiMed.*, v.19, n.4, p. 153-162, 2006.

HIB, J., **Di Fiore histologia.** 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.69.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária.** 6 ed. Barueri-SP: Manole, 2000 p.918.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO J. **Histologia Básica.** Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. p.136-53.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.136.

KACHBURIAN, E.; ARANA CHAVES V. **Histologia e embriologia Oral.** Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. In: BATISTA, J. D. **Enxerto ósseo autógeno mantido em diferentes meios de armazenagem no período trans-cirúrgico. Análise histomorfométrica em coelhos.** p. 14, 2007. Disponível em: <http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/2658/1/EnxertoOsseoAutogeno_parte%201.pdf>. Acesso em: 19 de abril de 2013.

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,** 2003. Disponível em: <[http://www.ualberta.ca/~csps/JPPS6\(1\)/T.Khan/chitosan.htm](http://www.ualberta.ca/~csps/JPPS6(1)/T.Khan/chitosan.htm)>. Acesso em: 3 de março de 2011.

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**. vol. 24, no. 13, pp. 2339–2349, jun. 2003.

MARTINS, M. J. R. **Fabricação pelo processo de sinterização e caracterização de scaffolds de PLLA, PLLA/HA e PLLA/B-TCP**. Trabalho de conclusão de curso em Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Santa Catarina. p. 22. Disponível em: <http://www.emc.ufsc.br/controle/arquivos/estagio/geral/arquivo_333-Mario%20Remor%20Martins.pdf>. Acesso em: 15 de setembro de 2013.

LANDA, L. V. **Estudo comparativo entre terapia com laser de baixa potência e terapia ultra-sônica na promoção da osteogênese em rádio de coelho**. p. 3, 2005. Disponível em: <<http://biblioteca.univap.br/dados/000001/00000117.pdf>>. Acesso em: 13 de abril de 2013.

LIMA, C.R.O.; **Reparação de feridas cutâneas incisionais em coelhos após tratamento com barbatimão e quitosana**. Goiânia: UFGO, 2010. p.27-28. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

LIMA, C.R.O.; **Reparação de feridas cutâneas incisionais em coelhos após tratamento com barbatimão e quitosana**. Goiânia: UFGO, 2010. p.27-28. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

LIMA, I. R.; SILVA, H. M.; PEREGRINO G., SOARES, G.A. **Produção, caracterização físico-química e degradação estática e dinâmica in vitro de grânulos de β -TCP**. p. 1, 2011. Disponível em: <<http://painelpemm.metalmat.ufrj.br/trabalhos/2011/BM/BM-PD-6755.pdf>> Acesso em: 16 de abril de 2013.

MACHADO, P. R. M.; PUERTAS, E. B.; TAGA, E.; NONOSE, N. **Utilização da densitometria óssea como método de avaliação dos resultados da utilização de BMP bovina em artrodese de coluna em coelhos**. p. 45, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-78522005000100011>. Acesso em: 9 de Abril de 2013.

MARIA, B. P.; FILHO, J. G. P.; ZANETTI, N. M.; MAGALHÃES, G. M. **Avaliação histológica dos efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade e da proteína óssea morfogenética carregada em gel de quitosana, no reparo da falha óssea em rádio de coelhos**. p. 3, 2009. Disponível em: <http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_35379907822.pdf> Acesso em: 15 de setembro de 2013.

MARTINS, A. C. O. **Avaliação histomorfométrica comparativa do processo de reparo de defeitos ósseos perenes em calvária de ratos tratados com β -fosfato tricálcio, hidroxiapatita sintética, hidroxiapatita sintética+ β -fosfato tricálcio e osso autógeno**. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo. p. 32, 2011.

MARTINS, A. C. O. **Avaliação histomorfométrica comparativa do processo de reparo de defeitos ósseos perenes em calvária de ratos tratados com β -fosfato tricálcio, hidroxiapatita sintética, hidroxiapatita sintética+ β -fosfato tricálcio e osso autógeno**. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo. p. 32, 2011.

MARX R.E.; STEVENS M.R. Oral an maxillofacial trauma. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997 in BATISTA J.D. **Enxerto autógeno mantido em diferentes meios de armazenagem no período trans cirúrgico. Análise histomorfométrica em coelhos.** p. 16, 2007. Disponível em: <<http://repositorio.ufu.br/handle/123456789/2658>>. Acesso em: 10 de abril de 2013.

MARX, R.E.; STEVENS, 1997. In SILVEIRA, R.J. **Reparo ósseo utilizando enxerto de matriz orgânica bovina. Análise histológica em calvária de coelhos.** p.7, 2007. Disponível em: <http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/2568/6/Reparo%C3%93sseoUtilizando_parte%206.pdf>. Acesso em: 18 de abril de 2013.

MELO, E.G.; NUNES, V.A.; REZENDE, C.M.F.; GOMES, M.G.; MALM, C.; GHELLER, V.A. **Sulfato de condroitina e hialuronato de sódio no tratamento da doença articular degenerativa em cães. Estudo histológico da cartilagem articular e membrana sinovial.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.60, n.1, p.84, 2008.

MISCH, C.A. Implantes Dentários Contemporâneos. Ed: Santos, 2000. In: MEIRELLES, L.S. **O uso de biomateriais em Cirurgia para levantamento Sinusal: Uma revisão do Estágio Atual,** 2010. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/32131/000785994.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 10 de abril de 2013.

MORAES, P. C.; FILHO, J. G. P.; CANOLA, J. C.; SANTOS, L. A.; MACORIS, D. G. ALESSI, A. C. ;CASTRO, M.B.; NETO, F. A. D. **Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos.** p. 357-358, 2004.

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. out. 1994.

OCARINO N. M.; GOMES, M. G.; MELO, E. G.; SERAKIDES R. **Técnica histoquímica aplicada ao tecido ósseo desmineralizado e parafinado para o estudo do osteócito e suas conexões.** J. Bras. Patol. Med Lab. v. 42. n. 1. p. 37, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v42n1/29915.pdf>>. Acesso em: 14 de abril de 2013.

OCARINO N. M.; GOMES, M. G.; MELO, E. G.; SERAKIDES R. **Técnica histoquímica aplicada ao tecido ósseo desmineralizado e parafinado para o estudo do osteócito e suas conexões.** J. Bras. Patol. Med Lab. v. 42. n. 1. p. 37, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v42n1/29915.pdf>>. Acesso em: 14 de abril de 2013.

OCARINO N. M.; GOMES, M. G.; MELO, E. G.; SERAKIDES R. **Técnica histoquímica aplicada ao tecido ósseo desmineralizado e parafinado para o estudo do osteócito e suas conexões.** J. Bras. Patol. Med Lab. v. 42. n. 1. p. 37, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v42n1/29915.pdf>>. Acesso em: 14 de abril de 2013.

OCARINO N. M.; GOMES, M. G.; MELO, E. G.; SERAKIDES R. **Técnica histoquímica aplicada ao tecido ósseo desmineralizado e parafinado para o estudo do osteócito e suas conexões.** J. Bras. Patol. Med Lab. v. 42. n. 1. p. 37, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v42n1/29915.pdf>>. Acesso em: 14 de abril de 2013.

PETER, M. G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. 1995. In: DAMIAN, César; BEIRÃO, Luiz Henrique; FRANCISCO, Alicia de; ESPIRITO SANTO, Miton L.P.; TEIXEIRA, Evanilda. **Quitosana: um amino polissacarídeo com Características funcionais**. Alim. Nutr., Araraquara. v. 16, n. 2, p. 196-198, abr./jun. 2005.

PETERSON, L. J. et al. Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea . 4ed. São Paulo: Elsevier Editora, 2005., 2005. In SOUSA, C. F. S. **Estudo histomorfométrico da reparação óssea em ratos após o uso de biomaterial de origem sintética (Hidroxiapatita + β -Tricalciofosfato)**. Trabalho de conclusão de curso em Odontologia. p.26, 2010.

RABELO G.D. **Efeitos da Radioterapia na Microestrutura do Osso Cortical. Avaliação histológica em coelhos**. p. 10, 2009.

RAYMAY, H. R. R.; ZHANG, M. B. **Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering**. *Biomaterials*, v.25, n. 21, p.5171-5180, setembro de 2004.

ROBERTS, W. E.; TURLEY, P. K.; BREZNIAK, N.; FIELDER, P. J. Bone physiology and metabolism. 1997. In: KARINNE, S. A. **Efeito da terapia com led operando em baixa potência sobre a reparação óssea de ratos- Análise por Espectroscopia Raman**. p. 18, 2009. Disponível em: <<http://biblioteca.univap.br/dados/000002/0000028E.pdf>>. Acesso em: 15 de abril de 2013.

ROSS, M.; ROWRELL, L. J. Histologia: Texto e Atlas. São Paulo: Panamericana, 1993. In: LANDA, L. V. **Estudo comparativo entre terapia com laser de baixa potência e terapia ultra-sônica na promoção da osteogênese em rádio de coelho**. p. 3, 2005. Disponível em: <<http://biblioteca.univap.br/dados/000001/00000117.pdf>>. Acesso em: 13 de abril de 2013.

RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, F.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Rubin Patologia Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 1335.

RÚBIO, C. A. **Estilização e visualização tridimensional de tumores intracranianos em exames de tomografia computadorizada**. p.20, 2003.

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 CondiloFemural de Coelhos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. vol. 14, n. 3, p. 176-180. jul. - set. 2004.

SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia Veterinária**. São Paulo: ROCA, 2011. p. 645.

SILVA, Hélio S. R.C.; SANTOS Kátia S. C. R. dos; FERREIRA, Elizabeth I. **Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços**. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 4, p. 776 e 777, 2006.

SILVEIRA, R.J. **Reparo ósseo utilizando enxerto de matriz orgânica bovina. Análise histológica em calvária de coelhos**. p.7, 2007. Disponível em:

http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/2568/6/Reparo%C3%93sseoUtilizando_parte%206.pdf. Acesso em: 18 de abril de 2013.

SIQUEIRA, **Utilização da Hidroxiapatita, Quitosana e Células da Medula Óssea na regeneração de defeito provocado na metáfise femoral de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Estudo Clínico-Cirúrgico, Histológico e Morfométrico.** Trabalho de conclusão de curso em Medicina Veterinária. p.28 , 2011.

SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais.** Vol.1. 3 ed. São Paulo: Manole, 2007. p.147.

SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais.** 3.ed. Manole: São Paulo, 2007. v.2, Cap. 122, p. 1785 – 1792.

FILGUEIRA, F. G. F. **Hidroxiapatita associada à quitosana na reparação óssea – Revisão de literatura e estudo experimental em coelhos.** Tese(Mestrado), Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Centro de Saúde e Tecnologia Rural-CSTR, Patos/PB, 2012.

SOUSA, C. F. S. **Estudo histomorfométrico da reparação óssea em ratos após o uso de biomaterial de origem sintética (Hidroxiapatita + β -Tricalciofosfato).** Trabalho de conclusão de curso em Odontologia. p.26, 2010.

SOUSA, C. F. S. **Estudo histomorfométrico da reparação óssea em ratos após o uso de biomaterial de origem sintética (Hidroxiapatita + β -Tricalciofosfato).** Trabalho de conclusão de curso em Odontologia. p.26, 2010.

THUR, N. K.; NARANG, C. K., 1990. In: DAMIAN, César; BEIRÃO, Luiz Henrique; FRANCISCO, Alicia de; ESPIRITO SANTO, Miton L.P.; TEIXEIRA, Evanilda. **Quitosana: um amino polissacarídeo com Características funcionais.** Alim. Nutr., Araraquara. v. 16, n. 2, p. 196-198, abr./jun. 2005.

VITAL, C. C.; BORGES, A. P. B.; FONSECA, C. C.; TSIOMIS, A. C.; CARVALHO, T. B.; FONTES, E. B.; SENA, M. P.; FÓFANO, G. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.2, p.175-183, 2006.

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.nov. 2002.

ZAR, J. H. **Bioestatistical analysis.**4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1998.