

Lílian Débora Paschoalin Miguel

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO REPARO ÓSSEO EM FÊMUR DE
RATOS SUBMETIDOS A ENXERTO BOVINO COMPOSTO OU
INORGÂNICO**

**RECIFE
2009**

Lílian Débora Paschoalin Miguel

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO REPARO ÓSSEO EM FÊMUR DE RATOS
SUBMETIDOS A ENXERTO BOVINO COMPOSTO OU INORGÂNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Anatomia Patológica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Paloma Lys Medeiros

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco de A. Limeira Júnior

**RECIFE
2009**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE- REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Hilton Justino da Silva

RECIFE

2009



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo
Fone/Fax: (81) 2126.8529
<http://www.pgmap@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>



Autora: **LÍLIAN DÉBORA PASCHOALIN MIGUEL**

Área de Concentração: **PATOLOGIA**

Nome da Dissertação: **"AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO REPARO ÓSSEO EM FÊMUR DE RATOS SUBMETIDOS A ENXERTO BOVINO COMPOSTO OU INORGÂNICO".**

Orientadora: **DRA. PALOMA LYS DE MEDEIROS**

Co-orientador: **DR. FRANCISCO DE ASSIS LIMEIRA JÚNIOR**

Dissertação defendida para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Data: 04 de setembro de 2009

Banca Examinadora:

Profa. Dra. **Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima**

Prof. Dr. **Roberto José Vieira de Mello**

Prof. Dr. **Frederico Barbosa de Sousa**

A **Deus** – fonte da inteligência, mentor da perseverança e origem suprema de
toda a bondade: por me guiar e me permitir chegar até aqui.

A meu filho **Pedro**, por alegrar minha existência e suportar, mesmo ainda
pequeno, minhas (tantas) ausências.

A meus pais **Miguel** e **Maria Terezinha**, e a meus irmãos **Ulisses** e
Eduardo, pelo apoio incansável e, sobretudo, pelo amor incondicional que
me dedicam.

Minha eterna gratidão, por sempre acreditarem em mim.

*“Fé é acreditar naquilo que você não vê; a recompensa
dessa fé é ver aquilo em que você acredita.”*

(Agostinho)

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial à professora Dra. **Paloma Lys Medeiros**, por sua incomparável compreensão e delicadeza, e ao professor Dr. **Francisco de Assis Limeira Júnior**, pela objetividade e constante motivação. A ambos agradeço, ainda, pela generosidade, dedicação, paciência e solicitude. Estejam certos de que, sem vocês, este trabalho não teria se materializado.

À professora **Dra. Margareth de Fátima Formiga de Melo Diniz**, diretora do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, agradeço por sua permanente acolhida e disposição em investir no potencial humano da Instituição.

Ao **Laboratório de Experimentação Animal** e ao **Laboratório de Microscopia e Imagens Biológicas** do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Neste último, agradeço especialmente à pessoa do professor **Dr. Frederico Barbosa de Sousa**, pesquisador legitimamente vocacionado e exemplo de determinação.

Ao professor Dr. **Roberto José Vieira de Melo**, da Residência Médica em Anatomia Patológica e do Mestrado em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco. Por ser, de fato, Mestre dos que têm o privilégio de encontrá-lo

enquanto alunos: sua integridade e sensibilidade, competência e marcante amor ao ensino são valores inestimáveis e exemplos inesquecíveis em minha vida.

Ao Departamento de Informática da UFPB, em especial ao mestrando **Thallys Pereira de Almeida**, pelos valiosos préstimos que levaram à concretização dos trabalhos de morfometria deste estudo.

Ao **Laboratório de Histotecnologia do Mestrado em Patologia da UFPE** e à sua funcionária **Silvânia Paz**, por sua boa vontade e desejo de fazer sempre o melhor.

Ao Senhor **Luís Crispim**, funcionário do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB e ao mestrando em Ciências da Nutrição **Alan Ferreira**, pela imprescindível colaboração infra-estrutural durante o manuseio dos animais estudados.

Às grandes amigas **Idalina Gentilini** e **Fátima Silveira**, pelo carinho e conforto espiritual jamais negados; aos amigos **Álvaro Júnior**, **Hálamo Moura** e **Raimundo Sales Filho**, pela mão estendida em momentos críticos da vida profissional.

Às queridas **Andréa Queiroga** e **Raquel Fernandes** que, durante esta jornada, conquistaram todo o meu respeito e apreço. São, certamente, profissionais e amigas com quem se pode contar..

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho, meu profundo agradecimento.

Finalmente, na pessoa do professor Dr. **Nicodemos Teles de Pontes Filho**, agradeço **aos que fazem o Mestrado de Patologia da UFPE**. O respeito à ciência e a dedicação desta equipe enriquecem a comunidade acadêmica e contribuem valiosamente para o desenvolvimento da pesquisa em nosso meio.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Este estudo objetivou analisar e comparar o reparo ósseo em fêmur de ratos submetidos ou não à enxertia com biomateriais xenogênicos de origem bovina (enxerto composto de matriz orgânica e mineral ou enxerto inorgânico). Foram padronizados defeitos de 3mm³ no fêmur esquerdo de 30 ratos *Wistar albinus* machos, adultos-jovens, divididos em três grupos: I, utilização de enxerto bovino composto (Gen-Mix®); II, enxerto bovino inorgânico (Gen-Ox®); III, reparo fisiológico (controle). Os animais foram sacrificados após 15 e 30 dias do evento cirúrgico e os espécimes obtidos foram processados e corados por HE e Picrosirius red, sendo avaliados histológica (reação do tipo corpo estranho, infiltrado inflamatório, vascularização, tecido conjuntivo fibroso, atividade osteoblástica e neoformação óssea) e morfometricamente (cálculo da área de osso neoformado através de segmentação de imagens, utilizando o algoritmo K-médias). Histologicamente, não foram encontradas reações do tipo corpo estranho nem diferenças estatísticas entre os níveis de vascularização ou neoformação óssea nas comparações estudadas. Nos demais parâmetros, diferenciaram-se: a) o nível de infiltrado inflamatório no grupo III (leve aos 15 dias, inexistente/inconspícuo aos 30); b) a formação de tecido conjuntivo fibroso entre os grupos I/II aos 15 dias (moderado no primeiro, leve no segundo) e no grupo II (leve aos 15 dias, inexistente/inconspícuo aos 30); c) a atividade osteoblástica, aos 30 dias, entre os grupos I/III (intensa no primeiro, moderada no segundo). Morfometricamente, os maiores índices de neoformação óssea (área e média de área) foram encontrados no grupo I (30 dias) e os menores no grupo III (15 dias), com diferença estatística entre tais subgrupos aos 15 dias. A área média de neoformação óssea do grupo II foi maior que a do grupo III aos 15 e 30 dias. Os grupos I e II não diferiram significativamente. O estudo concluiu que a) os biomateriais de origem bovina na forma composta e inorgânica contribuíram no processo de reparação dos defeitos ósseos; b) o biomaterial na forma composta associou-se a uma reparação mais precoce, bem como a uma maior deposição de matriz óssea neoformada (mm²) aos 15 dias.

Palavras-chave: Reparo ósseo. Materiais biocompatíveis. Ratos.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze and compare the effect of two xenografts (bovine-derived mixed bone or bovine-derived inorganic bone) on bone repair in induced bone defects of rat femurs. A 3mm³ standardized bone defect were created on the left side femur surface of 30 *Wistar albinus* rats (healthy male young-adults), which were divided into three groups: I, defects filled by organic/inorganic bone-graft (Gen-Mix®); II, bovine inorganic bone (Gen-Ox®); III, physiological healing (control). Animals were sacrificed 15 and 30 days after surgery, and the removed specimens were stained by HE and Picrosirius red techniques in order to be histologically (foreign body reaction, inflammatory infiltrate, newborn vessels, fibrous connective tissue, osteoblastic activity, newbone formation) and morphometrically evaluated (seven-clustering image segmentation method, using k-means algorythm). Histologically, there was no expression of foreign body reaction in the samples and no difference among its vascular or newbone formation patterns. In the other comparisons: a) Group III revealed difference in inflammatory infiltrate grades (low at 15-days animals and absent/inconspicuous at 30-days ones); b) fibrous connective tissue pattern was different between groups I/II (moderate in first, low in second) and in group II itself (low at 15 days, inexistent/inconspicuous at 30). c) osteoblastic activity was moderate in group I and low in group III, at 30 days. 2) Morphometrically, the higher level of newbone formation area was found in group I (30 days) and the lower one in group III (15 days). There was significant difference between this groups at 15 days. The bone formation area observed in group II was higher than in group III at 15 and 30 days. There was no statistical difference between groups I and II. We conclude that a) the biomaterials used in this study contributed to the bone healing process; b) An earlier bone repair and larger area of newbone formation at 15 days was associated to bovine-derived mixed bone.

Key-words: Bone Repair. Biocompatible Materials. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	– Proteínas não-colágenas do osso: correspondem a 10% dos componentes orgânicos da matriz extracelular, exercendo diferentes funções na regulação da mineralização e mediação célula-matriz com proteínas estruturais.	26
Figura 02	– Animais acondicionados em gaiolas plásticas guarneçadas com ração e água.	53
Figura 03	– Motor modelo DRYLLER 350 BML.	55
Figura 04	– Sistema de Brocas PPM®.	56
Figura 05	– Sistema de Captura de Imagens (microscópio MOTIC®, BA 300)	56
Figura 06	– Software Motic Images™ Plus 2,0 (captação da imagem de corte histológico de fêmur corado por Picrosirius red – subgrupo C-15).	57
Figura 07	– Procedimentos pré-cirúrgicos: (a) animal anestesiado e tricotomizado, ladeado por instrumental; (b) campo cirúrgico fenestrado e aplicado sobre o sítio operatório após assepsia.	59
Figura 08	– Exposição do plano ósseo após incisões cutânea e fascial paralelas ao maior eixo do osso, seguida de difusão das fibras musculares.	60
Figura 09	– Defeito ósseo de 3,0 mm ³ no fêmur esquerdo.	61
Figura 10	– Defeito ósseo preenchido por grânulos de biomaterial bovino.	62
Figura 11	– Fechamento do defeito: (a) tecidos moles reposicionados e sutura interrompida simples (catgut cromado); (b) sutura cutânea interrompida simples (seda 3-0).	61
Figura 12	– Fêmur removido após sacrifício: (a) cavidade preenchida por coágulo; (b) cavidade preenchida por enxerto de origem bovina.	64

Figura 13 – (a) e (b): fêmur descalcificado e submetido a clivagem inicial (observar defeito).	65
Figura 14 – Campo de fotomicrografia selecionado após captura da imagem (v.fig 06), a ser submetido a segmentação por classes e posterior análise morfométrica. Grupo controle aos 15 dias (C-15). Picrosirius red, aumento de 40X.	68
Figura 15 – Classe 1, resultante da segmentação da figura 14: (a) cores originais em “RGB”; (b) imagem após a binarização.	69
Figura 16 – Classes 2 e 3 (“a” e “b”, respectivamente), resultante da ressegmentação da figura 14.	69
Figura 17 – Imagem final para contagem de pixels e cálculo da área em mm ² .	70
Figura 18 – Fotomicrografia do grupo I aos 15 dias (subgrupo GM-15). Observar tecido ósseo neoformado partindo das bordas do defeito (seta) e preenchendo áreas restritas da cavidade. Picrosirius red, aumento de 40X.	73
Figura 19 – Fotomicrografia do grupo I aos 30 dias (subgrupo GM-30). Trabéculas ósseas bem formadas e vascularizadas, tecido conjuntivo fibroso superficial e intertrabecular, sede de exsudato hemático e mononuclear. Áreas (a) e (b) ampliadas na Figura 20. HE, aumento de 40X.	74
Figura 20 – Detalhes da Figura 19: (a) zona de neoformação óssea, com trabécula vascularizada (seta); tecido conjuntivo denso (permeado por exsudato hemático e mononuclear) em superfície e entre partículas de enxerto composto. HE, aumento de 100X; (b) invasão osteoblástica em partícula enxertada, com neoformação ósteo-vascular (seta). HE, aumento de 400X.	74
Figura 21 – Fotomicrografia do grupo II aos 15 dias (subgrupo GX-15). Trabéculas ósseas delicadas e coalescentes, estendendo-se por zonas superficial e cavitária (osso neoformado circundando o biomaterial). Picrosirius red, aumento de 40X.	75
Figura 22 – Fotomicrografia do grupo II aos 30 dias (subgrupo GX-30). Observar o fechamento do defeito e remanescentes de enxerto na porção superior do campo (seta). Escassez de tecido neoformado na porção central. Picrosirius red, aumento de 40X.	76

Figura 23 – Fotomicrografia do grupo III aos 15 dias (subgrupo C-15). Trabéculas ósseas ocupam parte das bordas e do fundo da cavidade, com tecido conjuntivo denso na região central (seta). HE, aumento de 40X.	77
Figura 24 – Fotomicrografia do grupo III aos 30 dias (subgrupo C-30). Neoformação óssea concentrada na porção superficial da cavidade, com ponte tecidual entre as bordas (espessura menor que a metade da observada nas margens - seta). Picrosirius red, aumento de 40X.	77
Figura 25 – Parâmetros de avaliação histológica: (a) infiltrado inflamatório; (b) vascularização; (c) tecido conjuntivo fibroso; (d) atividade osteoblástica; (e) neoformação óssea. HE, aumento de 100X.	78
Figura 26 – Frequência e graduação do infiltrado inflamatório tecidual aos 15 e 30 dias.	80
Figura 27 – Infiltrado inflamatório: exsudação mononuclear em meio a tecido conjuntivo denso que permeia área entre partículas de enxerto (seta). HE. Aumento de 400X.	81
Figura 28 – Frequência e graduação da vascularização do tecido aos 15 e 30 dias.	82
Figura 29 – Vascularização do osso neoformado: diferenciar de trabéculas que circundam medula óssea. HE, aumento de 100X.	83
Figura 30 – Frequência e graduação da presença de tecido conjuntivo fibroso aos 15 e 30 dias.	84
Figura 31 – Tecido conjuntivo fibroso: centro do campo, em meio às trabéculas ósseas (seta). À esquerda e acima, osteoblastos intensamente ativados, com aumento volumétrico e marcada basofilia citoplasmática. HE, aumento de 100X.	85
Figura 32 – Frequência e graduação da atividade osteoblástica aos 15 e 30 dias.	86
Figura 33 – Atividade osteoblástica: partícula de enxerto circundada por tecido ósseo neoformado. Basofilia do citoplasma osteoblástico (seta). HE, aumento de 400X.	87
Figura 34 – Frequência e graduação da neoformação óssea aos 15 e 30 dias.	88

- Figura 35 – Neoformação óssea:** (a) tecido ósseo em torno e no interior de partícula enxertada (seta). Picrosirius red, aumento de 400x. (b) tecido ósseo neoformado a partir da borda do defeito (seta), contrastando com tecido fibroconjuntivo e partículas de biomaterial. Picrosirius red, aumento de 100X. 89
- Figura 36 –** Estatísticas descritivas. Áreas de osso neoformado nos grupos I (GM), II (GX) e III (C), após 15 e 30 dias. 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	–Parâmetros histológicos em subgrupos com sacrifício aos 15 dias.	79
Tabela 02	–Parâmetros histológicos em subgrupos com sacrifício aos 30 dias.	79
Tabela 03	–Valores de p para comparações inter-grupos e intra-grupos (15/ 30 dias).	79
Tabela 04	–Tabela 04 – Valores descritivos do infiltrado inflamatório aos 15 e 30 dias.	81
Tabela 05	–Valores descritivos da vascularização aos 15 e 30 dias.	83
Tabela 06	–Valores descritivos de tecido conjuntivo fibroso aos 15 e 30 dias.	85
Tabela 07	–Valores descritivos da atividade osteoblástica aos 15 e 30 dias.	87
Tabela 08	–Valores descritivos de neoformação óssea aos 15 e 30 dias.	89
Tabela 09	–Estatísticas descritivas: valores absolutos de área de osso neoformado (mm ²) aos 15 e 30 dias.	90
Tabela 10	–Estatísticas descritivas: área de osso neoformado aos 15 e 30 dias.	91
Tabela 11	–Valores de U e p em comparações inter-grupos e intra-grupos (15/30 dias).	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 – Classificação dos biomateriais substitutos ósseos.	36
Quadro 02 – Grupo I: ENXERTO ÓSSEO BOVINO GEN-MIX®	54
Quadro 03 – Grupo II: ENXERTO ÓSSEO DESPROTEINIZADO GEN-OX®	54
Quadro 04 – Grupo III: CONTROLE	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOS	Atividade osteoblástica
BMP	Proteína morfogenética do osso
β-CaSiO₃	β -silicato de cálcio
β-CS	β -silicato de cálcio
C	Grupo controle
Ca	Cálcio
Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂	Hidroxiapatita
BMSCs	Células estromais da medula óssea
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CFB	Cálcio fosfato bifásico
EEB	Encefalopatia espongiforme bovina
FA	Fosfatase alcalina
GTP	Proantocianidinas oligoméricas e gelatina
GM	Grupo Gen-Mix
GX	Grupo Gen-Ox
HÁ	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina-eosina
HU	Hospital Universitário
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
INF	Infiltrado inflamatório
L*a*b	Sistema de cores definidas pelo brilho (L*) e pelas coordenadas de cromaticidade (a* e b*)
LAMIB	Laboratório de microscopia e imagem biológica
LEA	Laboratório de experimentação animal
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
N	Número
P	Nível de significância
PGDF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGA	Ácido poliglicólico

PLGA	Ácido poli-lático-co-ácido glicólico
RCE	Reação de corpo estranho
RGB	Sistema de cores aditivas formado por vermelho (Red), verde (Green) e azul (Blue)
TCF	Tecido Conjuntivo Fibroso
TCP	Tricálcio fosfato
TGF-β	Fator transformador de crescimento β
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1. TECIDO ÓSSEO E BASES BIOLÓGICAS DE SEU REPARO	25
2.2. BIOMATERIAIS SUBSTITUTOS: RESPOSTA ÓSSEA E SUBTIPOS	33
2.2.1. <i>Biomateriais Substitutos Ósseos: Origem Sintética</i>	37
2.2.2. <i>Biomateriais Substitutos Ósseos: Origem Bovina</i>	43
3. OBJETIVOS	49
3.1. OBJETIVO GERAL	50
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
4. MATERIAL E MÉTODO	51
4.1. RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA	52
4.2. MODELO ANIMAL	52
4.3. TAMANHO DA AMOSTRA	52
4.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DA AMOSTRA	53
4.5. ACONDICIONAMENTO E ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS	53
4.6. ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS	54
4.7. EQUIPAMENTOS	55
4.8. INSTRUMENTAL CIRÚRGICO	57
4.9. MATERIAL DE CONSUMO	57
4.10. ESPAÇO FÍSICO	58
4.11. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	58
4.12. BIOMATERIAIS SUBSTITUTOS ÓSSEOS	63
4.13. SACRIFÍCIO E OBTENÇÃO DA AMOSTRA TECIDUAL	63
4.14. PROCEDIMENTO LABORATORIAL	64

4.15. ANÁLISE HISTOLÓGICA	66
4.16. CAPTAÇÃO DE IMAGENS	67
4.17. ANÁLISE MORFOMÉTRICA	67
4.18. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	70
5. RESULTADOS	72
5.1. ASPECTOS GERAIS - GRUPO I: ENXERTO COMPOSTO	73
5.2. ASPECTOS GERAIS - GRUPO II: ENXERTO INORGÂNICO	75
5.3. ASPECTOS GERAIS - GRUPO III: CONTROLE	76
5.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA	78
<i>5.4.1. Infiltrado Inflamatório</i>	80
<i>5.4.2. Vascularização</i>	82
<i>5.4.3. Tecido Conjuntivo Fibroso</i>	84
<i>5.4.4. Atividade Osteoblástica</i>	86
<i>5.4.5. Neoformação Óssea</i>	88
5.5. ANÁLISE MORFOMÉTRICA	90
6. DISCUSSÃO	93
7. CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	106
ANEXOS	113
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL	114
ANEXO B – RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA ANIMAL	115

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A perda tecidual ocorrida após traumas sobre o esqueleto, procedimentos cirúrgicos e lesões de natureza diversa, assim como defeitos ósseos de natureza congênita, sempre foram preocupação de profissionais relacionados a diferentes especialidades cirúrgicas, tais como Ortopedistas, Cirurgiões-plásticos e Cirurgiões-dentistas. Desde épocas remotas, a procura por técnicas de tratamento que possam incrementar o processo fisiológico de recuperação do tecido ósseo tem sido uma constante entre pesquisadores e cirurgiões e a busca do entendimento dos fenômenos relativos ao padrão de formação óssea, bem como do alcance da estrutura e função teciduais tem sido perseguida por décadas, sendo fonte de avanços significativos ou grandes frustrações (LIMEIRA JÚNIOR, 2001; RIPAMONTI *et al.*, 2009).

O processo de reparo espontâneo do tecido ósseo inicia-se imediatamente após a instalação de qualquer evento lesivo, com vistas à reposição da porção perdida (TAGA, 1997). Seu controle não só perpassa pela influência de elementos locais – citocinas e fatores de crescimento –, mas depende ainda da ação de substâncias sistêmicas, como hormônios (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006), além das próprias forças mecânicas atuantes na área. Biologicamente, mesclam-se fenômenos químicos, hemopoiéticos e imunológicos que, em cascata, orquestram migração, quimiotaxia, proliferação, diferenciação e produção proteica por parte de células diversas (mesenquimais, condroblastos, osteoblastos, agentes do sistema mononuclear fagocitário), com a finalidade de dar origem a tecido ósseo neoformado e ajustado às necessidades das estruturas por ele constituídas (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005).

Verificam-se, contudo, casos em que a perda óssea é suficientemente grande para limitar a capacidade intrínseca de reparação tecidual. Desta maneira, objetivando incrementar a eficácia do processo, bem como reduzir o tempo necessário ao restabelecimento de uma condição tecidual desejável ao osso danificado, vários estudos buscam alternativas para modular biologicamente as várias etapas do reparo ósseo. Estas incluem, por exemplo, o uso de fatores de crescimento, como proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs – *Bone Morphogenetic Proteins* – SCHNETTLER *et al.*, 2008), laserterapia (QUEIROGA *et al.*, 2008), membranas poliméricas atuando como guias para regeneração tecidual (GTR – *Guided Tissue Regeneration*, CRUMP *et al.*, 1996) e enxertia óssea (CARDOSO, 2008), ou ainda associações entre métodos (DAMIEN; PARSONS, 1991; PINHEIRO *et al.*, 2003; LIMEIRA JÚNIOR, 2004; 2005; GERBI *et al.*, 2005; GUTIERRES *et al.*, 2006; ABOELSAAD *et al.*, 2008; ADEYEMO *et al.*, 2008; KUZNETSOV *et al.*, 2008).

Em se tratando de enxertia, considera-se a doação autóloga (obtida a partir do próprio indivíduo) o “padrão-ouro” na provisão de preenchimento dos defeitos ósseos pois, além de altamente osteogênica, é imunologicamente inerte. Tal método, entretanto, demanda a existência de dois sítios operatórios, não só implicando em debilitação da zona doadora, mas ainda em aumento da ocorrência de dor, sangramento e tempo anestésico, incluindo eventual necessidade de anestesia geral, com conseqüente aumento da morbidade (ADEYEMO *et al.*, 2008; TUDOR *et al.*, 2008). Além disso, há que se considerar ainda a limitação da disponibilidade óssea para doação, especialmente em crianças ou adultos previamente submetidos a procedimentos cirúrgicos no local.

Nesta perspectiva, com o intuito de reforçar a estrutura óssea ou preencher uma perda sem os inconvenientes de um autoenxerto e os riscos potenciais de transmissão de doenças infecciosas inerente aos aloenxertos (obtidos a partir de outros indivíduos), tem-se

ênfâtizado o uso de agentes que, criados ou extraídos da natureza, substituem o tecido ósseo ou associam-se a ele: os denominados biomateriais.

O uso de biomateriais para tecidos firmes foi alavancado pelo crescente número de cirurgias reconstrutoras em que se necessita de enxertia adjuvante. Conz *et al.* (2005) ressaltam, por exemplo, dados do Ministério da Saúde brasileiro que indicam ter sido o número de procedimentos utilizando hidroxiapatitas (HAs) no ano de 2003 superior ao dobro, quando comparado ao ano anterior. Em virtude de tal demanda, inúmeros estudos têm sido realizados no sentido de averiguar a eficácia de diversos agentes, como β -tricálcio fosfato (KNABE *et al.*, 2008), polímero de mamona (LAUREANO FILHO *et al.*, 2007) e derivados ósseos bovinos orgânicos e inorgânicos (LIMEIRA JÚNIOR *et al.*, 2003; LIMEIRA JÚNIOR, 2004).

De forma geral, os enxertos ósseos liofilizados são produzidos apenas na versão orgânica ou inorgânica e representam, portanto, apenas uma fração do osso. Sendo assim, julgamos interessante investigar os efeitos da ação de um tipo de enxertia que inclui todos os componentes do tecido ósseo sobre o reparo do mesmo. Uma vez contendo suas frações orgânica e inorgânica, espera-se que tal forma, dita composta, estimule o reparo ósseo de modo combinado, ou seja, integrando os potenciais bioestimuladores de ambas.

Este estudo pretende contribuir para o conhecimento do comportamento do reparo ósseo em resposta à utilização de biomateriais xenógenos de origem bovina, tanto na forma composta quanto na forma inorgânica.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO E BASES FISIOLÓGICAS DE SEU REPARO

O tecido ósseo apresenta características que o tornam singular quando comparado aos demais tecidos do corpo: constituído por elementos biológicos distintos e funcionalmente complementares, o osso integra diferentes tipos celulares a uma matriz extracelular diferenciada, devido à presença de grande quantidade de fibras colágenas acrescida de material mineral. O resultado é um ambiente tecidual intensamente rígido e resistente, embora simultaneamente dotado de ampla plasticidade. É considerado um tecido conjuntivo especializado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Funcionalmente, os ossos relacionam-se não somente à mobilidade corpórea (ao suportar e alavancar a força motriz da musculatura esquelética) e à proteção de órgãos vitais situados na intimidade dos arcabouços craniano, raquidiano e torácico, mas ainda ao alojamento da medula óssea e ao armazenamento de íons diversos, especialmente cálcio (até 99% de sua totalidade) e fosfato, cuja concentração nos fluidos corporais acha-se constantemente mantida por trocas estabelecidas entre estes e o tecido ósseo (GARTNER; HIATT, 2003).

Macroscopicamente, o osso pode ser denominado esponjoso ou compacto, de acordo com a presença ou não de múltiplas cavidades visíveis. Tal aspecto encontra também reflexo na observação microscópica: enquanto o primeiro constitui-se de estruturas trabeculares separadas por espaços intercomunicantes, ocupados por tecido conjuntivo frouxo e/ou células da medula óssea, o segundo é caracteristicamente coeso, deixando entrever espaços menores pelos quais transitam vasos e nervos (YOUNG; HEATH, 2000).

À parte tais diferenças arquiteturas, todo tecido ósseo é composto de uma matriz extracelular bifásica, onde há porção orgânica e inorgânica, esta última representando de 50% a 65% do peso total do osso (FOGAÇA, 2007), bem como por três tipos diferenciados de células: osteoblastos e osteócitos, ambos derivados de uma célula mesenquimal primitiva, e osteoclastos, oriundos do Sistema Mononuclear Fagocitário.

Os osteoblastos formam uma camada contínua sobre a superfície óssea que está sendo produzida (osteóide). São células mononucleadas e polarizadas, que não só sintetizam a parte orgânica da matriz (fibras colágenas, especialmente do tipo I, fibras não colágenas [Figura 01] e pequena quantidade de substância fundamental amorfa, contendo proteoglicanas e glicoproteínas), mas também participam de sua mineralização, através da concentração de fosfato de cálcio.

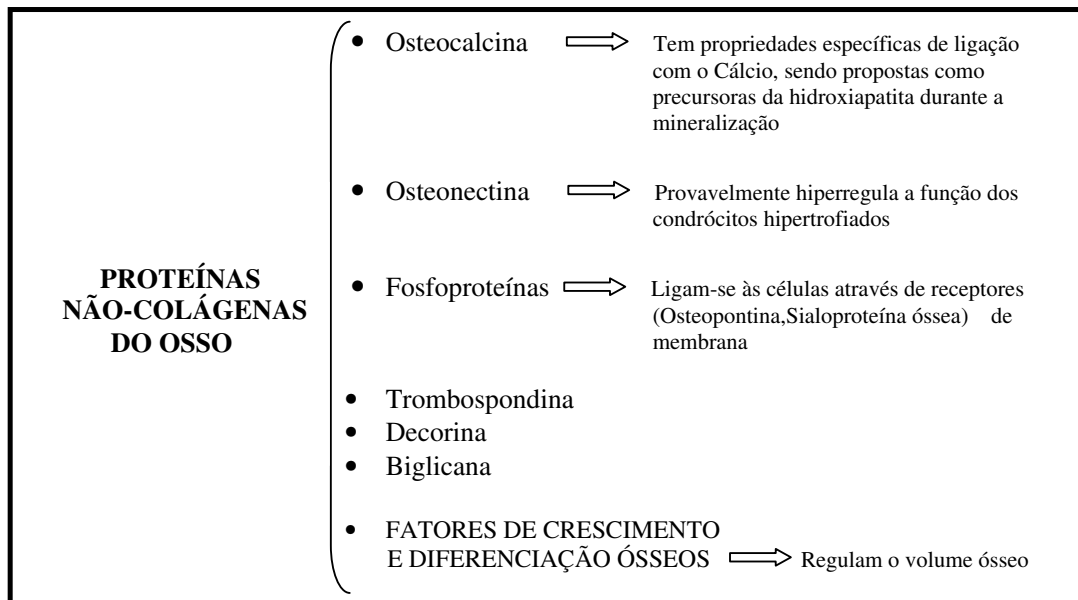


FIGURA 01 – Proteínas não-colágenas do osso: correspondem a 10% dos componentes orgânicos da matriz extracelular, exercendo diferentes funções na regulação da mineralização e mediação célula-matriz com proteínas estruturais (GIORDANO, V.; GIORDANO, M; KNACKFUSS, 2000).

Há muito se conhece a correlação existente entre calcificação e os níveis da enzima fosfatase alcalina (FA), que são elevados na superfície da membrana plasmática de osteoblastos e pré-osteoblastos (REDDI; ANDERSON, 1976). Tais células secretam, ainda, fatores de regulação tecidual e de crescimento (como interleucina-6 e fator de crescimento transformador- β , respectivamente), que tanto agem na proliferação e diferenciação quanto na atividade osteoblástica (TEM CATE, 2001).

Os osteócitos são a versão madura dos osteoblastos, células que foram circundadas pela matriz previamente produzida. Possuem delgados e longos prolongamentos citoplasmáticos e a matriz mineralizada ao seu redor origina uma lacuna central e inúmeros canálculos, os quais circundam, respectivamente, seu corpo e seus prolongamentos. Os osteócitos, portanto, tomam a forma de sua lacuna, com núcleo achatado e citoplasma pobre em organelas. Embora de aparência inativa, são responsáveis pela manutenção do tecido circundante (GARTNER; HIATT, 2003). Sua mecanorresponsividade influencia a arquitetura e densidade ósseas através de controle do fluxo de fluido intersticial através do sistema canálculo-lacunar, induzido pela produção de moléculas sinalizadoras (NULEND; BACABAC; MULLENDER, 2005).

Os osteoclastos, por sua vez, são células multinucleadas e dotadas de ampla mobilidade. Pertencem ao Sistema Mononuclear Fagocitário, originando-se a partir de um precursor em comum com os monócitos, a célula progenitora granulócito-macrófago (GARTNER, HIATT, 2003). Seu citoplasma é caracteristicamente equipado com aparato químico de finalidade lítica – ácido (H^+), collagenase e outras hidrolases. Sofrem influência de citocinas e hormônios, aparecendo apenas raramente no tecido ósseo adulto íntegro (SCHELL *et al.*, 2006).

Os osteoclastos são capazes de erodir o osso, e sua ativação é o primeiro evento desencadeado na sequência do processo remodelativo. Juntamente com os osteoblastos,

têm importância na constante rotatividade e remodelação ósseas. Os osteoblastos produzem collagenase, removendo a camada de osteóide e expondo a matriz mineralizada previamente ao fenômeno reabsortivo, e seus sinalizadores regulam a atividade osteoclástica, levando à migração e adesão destas células à superfície a ser removida (YOUNG; HEATH, 2000; ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O controle funcional intra-ambiental das células ósseas envolve quimiotaxia, proliferação, diferenciação e produção de proteínas da matriz extra-celular, sendo realizado por polipeptídeos de ação parácrina e outros sinalizadores, denominados citocinas. Estas são moléculas solúveis de baixo peso molecular que, quer expressas por proteínas de membrana, quer secretadas e ligadas a receptores em células-alvo, desempenham papel vital na regulação do tecido ósseo tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006). Atuam em sincronidade com fatores de crescimento, os quais respondem pelo direcionamento de células-tronco para as vias condrogênica e osteogênica do reparo ósseo (SICCA *et al.*, 2000).

Dentre os principais fatores de crescimento (FC) presentes no tecido ósseo, destacam-se: FC Fibroblastos (FGF), FC semelhante à Insulina (IGF), FC transformador - β (TGF- β), FC derivado de Plaquetas (PGDF) e Proteínas Morfogenéticas do Osso (BMPs – *Bone Morphogenetic proteins*) (MARCATONIO JÚNIOR; MARCATONIO; CIRELLI, 1999). Além destes, há os fatores de crescimento e diferenciação ósseos (FCDO), polipeptídeos de baixo peso molecular produzidos em pequenas concentrações pelos osteoblastos (menos de 1% das proteínas não-colágenas do osso), com finalidade reguladora do volume esquelético (LIND, 1998). Neste contexto, a diferença entre as BMPs e outros fatores de crescimento é que as primeiras atuam nas células precursoras da

região medular e tecidos moles adjacentes, enquanto os demais agem sobre células já diferenciadas (SIGURDSON *et al.*, 1995).

A quebra da homeostase tecidual provocada pela solução de continuidade óssea impulsiona o início de um processo reparativo por originar, ela própria, a liberação de peptídeos reguladores dos processos inflamatórios e da osteogênese e remodelação teciduais. Tais elementos, ao ligarem-se a receptores de membrana em osteoblastos e outras células, estimulam a expressão de genes relacionados ao desencadeamento e perpetuação da neoformação óssea (LIMEIRA JÚNIOR, 2001).

Em qualquer dos tipos macroscópicos de osso, o primeiro tecido a ser formado é, histologicamente, denominado primário. Este será progressivamente substituído por uma versão tecidual mais madura, classificada como osso secundário ou lamelar. Enquanto o primeiro possui fibras colágenas dispostas em direções diversas, no segundo estas organizam-se em lamelas de 3 a 7 μm de espessura, que, ou ficam paralelas umas às outras, ou arranjam-se de forma concêntrica em torno de canais, formando os Sistemas de Havers: também denominados ósteons, estes são estruturas cilíndricas e por vezes bifurcadas que, na diáfise dos ossos longos, distribuem-se paralelamente ao seu maior eixo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

De forma geral, o ósteon, cujo tamanho varia de 100 a 400 μ de diâmetro e 1 a 2 mm de comprimento, é constituído por quatro a vinte lamelas dispostas concêntricamente em torno de um canal – o canal de Havers. Em cada uma delas as fibras colágenas são paralelas umas às outras e, separando grupos de lamelas, ocorre frequentemente o acúmulo de uma substância cimentante, constituída por matriz mineralizada com muito pouco colágeno. Espaços lacunares, contendo osteócitos, encontram-se entre as lamelas, muito embora também possam situar-se em seu interior (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A estrutura lamelar é de fundamental importância para a manutenção da integridade óssea. Sabe-se que a dureza e resistência de sua matriz está relacionada à associação das fibras colágenas com cristais formados por cálcio e fósforo, os quais têm a estrutura da hidroxiapatita (HA), com a seguinte composição: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. O tamanho desta molécula é progressivamente aumentado com a liberação de fosfatase alcalina por osteoblastos e pré-osteoblastos (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006), até que atinja entre 25 a 50Å de largura e 100Å de comprimento. Sua superfície de contato é muito grande, o que favorece as trocas iônicas, e sua relação com o colágeno é direta, colocando-se paralelamente ao seu eixo longitudinal, tanto devido à ação de forças mecânicas quanto por ligações físicas diretas (MODOLIN; SOUZA, 1993).

Sabe-se, atualmente, que a combinação química de elementos orgânicos e inorgânicos não é a única responsável por conferir ao osso seus atributos de resistência. A própria disposição arquitetural do tecido compacto é, também, um fator que agrega proteção e estabilidade ao arcabouço esquelético. Tal afirmativa foi demonstrada por Deng; Chen; Lee (2009), que desenvolveram um modelo computadorizado para avaliar a propagação de microfraturas no tecido ósseo compacto, o constituinte da camada cortical. O estudo, que comparou características morfológicas da porção intra e inter-osteônica, avaliou ainda a importância do cimento nesta interface, demonstrando que a estrutura osteônica e a linha cimentante atuam como uma barreira à propagação de microrrachaduras no osso compacto. No modelo em questão, em resposta a uma força oscilante aplicada sobre uma superfície óssea, percebeu-se que ósteons mais flexíveis tendem a atrair roturas lamelares intersticiais em sua direção. Ainda assim, as pequenas linhas de fratura que se dirigiram ao ósteon foram desviadas para o interior da linha cimentante.

Adicionalmente, foi aferido que não apenas a estrutura morfológica original permite a interrupção da propagação destas lesões. O próprio processo de reparo tecidual, além de recompor a porção perdida, atua de forma similar, protegendo o feixe vasculo-nervoso existente no interior dos canais de Havers. Um modelo de fenômeno reparativo comprovou que, sob a ação da mesma força anteriormente empregada, o tecido em cicatrização comportou-se de forma diferente daquele destituído de reparo local. Neste último, a microfratura propagou-se sem ser interrompida mesmo quando atingia a linha cimentante. Desta forma, avalia-se que a combinação entre o processo de reparo local e a linha cimentante atua como barreira, contribuindo para a extinção da progressão da trajetória de uma microrrachadura óssea (DENG; CHEN; LEE, 2009).

Toda superfície óssea, externa ou interna, é isolada do contato direto com o tecido circundante por meio de um revestimento constituído por células osteogênicas e tecido conjuntivo. Tratam-se, respectivamente, de membranas conhecidas como periósteo e endósteo. O periósteo é fonte de células durante o crescimento e reparação do osso, garantindo-o também de inervação e vasculatura sanguínea e linfática. Sua composição em dupla camada abriga, mais internamente, fibras elásticas e células osteoprogenitoras, as quais derivam do mesênquima e são capazes de se diferenciar em osteoblastos (ou, em condições de baixa oxigenação, em condroblastos). Na camada mais externa, por sua vez, há tecido conjuntivo denso-não-modelado, abundantemente dotado de fibroblastos e fibras colágenas, algumas das quais penetram no tecido ósseo e prendem o periósteo à superfície subjacente (fibras de Sharpey). Esta membrana é importante mantenedora da integridade estrutural do osso, apresentando-se em espessuras e níveis de vascularização variados, tanto mais proeminentes quanto mais jovem for o osso em questão (FOGAÇA, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os eventos relativos ao reparo de uma lesão óssea são análogos aos presentes na cicatrização normal de feridas em tecidos moles, mas a consistência elevada do osso restringe tanto o edema quanto os mecanismos vasculares envolvidos. De imediato, em virtude da rica vascularização do periósteo e do conteúdo medular, a instalação de uma fratura leva a uma intensa hemorragia, dando origem ao preenchimento local por um coágulo que, em seguida, transmuta-se em um trombo intra-ósseo. O suprimento vascular é interrompido de um modo retrógrado, o que amplia a área lesional em ambos os lados da fratura, pois a falta de irrigação dos sistemas de Havers aumenta o número de osteócitos mortos. Instalam-se, aqui, três estágios – inflamatório, fibroblástico e remodelador – que, muito embora não ocorram de forma mutuamente exclusiva, participam do reparo ósseo de forma definida e interdependente. Devido ao fato de estar sendo frequentemente remodelado, este tecido tem um alto poder de regeneração (GARTNER; HIATT, 2003), e a reparação pode ser tão perfeita a ponto de não ser percebida posteriormente a exames radiográficos, ou mesmo histológicos (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2005; HUPP, 2005).

O estágio inflamatório dura de 3 a 5 dias, desde que na ausência de fatores que o prolonguem. É dito bifásico, apresentando fenômenos inicialmente vasculares (vasodilatação e modificação da permeabilidade capilar) e, na sequência, predominantemente celulares (leucoestase, marginação e migração leucocitárias). O estágio fibroblástico, por sua vez, inicia-se a partir da formação da rede de fibrina que deriva do processo de coagulação sanguínea, sobre a qual tais células podem iniciar a precipitação de substância fundamental e tropocolágeno. Nesta fase, o periósteo e o endósteo próximos à área fraturada respondem com uma intensa proliferação e geram um tecido muito rico em células osteoprogenitoras, o qual não só forma um colar em torno da fratura quanto penetra entre as extremidades rompidas (HUPP, 2005).

É neste anel, e também no tecido conjuntivo encontrado entre aquelas extremidades, que surge tecido ósseo imaturo, onde células mesenquimais dão origem ora a condroblastos (relacionados à ossificação endocondral), ora a células osteoprogenitoras (relacionadas à ossificação intramembranosa, por síntese osteóide sobre tecido conjuntivo). Desta forma, há múltiplos padrões teciduais passíveis de ser encontrados, simultaneamente, no local de reparação, até que, após algum tempo, forma-se um tecido que excederá as margens da lesão: o calo ósseo. Inicialmente osteóide, este é progressivamente mineralizado e, com o retorno às trações normais, determina-se o último estágio, a remodelação óssea, por meio de reabsorção osteoclástica e substituição do tecido primário por osso lamelar (GARTNER; HIATT, 2003).

Segundo Schell *et al.* (2006), a atividade osteoclástica inicia-se precocemente, aumentando progressivamente no curso da cicatrização do tecido ósseo, a fim de garantir-se a completa remodelação do mesmo. Se as trações forem idênticas às pré-existentes, também o osso neoformado assumirá estrutura idêntica ao estágio pré-lesional (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.2 BIOMATERIAIS SUBSTITUTOS: RESPOSTA ÓSSEA E SUBTIPOS

Gutierrez *et al.* (2006) relatam que, segundo a conferência de Chester, em 1991, biomaterial é um elemento destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo. Estes autores preconizam que o mesmo deve ser destituído de características oncogênicas, ter resistência mecânica e permitir boa adesividade celular à sua superfície; deve ser hemostático e esterilizável; por fim, uma vez aplicado, deve não somente preservar tais características mas, simultaneamente, substituir a função fisiológica para a qual foi criado. Um substituto

ósseo é, portanto, qualquer material de origem humana, animal, vegetal ou sintética, com validade tanto para a reconstituição do capital ósseo quanto para o reforço estrutural deste ou preenchimento de uma perda de origem traumática ou ortopédica.

Quando se trata do tecido ósseo, diferenciado dos demais por sua resistência e dureza, a incorporação de qualquer biomaterial substituto passa por cinco estágios, a saber: a) inflamação, com resposta celular local e sistêmica; b) revascularização tecidual; c) osteocondução, na qual o enxerto dá suporte mecânico para o crescimento de novos vasos e tecido ósseo; d) osteoindução, em que células mesenquimais do hospedeiro são induzidas à diferenciação osteoblástica por ação das BMPs; e) remodelação tecidual, com neoformação e reabsorção contínuas de osso (SOCCOL *et al.*, 2006).

Este processo tem sua velocidade influenciada, em grande parte, pelo nível de vascularização do local afetado. Segundo Williams *et al.* (2006), a integração de um enxerto ósseo depende da microvascularização do implante. Ao se comparar os subtipos cortical e esponjoso de osso, por exemplo, observa-se que a incorporação de um biomaterial tende a ser mais lenta no primeiro, uma vez que sua lenta vascularização diminui a possibilidade de anastomoses término-terminais. Assim, quanto mais lenta a angiogênese, mais demorado é o processo de reparo ósseo. Por esta mesma razão, há maior probabilidade de que o osso cortical permaneça com uma porção viável e outra necrótica, enquanto o osso esponjoso venha a ser completamente restaurado (PINTO; MIAGUSKO; PEREIRA, 2003).

Espitalier *et al.* (2009) também se reportaram à importância da capacidade de revascularização durante o reparo quando avaliaram a utilização de substitutos ósseos em sítios previamente irradiados. Em virtude da terapêutica empregada em casos de carcinomas espino-celulares no trato digestivo e respiratório superiores, por exemplo, há freqüente associação de ampla remoção óssea com terapia radioativa completar. Segundo

os autores, a irradiação produz efeitos colaterais irreversíveis nos tecidos, aumentando o risco de falência perfusional e de redução da capacidade reparativa em virtude do decréscimo numérico de células e vasos. Durante estudo em que defeitos ósseos em fêmur e tíbia de ratos (0,3cm de diâmetro) foram preenchidos por biomaterial inorgânico, ora isolado, ora associado a células mesenquimais (derivadas da medula óssea ou do tecido adiposo) ou medula óssea total, observou-se um reparo ósseo significativamente maior nos casos de associação biomaterial/medula óssea total. Entretanto, mesmo na forma isolada, foram comprovadas a biocompatibilidade e capacidade de suportar a neoformação óssea do biomaterial, a despeito das circunstâncias envolvendo o quadro tecidual de pós-irradiação.

Os biomateriais substitutos ósseos podem ser classificados quanto à sua origem, composição química ou mecanismo de ação (Quadro 01). Em casos onde a enxertia mostra-se como a alternativa mais apropriada para preencher um defeito ósseo, considera-se como ideal a utilização de material obtido a partir do próprio organismo (enxerto autógeno). Sua superioridade em relação às demais opções reside no fato de ser o único tipo de enxerto ósseo a fornecer células imunocompatíveis vivas, essenciais à osteogênese, havendo uma relação direta de proporcionalidade entre a quantidade de células vivas transplantadas e o montante de tecido ósseo neoformado (ELLIS III, 1996). Além disso, apenas os enxertos autógenos englobam a totalidade dos mecanismos de ação já conhecidos, enquanto todos os demais substitutos ósseos agregam apenas uma parte das referidas qualidades (TUDOR *et al.*, 2008).

Quadro 01 - Classificação dos biomateriais substitutos ósseos.

BIOMATERIAIS SUBSTITUTOS ÓSSEOS	
ORIGEM (BATISTA JÚNIOR, 1999)	. Autógenos (Obtidos a partir do próprio indivíduo) . Alógenos (Oriundos de uma mesma espécie. Obtido em banco de ossos humanos na versão desmineralizada, liofilizada e desidratada por congelamento, ou não desmineralizada, desidratada por congelamento) . Xenógenos (Oriundos de outras espécies - usualmente bovina) . Aloplásticos (Derivados inorgânicos, como fosfato tricálcio e hidroxiapatita sintética)
COMPOSIÇÃO QUÍMICA (GUTIERRES <i>et al.</i>, 2006)	. Metais e ligas metálicas (Titânio) . Cerâmicas (Materiais à base de fosfato de cálcio: fosfato tricálcio, hidroxiapatita) . Polímeros (Poliuretana de mamona, ácido poli-L-lático [PLLA], ácido poli-lático-co-ácido glicólico [PLGA]) . Compósitos (Biovidro-poli-hidroxibutirato)
MECANISMO DE AÇÃO (TUDOR <i>et al.</i>, 2008)	. Osteocondutores (Geralmente inorgânicos, suportam o crescimento ósseo ao longo de uma superfície de contato. Sobre eles aloca-se tecido ósseo formado a partir de células osteoprogenitoras pré-existentes) . Osteoindutores (Induzem a diferenciação osteoblástica a partir de células mesenquimais indiferenciadas) . Osteopromotores (Impedem que células distintas, como fibroblastos, preencham a região em detrimento dos osteoblastos, cuja proliferação é mais lenta) . Osteogênicos (Geralmente orgânicos, estimulam a formação óssea diretamente a partir de osteoblastos)

Por outro lado, contrariamente à indicação de enxertia autógena, apontam-se a limitação de área doadora e a necessidade de duas zonas cirúrgicas, entre outros complicadores, os quais incluem, inclusive, um custo mais elevado, tendo em vista que tais procedimentos devem se dar em âmbito hospitalar (LIMEIRA JÚNIOR, 2004).

2.2.1 Biomateriais Substitutos Ósseos: Origem Sintética

A natureza provê diversos materiais compostos por fosfato de cálcio (Ca-P), como alguns elementos derivados de corais. Tais substâncias, contudo, também podem ser sintetizadas por meio de reações de precipitação quimicamente desencadeadas, gerando os fosfatos de cálcio (CP) aloplásticos. Estes têm sido usados em procedimentos de reconstrução óssea nos campos da ortopedia, cirurgia oral e maxilofacial desde o início da década de 1970 (JENSEN *et al.*, 2008).

Uma das nítidas vantagens deste tipo de material é a possibilidade de que sejam produzidos não só em quantidade ilimitada, mas com a composição similar ao osso *in natura*. Assim, quando na forma de hidroxiapatita, têm um índice de proporção Ca/P de 1,67, o que é igual à fase inorgânica da estrutura cristalográfica do osso. Além dos materiais cerâmicos à base de fosfato de cálcio (hidroxiapatita – HA; fosfato tricálcio – TCP; biocompósitos à base de fosfato de cálcio; cimentos de cerâmica injetáveis), pertencem a este grupo elementos como o sulfato de cálcio e os biovidros, dentre outros (GUTIERRES *et al.*, 2006; JENSEN *et al.*, 2008).

Há uma importante propriedade relativa aos substitutos ósseos em geral, denominada osteotransdução, que relaciona-se à substituição do biomaterial pelo osso neoformado (GALEA *et al.*, 2008). Sabe-se que, de acordo com a extensão da dissolução dos compostos de fosfato de cálcio, um substituto ósseo pode ser absorvível ou não, e os

fatores que afetam esta dissolução são similares aos que afetam sua biodegradação ou biorreabsorção. Assim, é desejável que os substitutos ósseos sejam não só bioativos, como também biodegradáveis. Dentre todos, a hidroxiapatita (HA) é o derivado mais conhecido e bem estudado - entretanto, deve-se salientar que, nas áreas médica e odontológica, o termo “hidroxiapatita” é, muitas vezes, utilizado para descrever qualquer biomaterial de constituição fosfato-cálcica (CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2005).

A larga difusão da HA enquanto substituto ósseo deve-se ao fato de tratar-se de substância bioativa, não-tóxica, que provoca pouca reação tecidual e com importante efeito osteocondutor (relacionado à presença de poros cujo tamanho varia entre 100 e 1500 μ m, bem como à existência de macro e microporos interconectantes), o que incrementa a aposição de tecido ósseo hospedeiro que circunda os fragmentos de HA implantados (MOREIRA *et al.*, 2003; SCHNETTLER *et al.*, 2008).

Rosa *et al.* (2000), referiram que as cerâmicas de hidroxiapatita são obtidas inicialmente na forma de pó (aglomerado de partículas em simples justaposição), condição em que não apresentam propriedades mecânicas. A fim de obter-se uma amostra compactada, em geral aplica-se uma carga sobre uma certa quantidade de pó. Dentre as técnicas mais utilizadas, destacam-se pressão uniaxial, vazamento em moldes (não se utiliza carga), pressão uniaxial em altas temperaturas e pressão isostática em altas temperaturas. As condições de preparação e sinterização a que são submetidas estas cerâmicas afetam sua porosidade e, quanto maior quantidade de microporos (< que 10 μ m), maior a interferência negativa na biocompatibilidade deste substituto ósseo.

A fim de buscar alternativas ao uso da HA, muito se tem pesquisado a respeito das propriedades de outros biomateriais. O β -tricálcio fosfato (β -TCP), por exemplo, é uma biocerâmica porosa e reabsorvível, quimicamente representada por β -Ca₃(PO₄)₂. Tal

substância é, atualmente, amplamente difundida como eficaz no preenchimento de defeitos ósseos devido à sua íntima similaridade química à apatita biológica presente nos tecidos ósseos, o que lhe confere marcada biocompatibilidade (CANCEDDA; GIANNONI; MASTROGIACOMO, 2007). Entretanto, à parte tal qualidade, afirma-se que este material mostra menor formação óssea *in vivo* e sua osteointegração não é ideal (LIVINGSTON *et al.*, 2006).

Fujita *et al* (2003) compararam o padrão de osteogênese e reabsorção do β -TCP e da HA. Para tanto, utilizaram blocos com macro e microporos no preenchimento de defeitos produzidos no osso parietal de ratos Wistar. Após análise histomorfométrica, constatou-se que a neoformação óssea teve aumento progressivo em ambos os grupos, embora tenha se mostrado significativamente maior nos poros dos blocos de HA. Além disso, o bloco de HA manteve-se praticamente estável durante todo o período, embora tenha havido grande redução na quantidade remanescente do bloco de β -TCP.

Jensen *et al.* (2008), por sua vez, realizaram estudo no qual combinaram hidroxiapatita e fosfato tricálcio (HA/TCP), gerando um composto denominado fosfato de cálcio bifásico (BCP). Segundo os autores, a variação do índice HA/TCP permite modular a taxa de degradação e a bioatividade destes materiais. Estes obtiveram, através de reações químicas de precipitação, compostos de BCP com proporções de HA/TCP estabelecidas em 20/80, 60/40 e 80/20. Após estudo em miniporcos, comparando tais produtos com osso autógeno ou osso bovino mineral desproteínizado (*deproteinized bovine bone mineral - DBBM*), observaram que: tanto a formação óssea quanto a taxa de reabsorção no grupo de enxertia autógena foi similar à do grupo BCP 20/80, porém maior que os demais; O grupo DBBM foi o único a não revelar degradação evidente ao término do estudo.

Xu *et al.* (2008), também objetivando a obtenção de substitutos ósseos mais bioativos e biodegradáveis, avaliaram componentes à base de cálcio contendo sílica,

através do estudo da utilização do β -silicato de cálcio (β -CS) no reparo de lesões produzidas na calvária de coelhos. Investigando-o como uma alternativa viável, tal substância (β -CaSiO₃) foi comparada ao β -fosfato tricálcio e, morfometricamente, houve superioridade estatisticamente significativa de crescimento ósseo nos grupos tratados (β -CS) em relação ao controle (β -TCP). À observação histológica, houve maior invasão óssea dos poros do biomaterial silicado, como também de uma camada semelhante à apatita óssea na interface entre o biomaterial e o osso hospedeiro.

Na mesma perspectiva, Chen *et al.* (2009) chamaram atenção para o fato de que um substituto ósseo ideal deve ser capaz de ser reabsorvido ou dissolvido naturalmente, à medida que o novo tecido cresce. Ao estudar o fosfato tricálcio (TCP - Ca₃(PO₄)₂) como uma alternativa ao uso da hidroxiapatita, os autores destacam que o composto perde facilmente sua estabilidade estrutural e, por esta razão, necessita ser agregado a uma liga adequada, como polímeros naturais (colágeno) ou sintéticos, para que seus grânulos não migrem, mantendo-se no interior das lojas ósseas. Desta forma, associaram o TCP a proantocianidinas oligoméricas e gelatina, implantando-no no tecido celular subcutâneo de ratos adultos (determinação da biodegradação e biocompatibilidade *in vivo*) ou na calvária de coelhos (avaliação de potencial osteocondutor). Nos grupos controle os autores utilizaram matriz óssea bovina desproteinizada e, segundo os mesmos, houve óbvia superioridade do material testado, tanto por ter ocorrido maior neoformação óssea quanto progressiva substituição do mesmo, efeitos resultantes da ação combinada de osteocondução e biodegradação.

Objetivando agregar potencial osteoindutor aos biomateriais osteocondutores, estes podem ser utilizados como veículos de administração de fatores de crescimento (FCs). Com este intuito, Schnettler *et al.* (2008) recobriram cilindros de hidroxiapatita, de

reconhecida osteocondutividade, com FCs. Neste estudo, lojas ósseas em ambas as tíbias de miniporcos (Yucatan-micropigs, *Sus scrofa*) receberam implante com cilindros de HA, ora isolados, ora revestidos por proteína morfogenética recombinante do osso humano-2 (rhBMP-2). Os espécimes foram acompanhados radiologicamente e submetidos a análise fluorocrômica para avaliação dinâmica do tempo de formação óssea. A análise histomorfométrica (após 12 semanas) revelou que a osteocondutividade da HA levou ao crescimento do osso hospedeiro circundante para o interior dos implantes; entretanto, apenas o grupo contendo rhBMP-2 demonstrou significativa neoformação óssea multitópica, efeito caracteristicamente osteoindutivo, bem como incorporação tecidual quase que completa ao osso hospedeiro.

Outros procedimentos de engenharia tecidual têm buscado conjugar recursos biológicos diversos para o incremento do reparo ósseo. Kuznetsov *et al.* (2008) afirmaram, por exemplo, que transplantes em que se combinam células estromais da medula óssea (BMSCs - *bone marrow stromal cells*) a um arcabouço de hidroxiapatita e fosfato tricálcio (HA/TCP), são eficazes na formação de osso cortical para a reconstrução crânio-facial em modelos animais de maior porte. A facilidade de obter um extrato de medula óssea e expandi-lo em cultura tecidual tornam-no um excelente candidato para utilização em terapias de base celular na reconstrução de defeitos ósseos e, durante estudo em que avaliaram a estabilidade a longo prazo de tais enxertos, os autores observaram histológica, morfométrica e radiograficamente, formação significativamente maior de tecido ósseo nos implantes contendo BMSCs, em relação ao controle (HA/TCP sem conjugação celular). Além disso, o volume ósseo observado no primeiro foi mais aproximado ao inicial, enquanto houve reabsorção quase que completa dos implantes do grupo controle.

Wang *et al* (2009) estudaram uma outra estratégia para a associação biológica de implantes aloplásticos, utilizando a composição de β -TCP e osteoblastos autólogos para

enxertia alveolar na mandíbula de cachorros edêntulos da raça *beagle*. Tal associação foi comparada ao uso de β -TCP, na forma isolada, e de osso autógeno obtido da crista ilíaca (controle). Os animais foram acompanhados por meio de marcação fluorescente e acompanhamento radiográfico, bem como avaliados histológica e morfometricamente, no intuito de comparar mineralização e neoformação óssea em cada grupo. Os autores observaram marcado incremento de ambos os parâmetros no grupo β -TCP/osteoblastos, quando comparado ao grupo submetido exclusivamente ao implante de β -TCP. Além disso, o tecido ósseo tratado com a combinação demonstrou também maior peso e espessura no confronto com o grupo autogenamente enxertado.

Ainda pertencentes à categoria de substitutos ósseos de origem sintética, destacam-se os vidros bioativos, ou biovidros. Tratam-se de vidros de sistemas especiais que, quando imersos em soluções aquosas que simulam o plasma sanguíneo, expressam a capacidade de agregar sobre sua superfície uma camada biologicamente ativa e hidratada, rica em cálcio e fósforo (GUERRA NETO; PAIVA; COSTA, 2005). Atribui-se a estas partículas a propriedade de ligarem-se intimamente ao osso e tecidos moles do hospedeiro (DYBVIK *et al*, 2007).

ABOELSAAD *et al.* (2008) realizaram experimento no qual defeitos produzidos na mandíbula de 36 ratos *Wistar* foram preenchidos por biovidros, sendo a metade concomitantemente tratada com aplicação de laser de baixa potência de gálio-alumínio-arsênio (GaAlAs laser). Segundo os autores, a irradiação laser acelerou significativamente o reparo ósseo nos grupos tratados de forma conjunta nos dois primeiros períodos. Entretanto, ao final do estudo (12 semanas), todos os animais apresentaram completa resolução do processo, não havendo diferença perceptível entre os grupos. Desta forma, tanto foi demonstrada a eficácia da luz laser na aceleração do processo de reparo ósseo, quanto a patente bioatividade do material aloplástico utilizado.

2.2.2 Biomateriais Substitutos Ósseos: Origem Bovina

Inúmeras empresas têm, atualmente, desenvolvido substitutos ósseos de origem bovina, a alternativa mais comum de xenoenxerto a ser utilizada em lugar dos enxertos autógenos. Como exemplo, Zambuzzi *et al.* (2006) citam Schering (Luboc®), Sulzer (Ne-osteo®), Geislich (Bio-Oss®) e Baumer (Gen-Ox®). Entretanto, pesquisas envolvendo biomateriais xenógenos remontam a décadas passadas, sendo encontrados trabalhos envolvendo o preenchimento de defeitos ósseos a partir dos anos 60 (MELCHER; DENT, 1962).

Este tipo de substituto ósseo pode ser obtido a partir de ossos longos de espécies bovinas e seu processamento permite a apresentação de dois tipos de material: osso cortical nas versões inorgânica, desproteinizada, ou orgânica, desmineralizada. Sua comercialização se dá na forma de macro e microgrânulos, blocos ou, ainda, como membrana desmineralizada reabsorvível (ZAMBUZZI, 2006). Um xenoenxerto requer a manutenção da estrutura e os componentes originais do tecido ósseo, embora associada à remoção dos componentes orgânicos potencialmente imunogênicos (SPECTOR, 1994).

Segundo Batista Júnior *et al.* (1999), o desenvolvimento destes biomateriais foi alavancado a partir da concepção de que um substituto ósseo ideal deveria manter estabilidade mecânica e volume durante as fases iniciais do reparo para, em seguida, ser progressivamente reabsorvido e substituído pelo novo osso. Os autores afirmaram que o osso inorgânico demonstrou ser incapaz de desencadear reações imunológicas, cursando apenas com monocitose transitória imediatamente após sua implantação, fenômeno que também foi constatado em implantes de HA. Quanto à porção orgânica, por sua vez, há muito já se demonstrou que a implantação subcutânea de matriz colágena extraída da diáfise femoral de ratos resultou em neoformação óssea pela via endocondral (REDDI,

1976). Assim, uma vez suprimidos os elementos imunogênicos desta fração, obtém-se, também, biomaterial potencialmente eficaz.

Sanada *et al.* (2003) afirmaram que a obtenção de osso bovino inorgânico, com grande quantidade de hidroxiapatita, porém livre de proteínas e células, pode ser obtido por meio de tratamento térmico que exige temperaturas acima de 300°C (muito embora destaque-se que, quanto mais alta a temperatura, menor a propriedade bioabsortiva do material). Por outro lado, um tratamento ósseo à base de solventes orgânicos, álcalis e ácidos, sob temperatura controlada, remove células, detritos celulares e várias proteínas não colágenas, além da porção mineral. Ao término do procedimento, resta apenas um arcabouço proteico constituído de pequena quantidade de fatores de crescimento (BMPs) e colágeno tipo I, o qual é fortemente homólogo ao colágeno humano.

Wenz; Oesch; Hortst (2001), investigaram a possibilidade de transmissão de encefalopatia espongiforme bovina – EEB (BSE – *bovine spongiform encephalopathy*), a “doença da vaca louca”, por meio de implantes xenógenos. Os autores realizaram um estudo comparativo em que foram utilizados dois biomateriais de origem bovina (Bio-Oss® e Osteograf®), o qual incluiu a aferição experimental da capacidade de inativação priônica durante um dos passos da produção do Bio-Oss®. Segundo os mesmos, os dados resultantes das análises teórico-experimentais indicaram ausência de risco de transmissão da doença aos pacientes enxertados.

Orr *et al* (2001) destacaram, ainda, que os enxertos ósseos devem manter uma relação adequada entre resistência e elasticidade. Enquanto a resistência correta previne o colapso do osso que circunda uma lesão, a elasticidade interfere na remodelação do tecido adjacente. Substâncias muito densas e com elasticidade excessiva podem influenciar de forma adversa este processo, resultando em remodelação não-anatômica, com perda óssea em algumas áreas e densificação em outras. No intuito de investigar tais parâmetros, estes

autores averiguaram propriedades mecânicas compressivas em defeitos confeccionados no fêmur de coelhos, comparando a) controle anatômico (animais não operados); b) controle (defeito preenchido por coágulo); c) tratado com osso bovino inorgânico – OBI (defeito preenchido por Bio-Oss®); d) tratado com hidroxiapatita - HA - sintética (defeito preenchido por Calcitek®). As avaliações se deram por meio de testes mecânicos e análise histomorfométrica. Os resultados deste experimento demonstraram, quanto à força compressiva, superioridade do grupo tratado com OBI em relação ao grupo controle; por sua vez, o grupo tratado com HA sintética foi significativamente superior a ambos. Quanto à elasticidade, o grupo tratado com OBI mostrou-se estatisticamente indistinto do grupo controle, enquanto que o tratado com HA sintética mostrou valores significativamente maiores.

Adeyemo *et al.* (2008) ressaltaram a problemática da reabsorção imprevista ou colapso estrutural de enxertos (especialmente dos autógenos de origem endocondral), interrogando uma possível ação apoptótica em tais circunstâncias. Os autores avaliaram o uso da membrana colágena (Bio-Guide®) e do osso bovino inorgânico (Bio-Oss®) enquanto adjuvantes no reparo de lesões inicialmente submetidas a enxertia do tipo *onlay*, na mandíbula de ovelhas. Após a enxertia, três grupos foram comparados: I) não houve terapêutica adicional; II) além do enxerto, a área foi recoberta por membrana colágena; III) após o enxerto, e previamente à colocação da membrana, aplicaram-se grânulos de osso bovino inorgânico. Foram procedidas análise histológica e imunohistoquímica, no intuito de averiguar proliferação (ki67) e apoptose (Caspase-3) durante o reparo e incorporação dos enxertos mandibulares, e os resultados mostraram pronunciada reabsorção no grupo I, perda volumétrica mínima no grupo II (em 2 espécimes sem deslocamento da mesma) e importante aumento do reforço ósseo mandibular no grupo III. Os osteoblastos no interior do enxerto expressaram moderados níveis de Ki67 após 8 semanas (com marcado declínio

posterior), e a expressão mais forte de Caspase-3 foi observada após 16 semanas. Os autores concluíram que o efeito da cobertura por membrana na manutenção do enxerto depende da estabilidade desta durante o reparo e que o uso do osso inorgânico aumentou significativamente o reforço tecidual. O estágio tardio do reparo tecidual foi associado com indução apoptótica de osteoblastos que recobriam a superfície do tecido ósseo neoformado.

Busenlechner *et al.*(2008), afirmaram que a comparação simultânea de substitutos ósseos é dificultada pelo número limitado de amostras que podem ser testadas conjuntamente. Partindo do princípio que, ainda que, por si só, as propriedades dos diferentes materiais substitutos ósseos podem afetar o processo de consolidação tecidual, os autores avaliaram os efeitos do reparo ósseo em defeitos produzidos na calvária de miniporcos, os quais foram preenchidos com hemiesferas de titânio contendo Bio-Oss® (osso bovino inorgânico), Ostim® (hidroxiapatita sintética nanoparticulada) e Osteoinductal® (suspensão oleosa de hidróxido de cálcio). Após 6 e 12 semanas, as hemiesferas foram submetidas a análise histológica e morfométrica, constatando-se que, nos dois primeiros grupos (Bio-Oss® e Ostim®) os elementos estavam quase que completamente preenchidos por osso - o que não ocorreu com o Osteoinductal. Desta forma, o modelo criado mostrou-se adequado para avaliação de consolidação de enxertos e, neste estudo, as propriedades do implante xenógeno foram similares à do aloplástico.

Carneiro *et al.* (2005), a fim de avaliar o papel dos enxertos xenógenos orgânicos, conduziram experimento no qual defeitos ósseos em ambos os fêmures de coelhos foram preenchidos por partículas de osso medular bovino desmineralizado (Gen-Ox®), nas formas micro (0,25 – 1,0mm) e macrogranular (1,0 – 2,0mm), ou apenas por coágulo sanguíneo. Os 24 espécimens estudados foram submetidos a análise radiográfica e histológica após o prazo de 1, 3 e 6 meses. A avaliação histológica destacou a presença de reações granulomatosas do tipo corpo estranho envolvendo as partículas implantadas e,

radiologicamente, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (microgranular, macrogranular e controle) avaliados no mesmo período - tal significância foi expressa apenas quando da comparação entre períodos distintos. Os autores concluíram não haver influência do tamanho das partículas no desenvolvimento do processo reparativo, mas chamaram atenção para a necessidade de rígido controle de qualidade na produção do biomaterial, a fim de que sejam removidos, efetivamente, todos os elementos potencialmente antigênicos.

No ano anterior, Marins *et al.* (2004), também utilizando osso bovino orgânico durante experimento na calvária de ratos, obtiveram resultado histológico similar quanto à reação granulomatosa. Os autores concluíram que, quando bem controlada a qualidade de produção do biomaterial de origem bovina, este constitui-se em ótima alternativa para o reparo ósseo, devido à sua alta capacidade osteocondutora.

Limeira Júnior (2004), avaliando o sinergismo de diferentes ações biológicas para o incremento do reparo ósseo, investigou a aplicação de radiação laser sobre reparo de defeitos ósseos experimentais em fêmur de ratos submetidos à enxertia de osso bovino mineral e membrana de osso bovino descalcificada. Sete sessões de irradiação foram realizadas a cada 48 horas em quatro pontos em torno da ferida operatória, e as peças ósseas foram examinadas após 15, 21 e 30 dias do procedimento cirúrgico. Os autores observaram que o enxerto apresentou boas propriedades osteocondutivas e a laserterapia contribuiu para um reparo mais avançado ao longo do período de observação.

Serra-Silva; Albergaria-Barbosa; Mazzonetto (2006), avaliaram clínica e radiologicamente, em humanos, o possível sinergismo entre matriz orgânica e proteína morfogenética do osso utilizando biomateriais de origem bovina (Gen-Ox® e Gen-Pro®, respectivamente). Os biomateriais foram agregados na proporção de 5:1 e comparados ao efeito de implante autógeno mandibular, em casos onde houve necessidade

tomograficamente documentada de levantamento bilateral do seio maxilar. Foram colocados implantes após os prazos de 6 a 11 meses, comparando-se (radiografia panorâmica e avaliação trans-operatória) a estabilidade inicial dos implantes e a neoformação tecidual na área enxertada. Tais critérios foram considerados mais satisfatórios no grupo controle, embora no grupo experimental o torque para colocação dos implantes tenha sido maior.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar comparativamente o reparo ósseo após a utilização de biomateriais de origem bovina em defeitos padronizados no fêmur de ratos *Wistar* nos períodos de 15 e 30 dias.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, histológica e morfometricamente, o processo de reparo de defeitos ósseos de 3,0 mm³ após o uso de:

- 1) Biomaterial composto de matriz orgânica cortical, matriz inorgânica esponjosa e colágeno bovino.
- 2) Biomaterial composto de osso bovino inorgânico.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA

O presente estudo foi realizado após submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) - V. Anexo “A”; encontra-se, ainda, em conformidade com a Lei Federal 11.794, de 08 de outubro de 2008, que regulamenta procedimentos para o uso científico de animais – V. Anexo “B”.

4.2 MODELO ANIMAL

Foram selecionados 30 ratos machos albinos (*Rattus norvegicus* da família *Muridae*, variedade *Wistar*): adultos jovens, clinicamente sadios, pesando entre 270 e 320g. Os espécimens foram obtidos no Biotério Prof. Thomas George - LTF da UFPB - e alojados, durante o experimento, no Laboratório de Experimentação Animal do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba - CCS/UFPB.

4.3 TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho da amostra configurada no presente estudo foi baseado na literatura científica correlata; o número de animais deve ser estritamente compatível com o respeito às questões bioéticas, bem como com a necessidade de resultados confiáveis do ponto de vista de significância estatística.

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DA AMOSTRA

Clinicamente, uma vez apresentando deiscência de sutura, exposição do enxerto ou indícios de processo infeccioso, o animal seria excluído e substituído. Histologicamente, seriam excluídas as amostras nas quais houvesse perda, durante o processamento, do material testado.

4.5 ACONDICIONAMENTO E ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS

Seu acondicionamento se deu em gaiolas plásticas superiormente fechadas por armação metálica e forradas por serragem (maravalha de pinus) autoclavada, continuamente guarnecidas com alimento sólido peletizado com alto teor proteico (Labina®, Purina Nutrimentos) e água, para consumo *ad libitum* (Figura 02), sendo os animais acompanhados diariamente pela pesquisadora.



FIGURA 02 – Animais acondicionados em gaiolas plásticas guarnecidas com ração e água.

Todas as gaiolas receberam marcação (etiqueta adesiva) específica contendo identificação do grupo e subgrupo do animal, registrando-se ainda as datas de cirurgia/sacrifício do mesmo. Após a cirurgia, os animais foram acompanhados diariamente e tiveram suas gaiolas substituídas a cada intervalo de 48 horas.

4.6 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS

Os espécimes (n=30) foram aleatoriamente divididos em três grupos iguais; estes, por sua vez, arranjados em dois subgrupos, conforme quadros a seguir:

Quadro 02 – Grupo I: ENXERTO ÓSSEO BOVINO COMPOSTO GEN-MIX®

<i>SUBGRUPO</i>	<i>DESCRIÇÃO</i>	<i>POPULAÇÃO (N)</i>
GM-15 (I-15)	ENXERTO BOVINO COMPOSTO (sacrifício após 15 dias)	05
GM-30 (I-30)	ENXERTO BOVINO COMPOSTO (sacrifício após 30 dias)	05

Quadro 03 – Grupo II: ENXERTO ÓSSEO DESPROTEINIZADO GEN-OX®

<i>SUBGRUPO</i>	<i>DESCRIÇÃO</i>	<i>POPULAÇÃO (N)</i>
GX-15 (II-15)	ENXERTO ÓSSEO INORGÂNICO (sacrifício após 15 dias)	05
GX-30 (II-30)	ENXERTO ÓSSEO INORGÂNICO (sacrifício após 30 dias)	05

Quadro 04 – Grupo III: CONTROLE

<i>SUBGRUPO</i>	<i>DESCRIÇÃO</i>	<i>POPULAÇÃO (N)</i>
C-15 (III-15)	CONTROLE: reparo fisiológico (sacrifício após 15 dias)	05
C-30 (III-30)	CONTROLE: reparo fisiológico (sacrifício após 30 dias)	05

4.7 EQUIPAMENTOS

Para a confecção das lojas ósseas, foi utilizado um motor cirúrgico modelo DRYLLER 350 BML, com refrigeração interna e externa, redução de velocidade de 1/16 e contra-ângulo redutor de velocidade (NSK/Japão – Figura 03);



FIGURA 03 – Motor modelo DRYLLER 350 BML.

Também com esta finalidade, foi utilizado kit de brocas PPMM® (Figura 04);



FIGURA 04 – Sistema de brocas PPMM®

Para a digitalização das imagens foi utilizado o sistema fotográfico Motic® (Figuras 05 e 06), composto de microscópio BA 300 e câmera acoplada (Moticam 2500 – tamanho do pixel: 1,425 μ m), conjuntamente ao software Motic Images™ plus 2,0. As fotomicrografias (resolução de 2592 x 1944 pixels) foram armazenadas no formato *tiff*, o qual não permite modificação estrutural da imagem após sua captação.



FIGURA 05 – Sistema de Captura de Imagens (microscópio MOTIC®, BA 300).

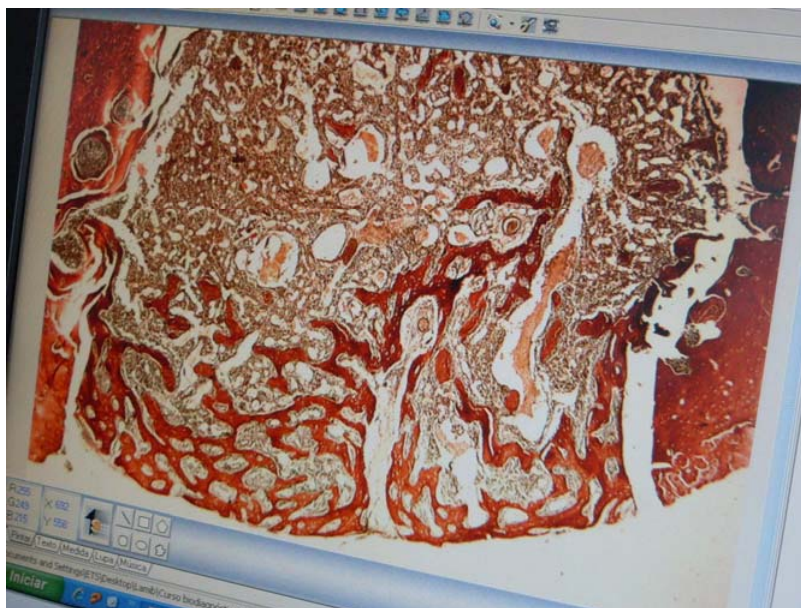


FIGURA 06 – Software Motic Images™ Plus 2,0 (captação da imagem de corte histológico de fêmur corado por Picrosirius red – subgrupo C-15).

4.8 INSTRUMENTAL CIRÚRGICO

Durante as cirurgias foram utilizados instrumentos de rotina agrupados em conjuntos individuais (kits cirúrgicos) compostos por: 01 cabo de bisturi, 01 porta-agulhas, 01 pinça de dissecação, 01 tesoura de Metzembaum e 02 espátulas nº 07. Para a confecção do defeito ósseo foi utilizado o sistema de brocas PPMM®, sob refrigeração interna e externa.

4.9 MATERIAL DE CONSUMO

Para a viabilização dos procedimentos cirúrgicos e sacrificiais dos espécimes, bem como manutenção das condições de assepsia e antissepsia, requereu-se o uso de luvas

cirúrgicas e de procedimentos, compressas de gaze, soro fisiológico, álcool etílico a 70% e Povidine® degermante (10%), seringas descartáveis de 1ml e 10 ml, agulhas hipodérmicas, substâncias para a ação anestésica - Dorcipec® e Vetanarcol® -, lâminas de bisturi nº 15, fios de sutura 3-0 (catgut cromado e seda), máscaras e gorros descartáveis, campos cirúrgicos e campos fenestrados.

4.10 ESPAÇO FÍSICO

A manipulação dos animais – cirurgias, manutenção e sacrifícios – foi realizada no Laboratório de Experimentação Animal do CCS/UFPB; o material biológico obtido foi histologicamente processado no Laboratório de Histotecnologia do Mestrado em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE); os procedimentos de análise e captura digital de imagens foram executados no Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica do CCS/UFPB.

4.11 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

A fim de garantirem-se os princípios de assepsia e antissepsia, todo o instrumental contido nos kits foi previamente limpo e desinfetado com o uso de solução de glutaraldeído, além de posteriormente esterilizado por autoclavagem em âmbito hospitalar (HU/UFPB). Durante as cirurgias, foram utilizados equipamentos de proteção individual (óculos, gorros, luvas e máscaras descartáveis).

A ação anestésica foi realizada pela administração intra-muscular (coxa do animal) e conjunta de cloridrato de xilazina a 2% (Dorcipec®, Vallée S.A., Montes Claros/MG,

dose de 4-8 mg/Kg) e cloridrato de ketamina a 5% (Vetanarcol®, Laboratórios König do Brasil, São Paulo/SP, dose de 60-90mg/Kg), o que promoveu período anestésico de aproximadamente duas horas. Como sítio da intervenção cirúrgica, elegeu-se o terço superior do fêmur esquerdo, executando-se tricotomia por arrancamento de pêlos na respectiva região coxo-femoral. Na sequência, procedeu-se a antissepsia com aplicação local e adjacente de Polivinilpirrolidona-iodo a 10% (Povidine degermante®, Ceras Johnson) e a zona cirúrgica foi isolada com campos fenestrados previamente preparados para esta finalidade (Figura 07).

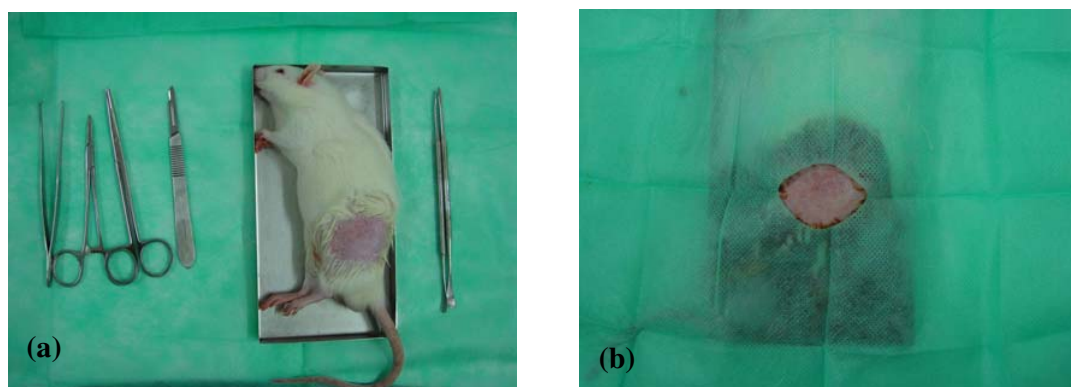


FIGURA 07 – Procedimentos pré-cirúrgicos: (a) animal anestesiado e tricotomizado, ladeado por instrumental; (b) campo cirúrgico fenestrado e aplicado sobre o sítio operatório após assepsia.

Posicionando-se o animal em decúbito lateral direito, o acesso cirúrgico ao fêmur teve início por meio de uma incisão interessando aos planos cutâneo e subcutâneo, paralelamente ao maior eixo do osso e medindo aproximadamente 2,5 cm. Para tanto, utilizou-se cabo de bisturi do tipo Bard-Parker, montado com lâmina nº 15. Uma vez exposta a musculatura da área, a fáscia foi seccionada no mesmo sentido da incisão cutânea; em seguida, as fibras teciduais foram divulsionadas com o auxílio de uma pinça

de dissecação e uma tesoura de metzembaum curva, até a visualização da superfície óssea (Figura 08).



FIGURA 08 – Exposição do plano ósseo após incisões cutânea e fascial, paralelas ao maior eixo do osso, seguida de difusão das fibras musculares.

O perióstio foi incisado em sentido longitudinal e descolado com o auxílio da extremidade menor de uma espátula nº 07; com a extremidade maior de duas outras espátulas idênticas, foram delicadamente afastados os tecidos adjacentes. A perfuração do terço superior do fêmur, para a confecção do defeito ósseo, foi realizada sob refrigeração interna e externa constante (irrigação com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%), utilizando-se motor cirúrgico para implantes.

Etapas do procedimento: a) perfuração inicial do osso com o auxílio de uma broca de Titânio ponta-de-lança, montada em contra-ângulo e em ângulo reto com a cortical óssea envolvida; b) alargamento e aprofundamento da loja óssea utilizando-se broca

cilíndrica com 3,0 mm de diâmetro e extremidade curva, de forma que o diâmetro do defeito correspondeu ao diâmetro da própria broca. Ainda nesta etapa, por meio de sonda milimetrada integrante do sistema de brocas, garantiu-se que a profundidade da cavidade alcançasse também 3,0 mm. Os defeitos foram, portanto, padronizados na medida de 3,0 mm³ (Figura 09).



FIGURA 09 – Defeito ósseo de 3,0 mm³ no fêmur esquerdo.

Concluída a perfuração óssea, cada animal foi conduzido de acordo com o grupo experimental pertencente:

- a) Nos espécimes dos grupos submetidos à enxertia, o reposicionamento e fixação teciduais foram precedidos pelo preenchimento dos defeitos ósseos por grânulos de biomaterial (Figura 10), previamente homogeneizados com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%.

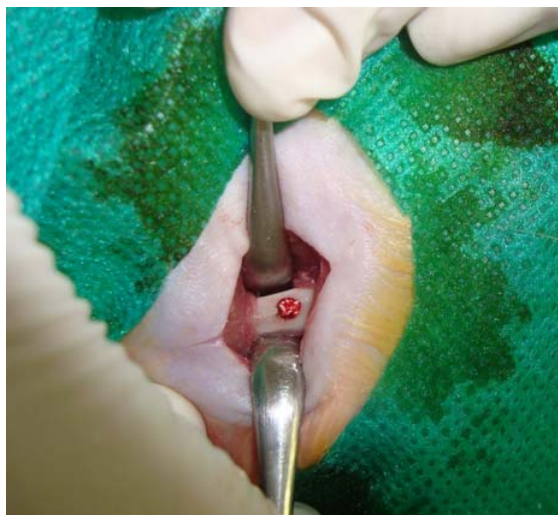


FIGURA 10 – Defeito ósseo preenchido por grânulos de biomaterial bovino.

- b) Nos espécimes do grupo controle, o periósteo e demais tecidos foram imediatamente recolocados às posições de origem e fixados por meio de sutura em pontos separados e realizada por planos: nos mais internos (músculo e fáscia), sutura com fio reabsorvível catgut cromado 3-0; na pele, sutura com fio seda 3-0 (Figura 11).

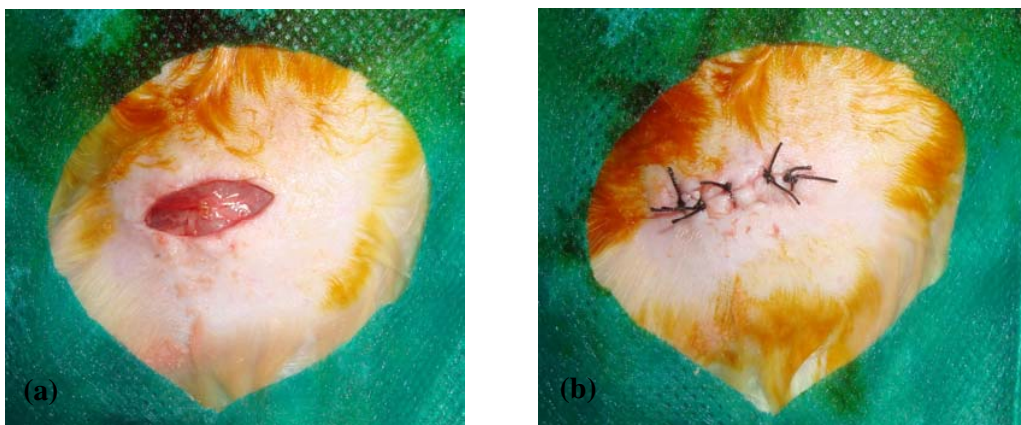


FIGURA 11 – Fechamento do defeito: (a) tecidos moles reposicionados e sutura interrompida imples (catgut cromado); (b) sutura cutânea interrompida simples (seda 3-0).

4.12 BIOMATERIAIS SUBSTITUTOS ÓSSEOS

Os biomateriais substitutos ósseos de origem bovina, na forma composta e inorgânica, apresentaram as seguintes características:

A) *Gen-Mix*® (Genius-Baumer S.A., Mogi Mirim/SP)

Material composto, microgranular (0,25-1,0mm), liofilizado, contendo osso bovino desproteinizado e osso bovino desmineralizado, constituído por:

- a) Matriz orgânica de osso bovino cortical (0,5 cc)
- b) Matriz inorgânica de osso bovino esponjoso (0,5 cc)
- c) Colágeno bovino aglutinante (0,5 cc)

B) *Gen-Ox Inorg*® (Genius-Baumer S.A., Mogi Mirim/SP)

- a) Material microgranular (0,5 – 1,0 mm) contendo osso desproteinizado e acelular, composto por matriz inorgânica de osso bovino esponjoso (0,5 cc).

4.13 SACRIFÍCIO E OBTENÇÃO DA AMOSTRA TECIDUAL

Os animais foram sacrificados de acordo com o período de acompanhamento pós-cirúrgico pré-estipulado (15 e 30 dias), por meio da administração intra-peritoneal de dose letal (2 a 3 ml) de Hidrato de Cloral a 10%. Constatada sua morte, foram seccionados os

planos superficiais e profundos da região previamente operada, cuja incisão teve orientação correspondente à da cicatriz existente na pele.

Após o alcance do plano ósseo e localização do defeito, o fêmur foi cuidadosamente desarticulado e removido (Figura 12). Cada espécime foi acondicionado em recipiente plástico externamente identificado com etiqueta adesiva e contendo solução formólica tamponada (pH 7) a 10% (formalina). Desta forma, foram encaminhados ao Laboratório de Histotecnologia do Mestrado em Patologia da UFPE.

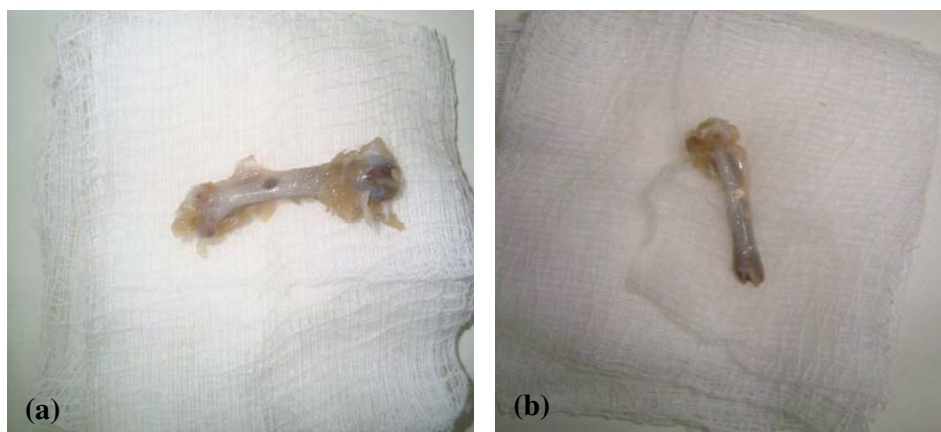


FIGURA 12 – Fêmur removido após sacrifício: (a) cavidade preenchida por coágulo; (b) cavidade preenchida por enxerto de origem bovina.

4.14 PROCEDIMENTO LABORATORIAL

As amostras foram processadas no Laboratório de Histotecnologia do Mestrado em Patologia da UFPE. Após a fixação do tecido durante quatro dias em solução formólica tamponada (paraformaldeído a 10%), à temperatura ambiente, os ossos foram descalcificados em solução de ácido nítrico a 5%, por um período de aproximadamente 04 horas. Constatada a flexibilidade tecidual apropriada para clivagem macroscópica, estes

foram lavados em água corrente durante 02 horas e, em seguida, foram imersos em solução de sulfato de sódio a 4%, durante 15 minutos, conforme protocolo do Serviço, para efeito neutralizador. Na sequência, permaneceram por 24 horas em álcool a 70%.

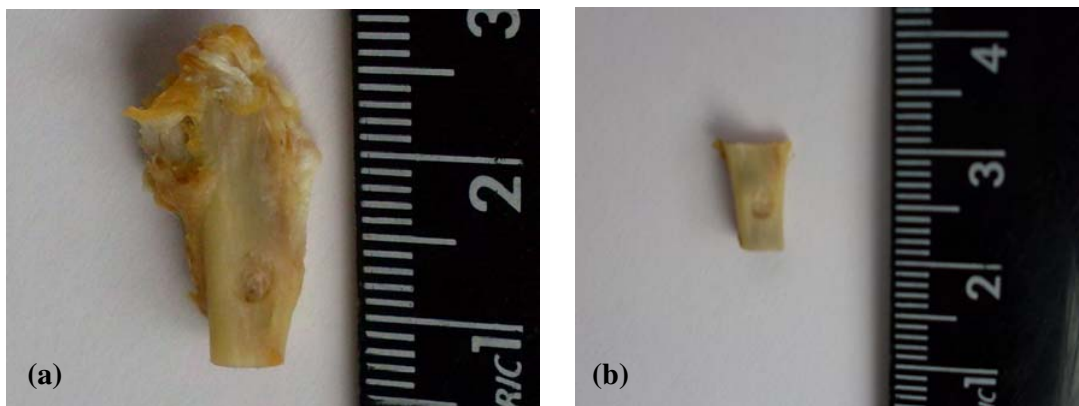


FIGURA 13 – (a) e (b): fêmur descalcificado e submetido a clivagem inicial (observar defeito).

Após clivagem inicial (figura 13), o defeito foi isolado através de secção nas proximidades de suas extremidades superior e inferior; os fragmentos resultantes foram imersos, sequencialmente, em álcool absoluto e xilol durante períodos de 90 minutos em cada fase, conforme protocolo do Serviço; promoveu-se, assim, respectivamente, a desidratação e diafanização teciduais, após o que as amostras foram embebidas durante 30 minutos em parafina liquefeita, no interior de estufa regulada à temperatura de 60°C.

Completado o processamento, as amostras foram incluídas em moldes que, preenchidos por parafina, originaram blocos contendo a estrutura corretamente posicionada (Figura 14) para os cortes micrométricos seriados, com espessura de 5µm. Foram confeccionadas e numeradas, por ordem de secção, 10 lâminas por espécime, tendo sido as mesmas alternadamente coradas pelas técnicas de Hematoxilina de Harris / Eosina Alcóolica (HE) e Picrosirius red. A primeira, corando em matizes de róseo e lilás o material estudado (de acordo, respectivamente com o ph básico ou ácido de seus

elementos), destinou-se à avaliação qualitativa das células e eventos envolvidos no reparo ósseo; a segunda, provendo expressão tintorial distinta para o tecido colágeno, gera um maior contraste cromático entre este e os demais, incluindo o material utilizado na enxertia. Foi, portanto, mais adequada à segmentação digital de imagens utilizada durante o estudo morfométrico.

4.15 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A Análise histológica foi realizada no Laboratório de Microscopia e Imagem Biológica – LAMIB – do CCS/UFPB. Como parâmetros histológicos, foram utilizados (critérios adaptados de CARDOSO, 2008): a) reação do tipo corpo estranho (RCE) b) infiltrado inflamatório (INF); c) vascularização (VAS); d) presença de tecido conjuntivo denso/fibroso (TCF); e) atividade osteoblástica (AOS); f) neoformação óssea (NEO).

Para avaliação do item “a”, adotou-se a caracterização “ausente” ou “presente”. Para os itens “b”, “c”, “d” e “e”, utilizou-se a seguinte graduação (considerando-se visão panorâmica do campo histológico):

- *Inexistente ou incipiente* (0): fenômeno ausente (exceto vascularização e neoformação óssea) ou minimamente presente;
- *Leve* (1): fenômeno presente em focos esparsos (até 4);
- *Moderado* (2): fenômeno em maior número de áreas, porém sem distribuir-se por todo o campo microscópico;
- *Intenso* (3): critério visualizado em inúmeras áreas do campo microscópico.

Para a neoformação óssea, utilizou-se o seguinte critério de classificação:

- *Leve* (1): neoformação óssea nas bordas do defeito e áreas restritas de seu interior, ou em toda a extensão entre as bordas, com até 1/3 de sua espessura;
- *Moderada* (2): neoformação óssea a partir da borda do defeito e em seu interior, em caráter mais abundante (porém sem preenchê-lo), ou em toda a extensão entre as bordas, até a metade de sua espessura.
- *Intensa* (3): preenchimento do defeito a) em todo o seu interior e toda extensão entre as bordas, com até metade de sua espessura; b) em toda a extensão entre as bordas, com espessura entre a metade e 2/3 das mesmas;
- *Completa* (4): preenchimento das bordas do defeito por osso neoformado, tanto em extensão quanto em espessura.

4.16 CAPTAÇÃO DE IMAGENS

Após a coloração pela técnica do Picrosirius Red, as imagens microscópicas foram captadas através do sistema óptico Motic Images®, sendo armazenadas em arquivos digitais no formato *Tiff* e submetidas à delimitação da zona de defeito (cortical e medular – Figura 14), utilizando-se o software *photoshop® for Windows*.

4.17 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A quantificação da área de matriz óssea neoformada foi realizada no Departamento de Informática da UFPB. Para tanto, utilizou-se técnica de segmentação de imagens

(QUEIROGA *et al.* 2008; CARDOSO, 2008), a partir da qual mensurou-se a referida área em mm².

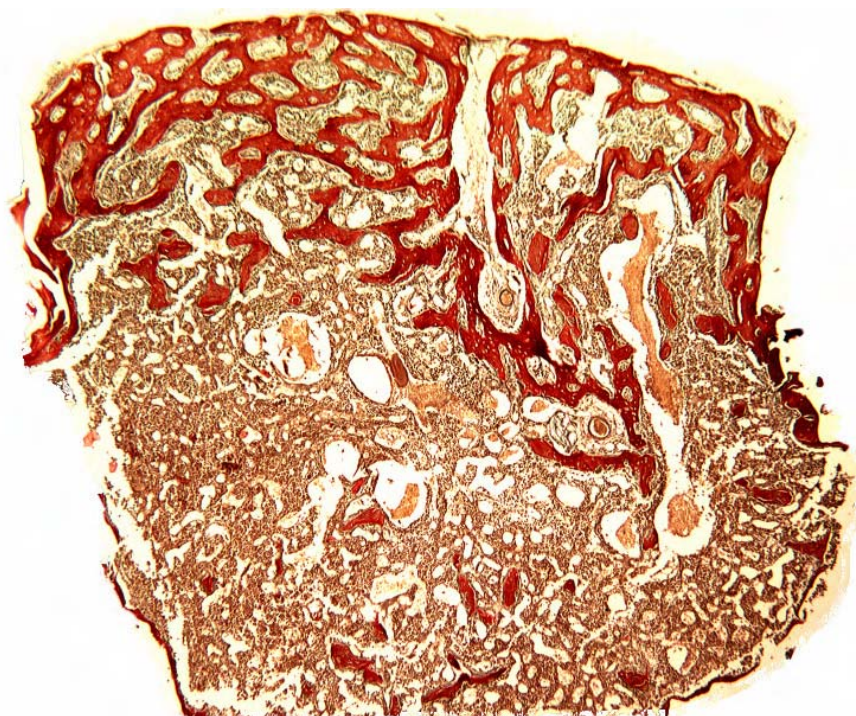


FIGURA 14 – Campo de fotomicrografia selecionado após captura da imagem (fig 06), a ser submetido a segmentação por classes e posterior análise morfométrica. Grupo controle aos 15 dias (C-15). Picrosirius red, aumento de 40X.

Etapas da Segmentação de Imagens

- 1) Conversão da imagem do sistema RGB (*red, green and blue*) para o sistema L*a*b (*light, *a and *b bands*);
- 2) Segmentação utilizando o algoritmo k-médias, com 7 *clusters* (classes), a partir das bandas “a” e “b” do sistema L*a*b. Este sistema contém um espaço de cores muito maior do que o RGB, sendo mais próximo de como a fisiologia humana percebe as cores. O processo divide-se em:

A) Primeira segmentação com 3 *clusters* (a partir da classe da anterior, relativa à zona de neoformação óssea); em seguida, a imagem é binarizada: forma de segmentação em duas classes, a partir de imagem em tons de cinza (Figura 15);

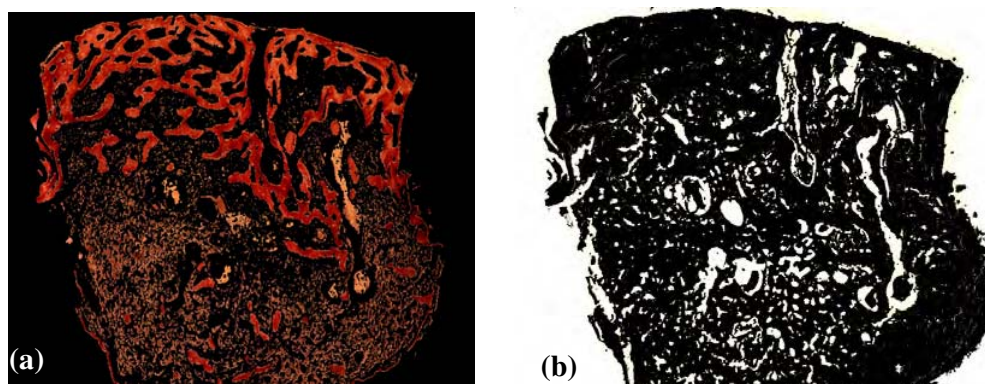


FIGURA 15 – Classe 1, resultante da segmentação da figura 14: (a) cores originais em RGB; (b) imagem após a binarização.

B) Nova segmentação em três *clusters* (Figura 16) e binarização.

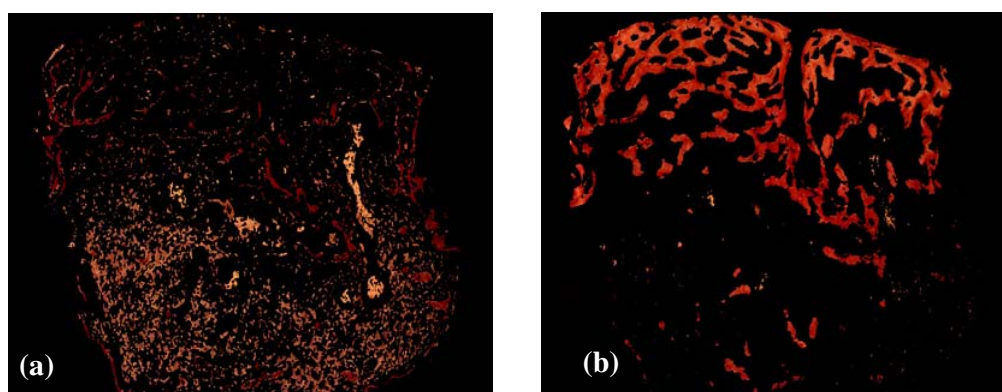


FIGURA 16 – Classes 2 e 3 (“a” e “b”, respectivamente), resultante da ressegmentação da figura 14.

C) Contagem de pixels com valor “1” (brancos) da imagem binária para mensurar a área, em pixels (Figura 17).

D) Cálculo da área em mm^2 , a partir dos dados obtidos, a partir de escala referencial (calibração geométrica utilizando imagem de retícula graduada – 10:100 μm – capturada durante sessão de fotos).

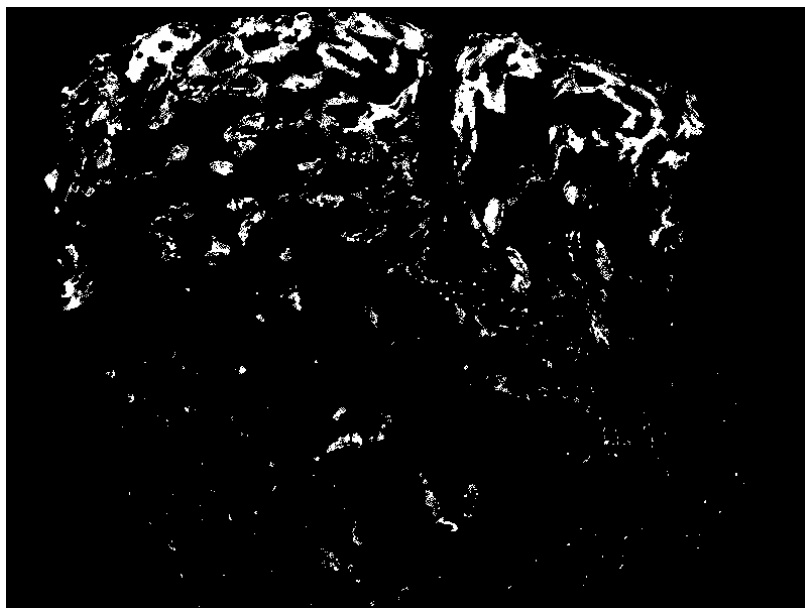


FIGURA 17 – Imagem final para contagem de pixels e cálculo da área em mm^2 .

4.18 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados coletados foram registrados na forma de banco de dados do programa de informática *R for Windows*, versão 2.8.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

Para cada parâmetro estabelecido foram realizadas nove comparações: a) em grupos de 15 dias – GM-15/GX-15; GM-15/C-15; GX-15/C-15; b) grupos de 30 dias – GM-30/GX-30; GM-30/C-30; GX-30/C-30; c) avaliações intra-grupos – GM-15/GM-30; GX-15/GX-30; C-15/C-30.

Foram utilizados métodos diferenciados para os dois tipos de estudo, considerando-se estatisticamente diferentes os grupos com valor de $p < 0,05$.

A) Análise Histológica: para os procedimentos descritivos foram calculadas a frequência e percentagem; para os de inferência estatística, devido à independência entre as amostras e tamanho das mesmas, foi aplicado o Teste Exato de Fisher – χ^2 exato (SIEGEL, 1975).

B) Análise Morfométrica: para os procedimentos descritivos, foram apresentadas as medidas de tendência central (Média, Mediana) e de variabilidade (Desvio Padrão, Amplitude). Os procedimentos de inferência estatística, em virtude do baixo efetivo amostral e assimetria (apontando para uma não distribuição normal dos dados), foram feitos com base em estatística não-paramétrica, por meio de testes de hipóteses para amostras independentes (Teste U de Mann-Whitney).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Um dos animais morreu durante o procedimento cirúrgico; um segundo morreu em meio ao período observacional (16º dia de pós-operatório), com sinais de infecção no sítio operatório. Ambos foram substituídos.

5.1 ASPECTOS GERAIS - GRUPO I: ENXERTO COMPOSTO

GM-15: cavidade óssea contendo tecido medular e moderada quantidade de trabéculas de osso neoformado e vascularizado, que ora partem das bordas do defeito, ora circundam partículas do biomaterial. Discreta quantidade de tecido conjuntivo denso eventualmente permeado por infiltrado inflamatório (Figura 18).

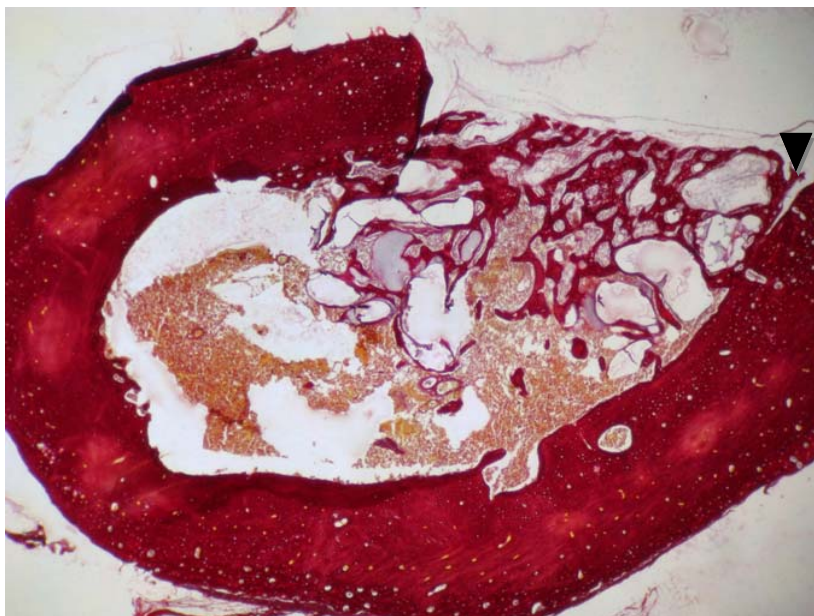


FIGURA 18 – Fotomicrografia do grupo I aos 15 dias (subgrupo GM-15). Observar tecido ósseo neoformado partindo das bordas do defeito (seta) e preenchendo áreas restritas da cavidade. Picrosirius red, aumento de 40X.

GM-30: aumento na espessura do trabeculado ósseo e zonas de invasão osteoblástica nas partículas enxertadas (Figuras 19 e 20).

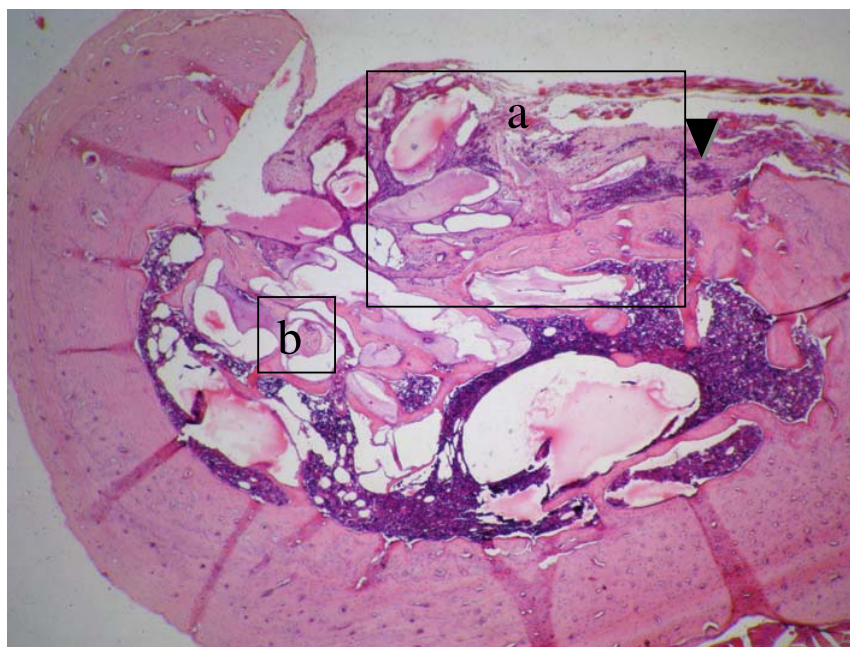


FIGURA 19 – Fotomicrografia do grupo I aos 30 dias (subgrupo GM-30). Trabéculas ósseas bem formadas e vascularizadas, tecido conjuntivo fibroso superficial e inter-trabecular, sede de exsudato hemático e mononuclear. Áreas (a) e (b) ampliadas na Figura 20. HE, aumento de 40X.

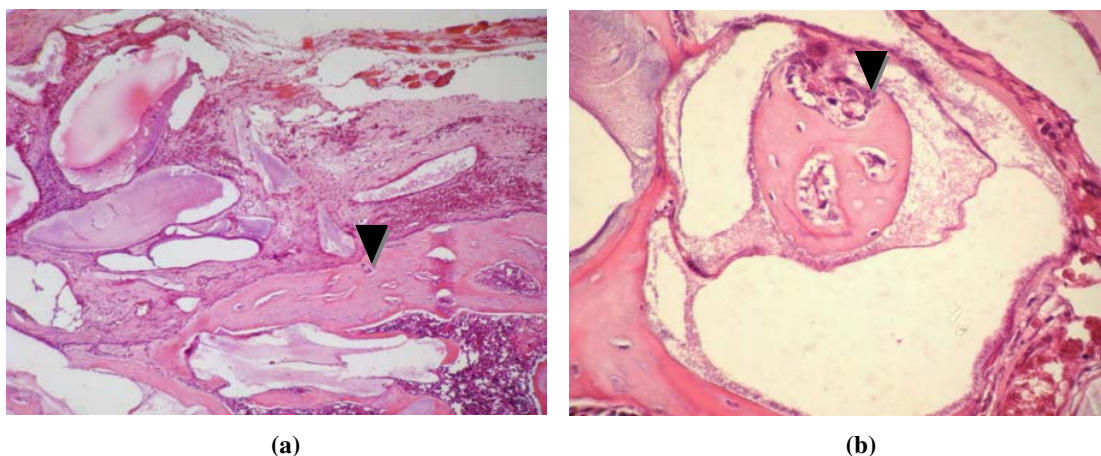


FIGURA 20 – Detalhes da Figura 19: (a) zona de neoformação óssea, com trabécula vascularizada (seta); tecido conjuntivo denso (permeado por exsudato hemático e mononuclear) em superfície e entre partículas de enxerto composto. HE, aumento de 100X; (b) invasão osteoblástica em partícula enxertada, com neoformação ósteo-vascular (seta). HE, aumento de 400X.

5.2 ASPECTOS GERAIS - GRUPO II: ENXERTO INORGÂNICO

GX-15: presença de múltiplas traves ósseas que partem das bordas do defeito e estendem-se pela cavidade óssea, circundando partículas do biomaterial e ocupando espaços entre as mesmas. Há eventuais áreas preenchidas por tecido conjuntivo denso e coalescência trabecular - vide extensa, porém delgada área de neoformação óssea que se inicia à margem esquerda e atravessa a região, interrompendo-se nas proximidades da margem direita (Figura 21).

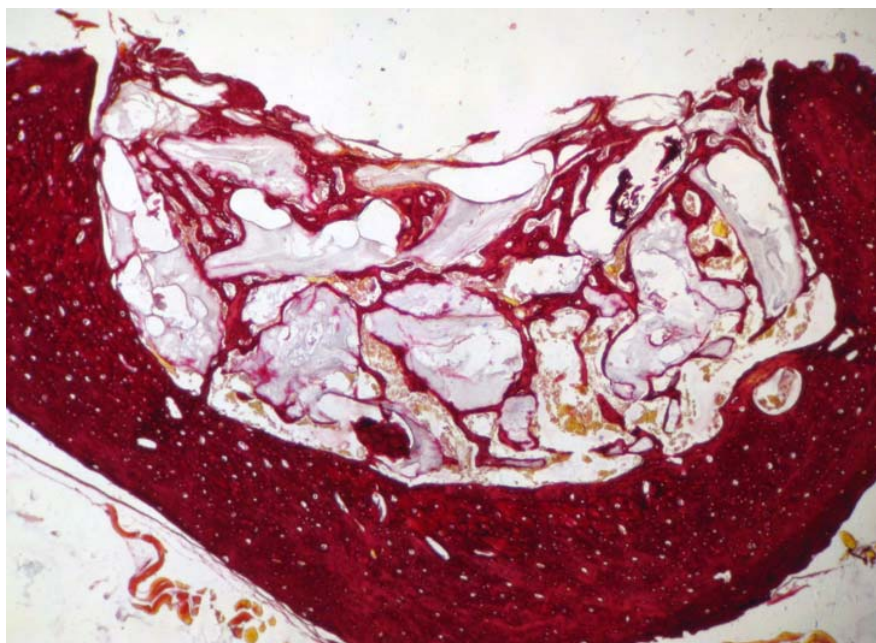


FIGURA 21 – Fotomicrografia do grupo II aos 15 dias (subgrupo GX-15). Trabéculas ósseas delicadas e coalescentes, estendendo-se por zonas superficial e cavitária (osso neoformado circundando o biomaterial). Picrosirius red, aumento de 40X.

GX-30: percebeu-se o fechamento do defeito, ainda que com espessura inferior à de suas bordas. Nesta amostra, pode-se observar a presença de biomaterial não reabsorvido no interior da cortical neoformada (Figura 22).

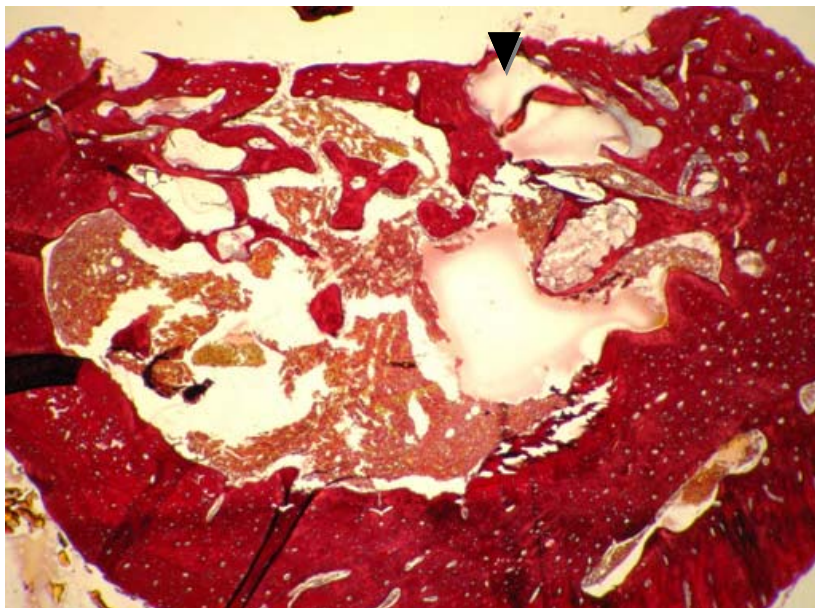


FIGURA 22 – Fotomicrografia do grupo II aos 30 dias (subgrupo GX-30). Observar o fechamento do defeito e remanescentes de enxerto na porção superior do campo (seta). Escassez de tecido neoformado na porção central. Picrosirius red, aumento de 40X.

5.3 ASPECTOS GERAIS - GRUPO III: CONTROLE

C-15: os espécimes revelaram presença de osso neoformado associado a tecido conjuntivo fibroso em graduação leve ou moderada. Na maioria dos casos há discreto infiltrado inflamatório de permeio (Figura 23).

C-30: reabsorção do tecido ósseo presente no interior da cavidade, restando elementos trabeculares concentrados na porção superior da região. O espaço entre as bordas foi delgadamente preenchido, se comparada sua espessura à presente nas bordas do defeito (Figura 24).

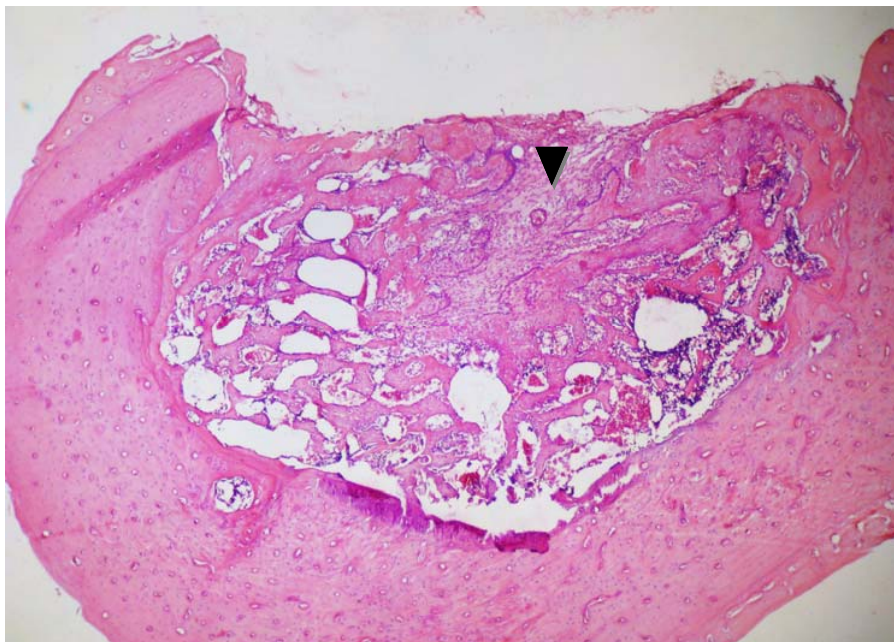


FIGURA 23 – Fotomicrografia do grupo III aos 15 dias (subgrupo C-15). Trabéculas ósseas ocupam parte das bordas e do fundo da cavidade, com tecido conjuntivo denso na região central (seta). HE, aumento de 40X.

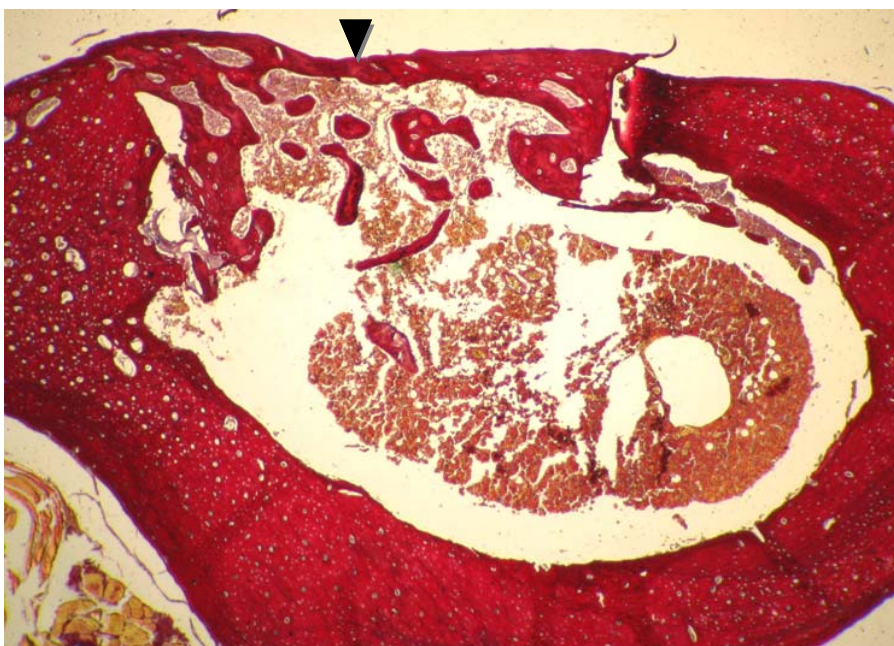


FIGURA 24 – Fotomicrografia do grupo III aos 30 dias (subgrupo C-30). Neoformação óssea concentrada na porção superficial da cavidade, com ponte tecidual entre as bordas (espessura menor que a metade da observada nas margens - seta). Picrosirius red, aumento de 40X.

5.4 - ANÁLISE HISTOLÓGICA

Nenhum dos espécimes, de quaisquer dos subgrupos, apresentou reação inflamatória do tipo corpo estranho (RCE), sendo observadas apenas células eventuais gigantes de caráter inflamatório. Os demais parâmetros (Figura 26) revelaram variações em sua estimativa (Tabelas 01 e 02).

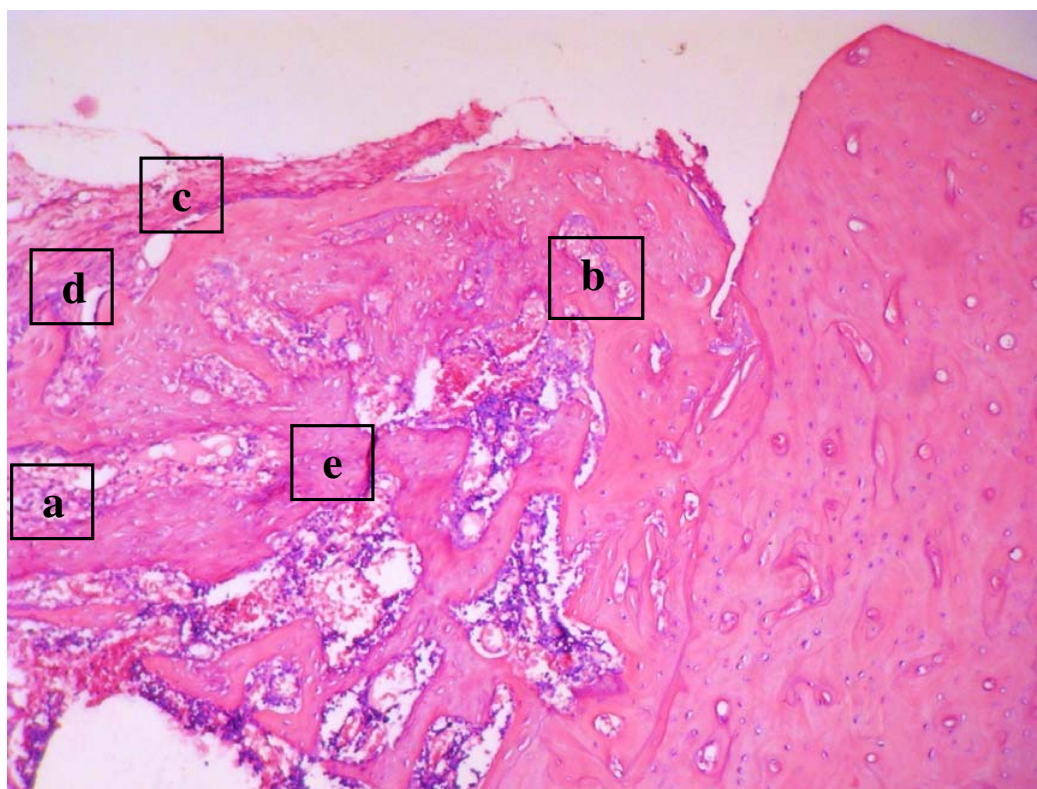


FIGURA 25 – Parâmetros de avaliação histológica: (a) infiltrado inflamatório; (b) vascularização; (c) tecido conjuntivo fibroso; (d) atividade osteoblástica; (e) neoformação óssea. HE, aumento de 100X.

Tabela 01 – Parâmetros histológicos em subgrupos com sacrifício aos 15 dias.

GRUPO – Animal (15 DIAS)		PARÂMETRO HISTOLÓGICO					
		RCE	INF	VAS	TCF	AOS	NEO
ENXERTO COMPOSTO (GM-15)	I	Ausente	1	2	1	2	2
	II	Ausente	1	2	2	3	1
	III	Ausente	2	3	2	3	2
	IV	Ausente	1	3	2	2	1
	V	Ausente	1	2	2	3	2
ENXERTO INORGÂNICO (GX-15)	I	Ausente	1	2	1	2	1
	II	Ausente	2	2	1	2	1
	III	Ausente	1	2	1	3	1
	IV	Ausente	1	3	1	3	2
	V	Ausente	1	2	1	2	1
CONTROLE (C-15)	I	Ausente	1	3	2	3	2
	II	Ausente	2	2	1	3	1
	III	Ausente	1	3	1	2	1
	IV	Ausente	1	2	2	2	1
	V	Ausente	1	2	1	2	1

Tabela 02 - Parâmetros histológicos em subgrupos com sacrifício aos 30 dias.

GRUPO – Animal (30 DIAS)		PARÂMETRO HISTOLÓGICO					
		RCE	INF	VAS	TCF	AOS	NEO
ENXERTO COMPOSTO (GM-30)	I	Ausente	0	3	0	2	2
	II	Ausente	1	3	2	3	2
	III	Ausente	0	3	0	3	2
	IV	Ausente	0	2	1	3	2
	V	Ausente	1	3	1	3	2
ENXERTO INORGÂNICO (GX-30)	I	Ausente	0	3	0	2	2
	II	Ausente	0	3	0	3	2
	III	Ausente	1	2	1	2	2
	IV	Ausente	0	3	0	3	3
	V	Ausente	0	3	0	2	3
CONTROLE (C-30)	I	Ausente	0	2	0	2	1
	II	Ausente	0	3	0	2	2
	III	Ausente	0	3	0	2	1
	IV	Ausente	0	2	1	2	1
	V	Ausente	0	2	0	2	2

Tabela 03 – Valores de *p* para comparações inter-grupos e intra-grupos (15/ 30 dias).

Parâmetro Histológico		COMPARAÇÕES INTER-GRUPOS						COMPARAÇÕES INTRA-GRUPOS		
		15 DIAS			30 DIAS					
		I/II	I/III	II/III	I/II	I/III	II/III	I/I	II/II	III/III
<i>p</i>-Valor	INF	1,000	1,000	1,000	1,000	0,444	1,000	0,166	0,079	0,007
	VAS	1,000	1,000	1,000	1,000	0,523	0,523	0,523	0,206	1,000
	TCF	0,047	0,523	0,444	0,523	0,523	1,000	0,285	0,047	0,079
	AOS	1,000	1,000	1,000	0,523	0,047	0,444	1,000	1,000	0,444
	NEO	0,523	0,523	1,000	0,444	0,166	0,166	0,444	0,079	1,000

*Valores em negrito: significância estatística ($p < 0,05$).** Tabelas 01, 02 e 03: **RCE** (reação tipo corpo estranho); **INF** (infiltrado inflamatório); **VAS** (vascularização); **TCF** (tecido conjuntivo fibroso); **AOS** (atividade osteoblástica); **NEO** (neoformação óssea).

5.4.1 Infiltrado Inflamatório (Figuras 26 e 27)

a) 15 dias: a maioria das amostras revelou leve permeação tecidual de exsudato inflamatório mononuclear na área operada (padrão mais presente nos três subgrupos). Apenas três espécimes (1 em cada grupo) exibiram infiltrado de grau moderado, com eventuais focos de adensamento celular, no tecido conjuntivo de entremeio.

b) 30 dias: três amostras sediaram infiltrado inflamatório discreto (2 do grupo I e 1 do grupo II). Nos demais, este evento foi inexistente ou incipiente (padrão mais presente em todos os subgrupos).

Em nenhuma das fases observou-se infiltrado inflamatório de padrão intenso.

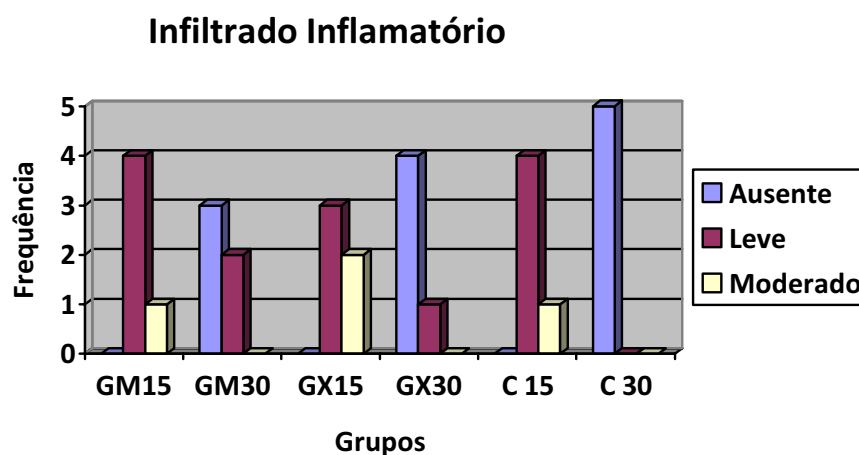


FIGURA 26 – Frequência e graduação do infiltrado inflamatório tecidual aos 15 e 30 dias.

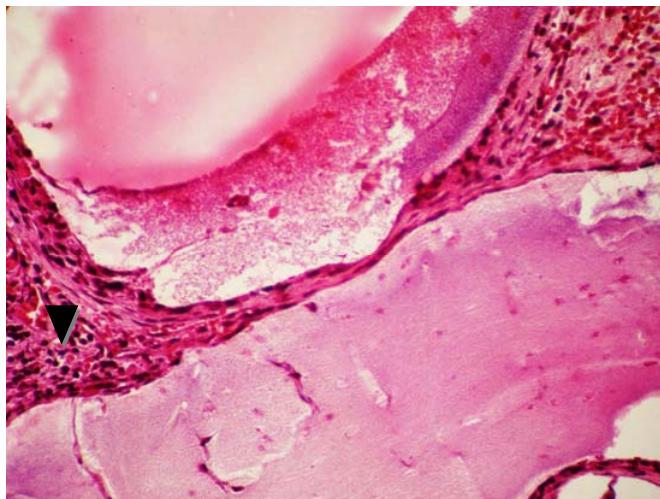


FIGURA 27 – Infiltrado inflamatório: exsudação mononuclear em meio a tecido conjuntivo denso que permeia área entre partículas de enxerto (seta). HE. Aumento de 400X.

c) **Tratamento estatístico:** encontrou-se diferença estatística nas comparações entre os subgrupos C-15/C-30, demonstrando-se que, enquanto nas amostras de 15 dias o padrão infiltrado inflamatório foi predominantemente leve, nos espécimes de 30 dias predominou o grau inexistente/incipiente.

Tabela 04 – Valores descritivos do infiltrado inflamatório aos 15 e 30 dias.

Subgrupo	Infiltrado Inflamatório								Total	
	Ausente		Leve		Moderado		Intenso			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
GM15	0	-	4	13,3	1	3,3	0	-	5	16,7
GX15	0	-	3	10,0	2	6,7	0	-	5	16,7
C15	0	-	4	13,3	1	3,3	0	-	5	16,7
GM30	3	10,0	2	6,7	0	-	0	-	5	16,7
GX30	4	13,3	1	3,3	0	-	0	-	5	16,7
C30	5	16,7	0	-	0	-	0	-	5	16,7
Total	12	40.0	14	46,7	4	13,3	0	-	30	100

* Aplicação de Teste Exato de Fisher.

** Diferença estatística entre C-15/C-30 ($p=0,0079$).

5.4.2 Vascularização (Figuras 28 e 29)

a) **15 dias:** o padrão moderado mostrou-se o mais presente em todos os grupos. Cinco espécimes revelaram-se vascularização intensa (2 no grupo I; 1 no grupo II; 2 no grupo III).

b) **30 dias:** o padrão intenso foi o mais presente nos grupos I e II (4 amostras em cada). No grupo III houve maior presença de amostras com grau moderado (3 espécimes).

Não foram observadas amostras de graduação leve neste parâmetro.

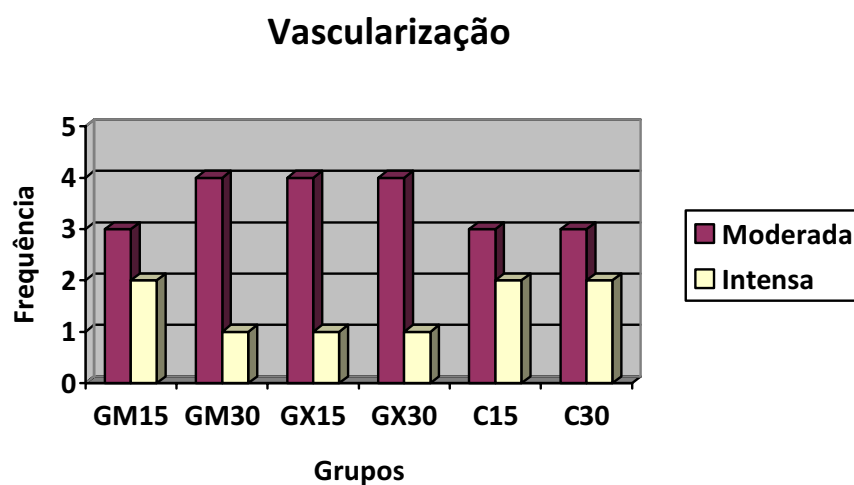


FIGURA 28 – Frequência e graduação da vascularização tecidual aos 15 e 30 dias.

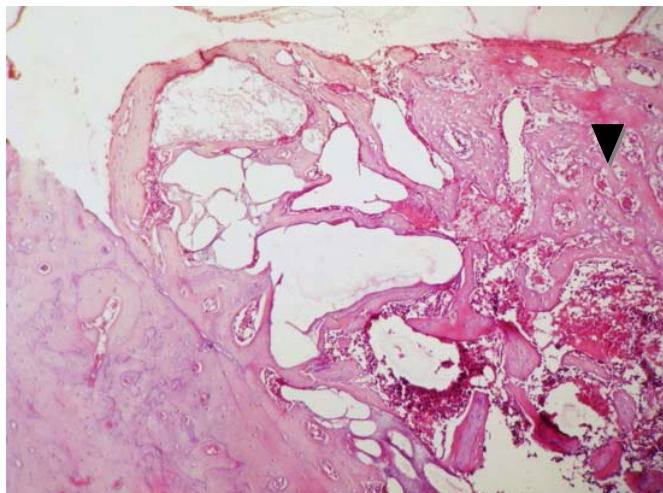


FIGURA 29 – Vascularização do osso neoformado: diferenciar de trabéculas que circundam medula óssea. HE, aumento de 100X.

c) **Tratamento Estatístico:** não houve diferença significativa em nenhuma das comparações realizadas.

Tabela 05 – Valores descritivos da vascularização aos 15 e 30 dias.

Subgrupo	Vascularização						Total	
	Leve		Moderada		Intensa			
	n	%	n	%	n	%	n	%
GM15	0	-	3	10,0	2	6,7	5	16,7
GX15	0	-	4	13,3	1	3,3	5	16,7
C15	0	-	3	10,0	2	6,7	5	16,7
GM30	0	-	1	3,3	4	13,3	5	16,7
GX30	0	-	1	3,3	4	13,3	5	16,7
C30	0	-	3	10,0	2	6,7	5	16,7
Total	0	-	15	50,0	15	50,0	30	100

* Aplicação de Teste Exato de Fisher .

** Não houve diferença estatística nas comparações realizadas.

5.4.3 Tecido Conjuntivo Fibroso (Figuras 30 e 31)

a) 15 dias: o padrão moderado foi mais presente no grupo I (4 amostras). Em todos os animais do grupo II observou-se grau leve de formação de TCF, assim como em três animais do grupo III.

b) 30 dias: o padrão inexistente/incipiente foi mais presente nos grupos II e III (4 animais em cada). Nesta fase, o grupo I apresentou uma amostra de grau moderado e não houve padrão dominante (2 amostras de grau leve, 2 de grau inexistente/incipiente).

Em nenhum dos casos a formação de TCF foi considerada intensa.

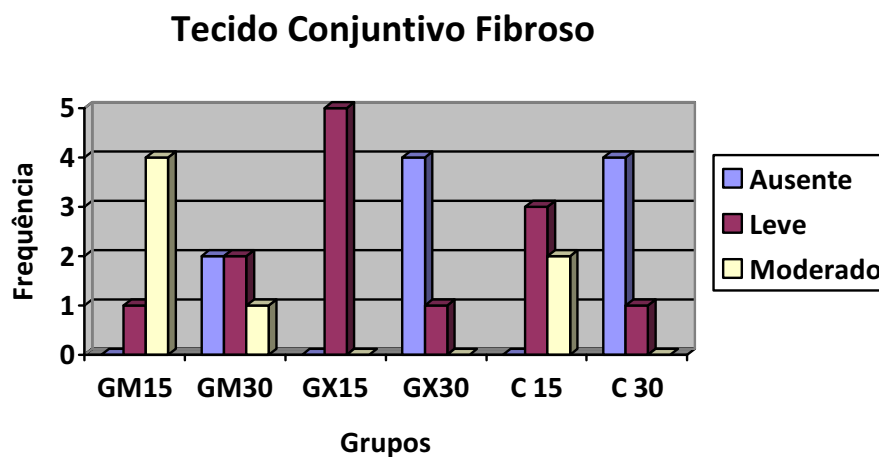


FIGURA 30 – Frequência e graduação da presença de TCF aos 15 e 30 dias.

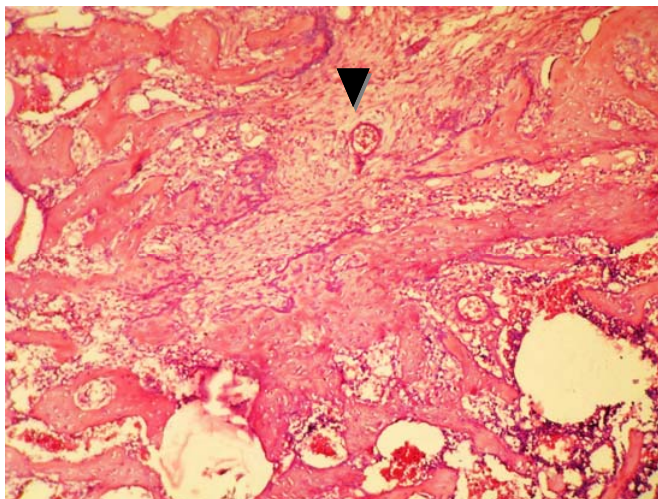


FIGURA 31 – Tecido conjuntivo fibroso: centro do campo, em meio às trabéculas ósseas (seta). À esquerda e acima, osteoblastos intensamente ativados, com aumento volumétrico e marcada basofilia citoplasmática. HE,

c) Tratamento estatístico: aos 15 dias, houve diferença estatística entre os subgrupos I e II (GM-15/GX-15). O grau moderado predominou no primeiro e, no segundo, predominou o padrão leve. Nas comparações intra-grupos, o subgrupo II (GX-15/GX-30) também revelou-se estatisticamente diferente: aos 15 dias houve predomínio do grau leve e, aos 30, do padrão inexistente/incipiente.

Tabela 06 – Valores descritivos de tecido conjuntivo fibroso aos 15 e 30 dias.

Subgrupo	Tecido Conjuntivo Fibroso								Total	
	Ausente		Leve		Moderado		Intenso			
	n	%	n	%	N	%	n	%	n	%
GM15	0	-	1	3,3	4	13,3	0	-	5	16,7
GX15	0	-	5	16,7	0	-	0	-	5	16,7
C15	0	-	3	10,0	2	6,7	0	-	5	16,7
GM30	2	6,7	2	6,7	1	3,3	0	-	5	16,7
GX30	4	13,3	1	3,3	0	-	0	-	5	16,7
C30	4	13,3	1	3,3	0	-	0	-	5	16,7
Total	10	33,3	13	43,3	7	23,3	0	-	30	100

*Aplicação de Teste Exato de Fisher.

** Diferença estatística entre GM-15/GX-15 ($p=0,0476$), GX-15/GX-30 ($p=0,0476$).

5.4.4 Atividade Osteoblástica (Figuras 31, 32 e 33)

a) **15 dias:** seis espécimes demonstraram padrão intenso, que foi o mais presente no grupo I (3 amostras) e revelou-se em 2 amostras de cada grupo restante. Nos demais grupos houve maior frequência de padrão moderado.

b) **30 dias:** o padrão intenso foi o mais presente no grupo I (4 amostras), enquanto o grau moderado foi o mais presente no grupo II e o único encontrado no grupo III.

A graduação leve não foi atribuída a nenhuma das amostras.

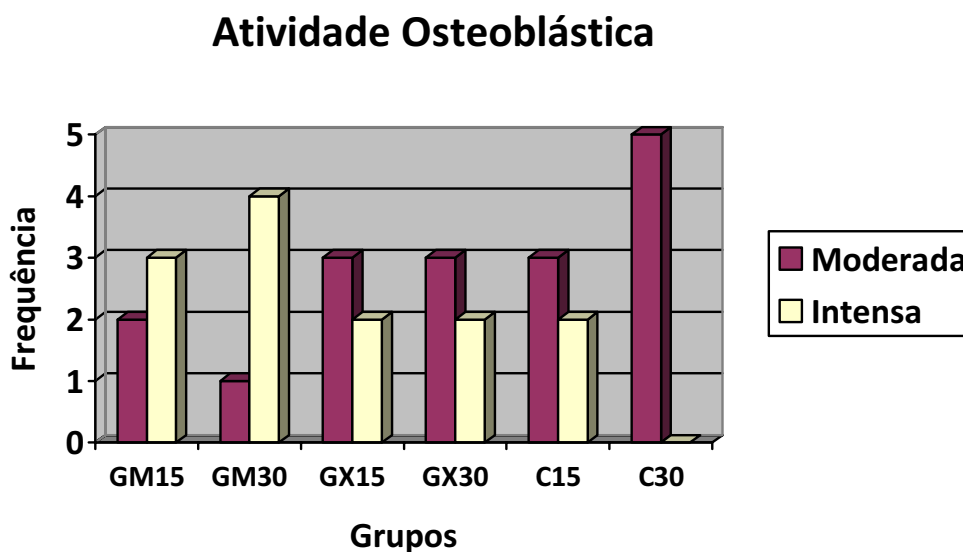


FIGURA 32 – Frequência e graduação da atividade osteoblástica aos 15 e 30 dias.

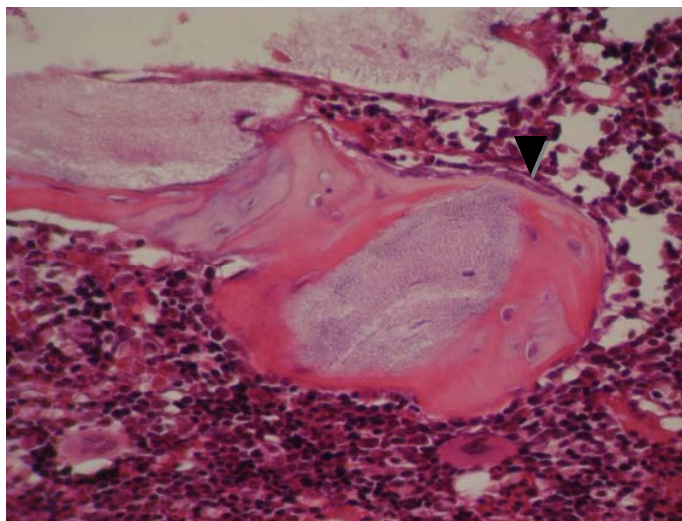


FIGURA 33 – Atividade osteoblástica: partícula de enxerto circundada por tecido ósseo neoformado. Basofilia do citoplasma osteoblástico (seta). HE, aumento de 400X.

c) Tratamento estatístico: quando comparados os subgrupos GM-30/C-30, constatou-se haver diferença entre os mesmos. Enquanto o grau intenso foi mais presente no primeiro, houve predomínio do padrão moderado no segundo. Nas demais comparações, não foram encontradas associações relevantes.

Tabela 07 – Valores descritivos da atividade osteoblástica aos 15 e 30 dias.

Subgrupo	Atividade Osteoblástica						Total	
	Leve		Moderada		Intensa			
	n	%	n	%	n	%	n	%
GM15	0	-	2	6,7	3	10,0	5	16,7
GX15	0	-	3	10,0	2	6,7	5	16,7
C15	0	-	3	10,0	2	6,7	5	16,7
GM30	0	-	1	3,3	4	13,3	5	16,7
GX30	0	-	3	10,0	2	6,7	5	16,7
C30	0	-	5	16,7	0	-	5	16,7
Total	0	-	17	66,7	13	43,3	30	100

* Aplicação de Teste Exato de Fisher.

** Diferença estatística entre os subgrupos GM-30/C-30 ($p=0,0476$).

5.4.5 Neoformação Óssea (Figuras 34 e 35)

a) 15 dias: cinco espécimes revelaram neoformação óssea de padrão moderado (3 no grupo I; 1 em cada um dos demais grupos); todos os demais expressaram grau leve. No grupo I houve, portanto, maior presença do padrão moderado; nos demais o padrão leve foi o mais freqüente.

b) 30 dias: nenhum dos animais obteve índice completo de reparo do defeito, percebendo-se neoformação óssea de grau intenso em apenas dois animais do grupo II. Em todos os animais do grupo I, e de forma mais presente no grupo II, este parâmetro foi moderado. No grupo III houve maior presença da graduação leve.

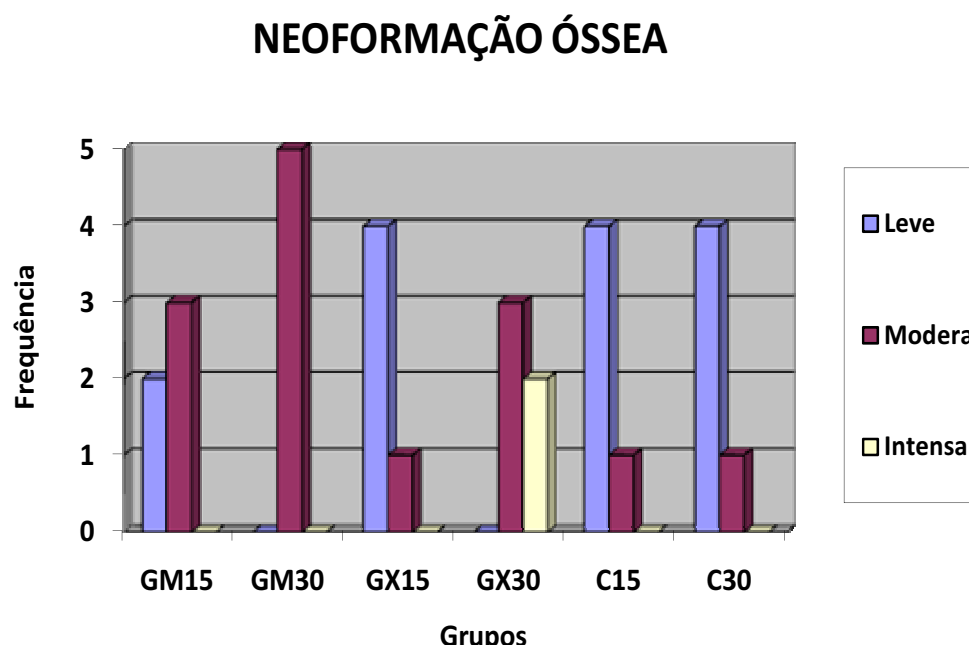


FIGURA 34 – Freqüência e graduação da neoformação óssea aos 15 e 30 dias.

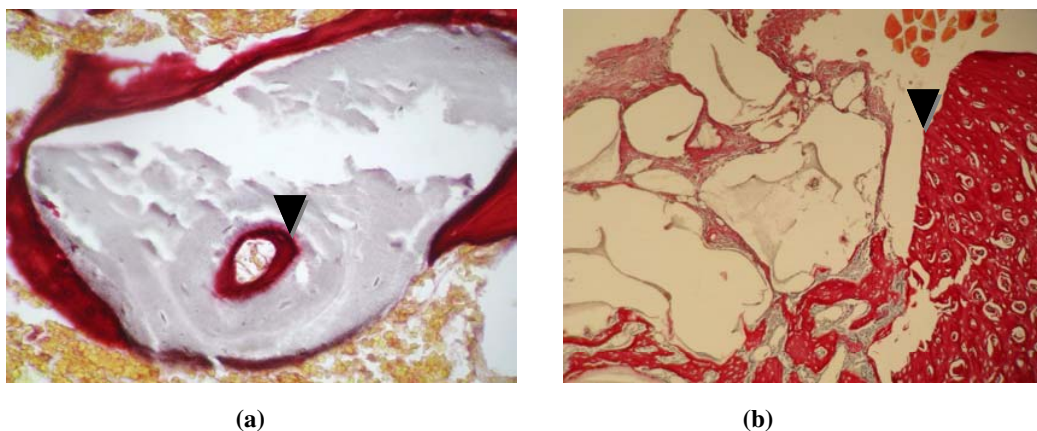


FIGURA 35 – Neoformação óssea: (a) tecido ósseo em torno e no interior de partícula enxertada (seta). Picrosirius red, aumento de 400x. (b) tecido ósseo neoformado a partir da borda do defeito (seta), contrastando com tecido fibroconjuntivo e partículas de biomaterial. Picrosirius red, aumento de 100X.

c) Tratamento estatístico: este parâmetro não revelou diferença estatística quando das comparações entre subgrupos ou nas avaliações intra-grupos.

Tabela 08 – valores descritivos de neoformação óssea aos 15 e 30 dias.

<i>Subgrupo</i>	<i>Neoformação óssea</i>						<i>Total</i>	
	<i>Leve</i>		<i>Moderada</i>		<i>Intensa</i>		<i>n</i>	<i>%</i>
	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>		
GM15	2	6,7	3	10,0	0	-	5	16,7
GX15	4	13,3	1	3,3	0	-	5	16,7
C15	4	13,3	1	3,3	0	-	5	16,7
GM30	0	-	5	16,7	0	-	5	16,7
GX30	0	-	3	10,0	2	6,7	5	16,7
C30	3	10,0	2	6,7	0	-	5	16,7
Total	13	43,3	15	50,0	2	6,7	30	100

* Aplicação do Teste Exato de Fisher.

** Não houve diferença estatística entre os subgrupos.

5.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A contagem de pixels relativa à área óssea neoformada, já convertida à medida em mm², revelou valores variantes entre 0,10881 e 1,543308. O menor valor aferido pertenceu ao grupo Controle, aos 15 dias (C-15); o maior deles foi observado no grupo Gen-Mix, aos 30 dias (GM-30), conforme destaques em negrito na Tabela 09 (Figura 36) .

Tabela 09 – Estatísticas descritivas: valores absolutos de área de osso neoformado (mm²) aos 15 e 30 dias.

ANIMAL	ÁREA (mm ²)					
	GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III	
	GM-15	GM-30	GX-15	GX-30	C-15	C-30
I	1,1633	0,4293	0,4397	0,8000	0,4928	0,3435
II	0,4544	1,5433**	0,3991	0,2948	0,2876	1,0558
III	1,1550	0,9804	0,8146	0,2055	0,2977	0,5400
IV	0,8534	1,5404	0,7659	0,6394	0,3855	0,1387
V	0,7478	0,5249	0,2301	0,7352	0,1088*	0,2686

*Menor valor; **Maior valor.

Por sua vez, a obtenção das médias demonstrou uma correlação com os valores anteriores, sendo a menor também encontrada no grupo C-15 (0,31452200) e a maior em GM-30 (1,00369360), conforme destaques em negrito na tabela 10.

Tabela 10 – Estatísticas descritivas: valores de área de osso neoformado aos 15 e 30 dias.

SUBGRUPO		N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Valor Mínimo	Valor Máximo
15 Dias	I	5	,874835	,297925	,853476	,454454	1,163357
	II	5	,529942	,250940	,439751	,230139	,814645
	III	5	,314522	,141562	,297752	,108810	,492856
30 dias	I	5	1,003693	,533610	,980447	,429312	1,543308
	II	5	,535043	,268070	,639483	,205582	,800085
	III	5	,469372	,358570	,343564	,138775	1,055808

*Menor valor; **Maior valor.

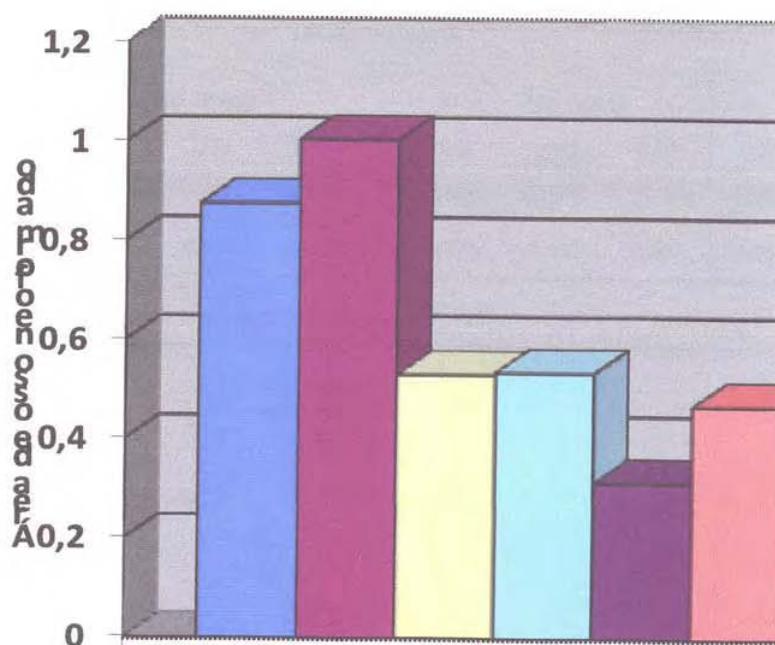


FIGURA 36– Estatísticas descritivas. Áreas de osso neoformado nos grupos I (GM), II (GX) e III (C), após 15 e 30 dias.

A comparação entre os grupos demonstrou haver diferença estatisticamente significativa exatamente entre os grupos nos quais se localizaram os quantitativos extremos de área neoformada e valor médio, ainda que exclusivamente na primeira fase do experimento.

Desta forma, o reparo ósseo no grupo I foi superior ao do grupo III aos 15 dias, não diferindo do grupo II ou mesmo de sua própria categoria, 15 dias após (Tabela 10).

Tabela 11 – Valores de U e p em comparações inter-grupos e intra-grupos (15/30 dias).

	INTER-GRUPOS						INTRA-GRUPOS		
	(15 DIAS)			(30 DIAS)			(15/30 DIAS)		
	I/II	I/III	II/III	I/II	I/III	II/III	I/I	II/II	III/III
U	4,000	1,000	6,000	6,000	5,000	10,000	11,000	11,000	10,000
p-valor	0,076	0,016	0,175	0,175	0,117	0,602	0,754	0,754	0,602

* Teste U de Mann-Whitney; bicaudal.

**Valor em negrito: significância estatística ($p < 0,05$)

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A ocorrência de extensas lesões, ou mesmo procedimentos cirúrgicos com grandes manipulações ósseas, como ocorre em alguns processos inflamatórios crônicos e amplas ressecções tumorais, poderá resultar na persistência de importantes cavidades no plano esquelético. Algumas destas, em condições normais (e desde que tenha havido eliminação do agente etiológico), têm a possibilidade de ser reparadas pelo processo biológico natural, estando a extensão e velocidade do mesmo na dependência da localização anatômica, da dimensão lesional e das características biológicas de cada indivíduo. Assim, podem ser necessários anos para completar-se um reparo, o que se torna um fator complicador para a resolução do processo. Tal problemática, há décadas tem levado ao desenvolvimento de pesquisas que se destinam à busca de alternativas para auxiliar o reparo tecidual nos eventos lesivos em que foi excedida a possibilidade de resposta orgânica em qualidade e tempo considerados satisfatórios (LIMEIRA JÚNIOR, 2004).

Quando a utilização de um enxerto é o tratamento de escolha para o preenchimento e reconstrução teciduais de uma loja óssea, o uso de material autólogo seria a alternativa preferencial; entretanto, considerando-se os vários complicadores agregados a esta técnica, bem como o risco potencial de transmissão de doenças, inerente a uma fonte alogênica, a investigação dos benefícios e limitações de enxertos xenógenos e aloplásticos têm sido a tônica de experimentos científicos na área (GUTIERRES *et al*, 2006; TUDOR *et al*, 2008).

Dentre as características desejadas para um biomaterial substituto ósseo eficaz destacam-se, especialmente, a combinação entre resistência e elasticidade (ORR *et al.*, 2001), bioatividade (capacidades osteocondutiva, osteopromotora, osteoindutiva e osteogênica) e inércia imunológica (biocompatibilidade), além de biodegradabilidade (XU

et al., 2008; CHEN *et al.*, 2009). Busca-se, através de tais propriedades, o incremento dos processos de síntese e remodelação do osso neoformado, uma vez que o reparo destina-se tanto a recompor uma porção perdida quanto a restabelecer a integridade arquitetural que protege os elementos vitais do tecido (DENG; CHEN; LEE, 2008). Sabe-se, contudo, que nenhum elemento substituto é capaz de prover todas estas qualidades, mas apenas uma fração das mesmas (TUDOR *et al.*, 2008).

Pesquisas desenvolvidas na área lançam mão de diferentes protocolos envolvendo modelos animais de portes diversos (FUJITA *et al.*, 2001; CANCEDDA *et al.*, 2007; KUZNETSOV *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009), sempre no intuito de replicar, com a máxima similaridade, as condições fisiopatológicas a que se submetem o ser humano. Neste contexto, pode-se citar, por exemplo, a realização de experimentos na calota craniana de animais, composta por ossos de origem embrionária semelhante à dos maxilares (CARDOSO, 2008).

No presente trabalho, o uso de fêmur de ratos adultos *Wistar* deveu-se à intenção de observar o reparo do tecido cortical de um osso longo, o que envolve ainda o conjunto de fenômenos desenvolvidos na cavidade circundada por este (canal medular). O reparo em ossos longos também tem sido avaliado em animais maiores (SCHNETTLER *et al.*, 2008), mas o modelo escolhido, além de baixo custo, oferece a vantagem de um manejo relativamente fácil. O tamanho do defeito ósseo ora produzido (3,0mm³) também já havia sido padronizado em protocolos anteriores (LIMEIRA JÚNIOR, 2004; ESPITALIER *et al.*, 2009), sendo suficiente para a acomodação dos enxertos estudados e incapaz de exceder o limite de resistência óssea do animal.

Ambos os biomateriais envolvidos nesta pesquisa apresentam-se sob a forma de micropartículas e possuem origem bovina (xenogênicos), quer na versão composta (matriz

orgânica e mineral, na proporção de 1:1, acrescida de colágeno aglutinante – Gen-Mix®, grupo I), quer na versão inorgânica (osso inorgânico desproteinizado – Gen-Ox®, grupo II). Segundo Jensen *et al.* (2008), o substrato inorgânico é um elemento de natureza osteocondutora e reabsorção relativamente lenta. Tais características foram avaliadas ao longo do experimento e mostraram-se presentes nos grupos enxertados: tanto houve superioridade quantitativa e/ou qualitativa destes em relação ao controle (grupo III), em alguma fase do estudo, quanto percebeu-se, ao fim do período, a presença de partículas do biomaterial no interior do tecido, especialmente no grupo submetido à enxertia inorgânica.

Jensen *et al.* (2008) também confirmaram o achado de partículas de osso inorgânico em períodos mais tardios do reparo ósseo. Neste sentido, foi importante observar o padrão de reabsorção tecidual relativo aos grupos I e II, uma vez que a composição química das partículas utilizadas no primeiro apresenta o componente inorgânico na razão de 50%, quando comparada à daquelas enxertadas no segundo. Embora não tenha sido feita análise quantitativa de partículas remanescentes, a avaliação qualitativa constatou, nos espécimes do grupo II, uma maior permanência das mesmas em meio à lojas ósseas. Tal aferição confirma uma maior lentidão na reabsorção do material puramente inorgânico que, se por um lado revela tal faceta, por outro tem a propriedade de conferir estabilidade arquitetural às áreas danificadas, especialmente nas primeiras fases do reparo ósseo (BATISTA JUNIOR, 1999).

A análise morfométrica aplicada neste experimento destinou-se exclusivamente à avaliação quantitativa de neoformação óssea nos grupos I, II e III. Desta forma, utilizando método de segmentação de imagens por classes, o tecido que se deseja mensurar é digitalmente isolado dos demais através da seleção de padrões colorimétricos. Tal tecnologia vem sendo desenvolvida pelo Departamento de Informática da UFPB e já foi

aplicada em trabalhos correlatos de avaliação do reparo ósseo (QUEIROGA, 2008; CARDOSO, 2008).

Aos 15 dias de observação, constatou-se que a área óssea neoformada no grupo I foi significativamente maior que no grupo III. Muito embora não tenha sido registrada diferença estatística entre os grupos I e II, este último também não se diferenciou significativamente do grupo III na primeira fase do estudo (muito embora as médias de neoformação óssea do grupo II aos 15 e 30 dias tenham sido maiores que as do grupo III, sugerindo uma melhor tendência ao desenvolvimento do reparo se em contraste com este). Isto leva a crer que sua já referida menor biodegradabilidade poderia atuar como um fator limitador do crescimento ósseo, ao menos nas primeiras etapas do reparo. Contudo, Espitalier *et al.* (2009) confirmaram o potencial deste biomaterial quando, associando osso inorgânico a recursos biológicos como células mesenquimais ou medula óssea total para a resolução de defeitos femorais de ratos previamente irradiados, observaram que, mesmo havendo maior crescimento ósseo nos grupos onde promoveu-se a associação celular, a biocompatibilidade e capacidade osteocondutiva do substrato usado na forma isolada foram demonstradas – ainda que em circunstâncias adversas de vascularização.

Adeyemo *et al.* (2008), por sua vez, ratificaram que o osso inorgânico, além de osteocondutor, é fisicamente capaz de prover uma maior resistência mecânica à área danificada. Sendo assim, a presença deste biomaterial é considerada, pelos autores, como uma vantagem clínica para o preenchimento de grandes cavidades, dada sua reconhecida eficácia na proteção dos defeitos contra um colapso estrutural durante o reparo ósseo.

Embora ambos tenham característica microgranular, os elementos particulados constituintes dos substitutos ósseos utilizados neste estudo apresentam diferença de tamanho entre as menores partículas de cada tipo de enxerto. Muito embora haja estudos

investigativos sobre as possíveis relações entre o tamanho dos grânulos de enxertia e sua eficácia para a neoformação óssea (SICCA *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2003), os resultados apontam que tal diferença é importante em relação aos substitutos ósseos aloplásticos (como a hidroxiapatita sintética) e interessa tanto às dimensões das partículas quanto às dimensões de seus poros. Sabe-se que, nestes casos, quanto menores os grânulos, melhores os resultados de osteocondutividade. O contrário, porém, se dá em relação ao tamanho dos poros: se excessivamente pequenos, são capazes de interferir negativamente na eficácia do biomaterial (ROSA *et al.*, 2000).

Em materiais de origem bovina, contudo, não há evidências da influência desta característica na qualidade do reparo ósseo (CARNEIRO *et al.*, 2005). Desta forma, ainda que os microgrânulos do biomaterial composto sejam menores que os do osso inorgânico, a simples diferença existente entre o tamanho das partículas não justificaria a tendência a maior neoformação óssea expressa pelo grupo I na primeira fase do experimento. Diante do exposto, poderia-se aventar, mais uma vez, a participação do diferencial existente entre os graus de biodegradabilidade dos grânulos enxertados para a observação de tal resultado.

Aos 30 dias observou-se, especialmente no grupo III, a reabsorção de grande parte do tecido inicialmente formado na cavidade medular. Estes achados coincidem com as observações de Adeyemo *et al.* (2008), que chamaram atenção para a participação do processo apoptótico em fases mais tardias do reparo ósseo. Por outro lado, o experimento ora realizado não demonstrou, nesta fase, significância estatística quantitativa entre os valores de área óssea neoformada encontrados nos grupos I, II e III, de modo que nem mesmo a diferença existente entre os grupos I e III, aos 15 dias, foi mantida. Entretanto, uma vez que nenhum dos grupos alcançou a completude (grau 4) do reparo tecidual ao final do período proposto, avaliações posteriores deste modelo de estudo poderiam aferir

com mais relevância as possíveis consequências da eventual remanescência destes substitutos ósseos no sítio de reparo.

Neste sentido, encontramos em Cardoso (2008) uma abordagem do reparo ósseo aos 45 dias de pós-operatório em ratos *Wistar*. Em seu estudo, os sítios experimentais de enxertia foram preenchidos por biomaterial composto Gen-Mix® (grupo 1) ou aloplástico Gen-Phos® (grupo 2), e ambos foram comparados a um sítio controle (grupo 3, não enxertado). O autor não encontrou diferença estatística entre os grupos no período citado; contudo, argumenta o mesmo, o maior valor médio de osso neoformado, encontrado no grupo 1, indicaria melhor tendência do referido grupo à regeneração tecidual.

Em nosso experimento, como visto, não somente o índice de valor médio foi maior no grupo tratado com o biomaterial composto (grupo I), mas também o maior valor absoluto de área neoformada entre as amostras, tanto aos 15 quanto aos 30 dias. Assim, os presentes resultados vêm a confirmar achados pré-existentes, reforçando a supra-citada argumentação quanto às tendências de reparo ósseo nestas condições de enxertia .

A avaliação histológica qualitativa é, de fato, passível de limitações quanto à replicação metodológica, tendo em vista sua inerente condição, sob muitos aspectos, de subjetividade. Entretanto, é de indiscutível importância contextualizar os diferentes fenômenos teciduais e celulares associados ao desenvolvimento de condições biológicas variadas, razão pela qual esta pesquisa se propôs a também abordá-los.

Neste estudo, buscamos critérios de avaliação histológica previamente utilizados em experimentos envolvendo reparo ósseo, pelo que foram reproduzidos os parâmetros adotados por Cardoso (2008), muito embora fazendo adaptações consideradas pertinentes (mais especificamente quanto à estimativa de neoformação tecidual), considerando-se as peculiaridades do modelo eleito pelo autor (osso parietal), o qual não é dotado de cavidade central como a encontrada no fêmur.

Em nenhuma das amostras foram encontrados indícios de reação do tipo corpo estranho (RCE), achados destacados por Marins *et al.* (2004) e CARNEIRO *et al.* (2005), em experimentos com ratos e coelhos, respectivamente. Conforme enfatizado por ambos, um rígido controle de qualidade na produção do biomaterial de origem bovina é capaz de suprimir tal efeito, não somente evitando processos deletérios ao tecido enxertado, mas também possibilitando a expressão completa do potencial osteocondutor do substituto ósseo, uma vez que a ampla atividade macrofágica atua como inibidora do reparo (em última instância, em virtude da grande quantidade de material lítico liberada no local).

Por outro lado, a típica permeação inflamatória, inerente a qualquer processo regenerativo (especialmente em sua fase inicial), é fundamental e desejável, à medida que provê o aporte de mediadores químicos necessários à proliferação de tecido conectivo, vasos sanguíneos e fenômenos de diferenciação celular (especialmente citocinas e fatores de crescimento). À parte isso, há que se considerar a possibilidade de os biomateriais, *per se*, incrementarem este tipo de reação, já que, segundo Busenlechner *et al.* (2008), suas diferentes propriedades afetam de diversas maneiras os eventos da consolidação tecidual.

A avaliação qualitativa do infiltrado inflamatório nesta pesquisa demonstrou a existência de um exsudato mais frequentemente leve na primeira fase de observação, essencialmente constituído por elementos mononucleares. Tal achado expressou tendência ao declínio, conforme também observaram Zambuzzi *et al.* (2006), resultando em amostragem na qual a maioria dos espécimes revelou permeio inflamatório ausente ou mínimo aos 30 dias. O subgrupo III foi o único a exibir o padrão inexistente/incipiente em todos os animais desta fase mas, ainda que este tenha se diferenciado estatisticamente de seu correlato de 15 dias, o mesmo não ocorreu quando comparado aos grupos I e II ao final do experimento, o que pode ser interpretado como indício de biocompatibilidade por parte de ambos os substitutos empregados.

O nível de vascularização na área do reparo foi o parâmetro que ofereceu maior dificuldade para a comparação microscópica, uma vez que o defeito femoral é preenchido não somente por osso, mas ainda por medula óssea, um tecido que, em princípio, já se revela extremamente vascularizado. Nestes casos, seria mais adequada, por exemplo, a utilização de marcadores imunoquímicos para células endotélio-progenitoras, entre outras técnicas, o que não foi a abordagem desta pesquisa. Entretanto, é de sabida importância a ação tecidual de fatores angiogênicos locais e sistêmicos para o reparo ósseo em geral (KILIAN *et al.*, 2008; WEISS *et al.*, 2009), o que torna importante a observação, ainda que limitada, de tal critério.

Sendo assim, foram consideradas, para efeito comparativo, a distribuição de vasos sanguíneos/linfáticos no tecido conjuntivo denso neoformado presente na superfície e entre as traves ósseas, a multiplicidade de canais de Havers (abrigo vascular do osso lamelar diafisário), quando diante de zonas mais avançadas de regeneração cortical e, nos grupos enxertados, a eventual invasão ósteo-vascular das partículas. Em todos os grupos os graus de vascularização foram considerados de moderados a intensos e, à parte relatos de literatura (CARNEIRO *et al.*, 2005; ZAMBUZZI *et al.*, 2006), não foram reveladas diferenças significantes entre as comparações inter e intra-grupos, o que pode ser atribuído não só à própria subjetividade do parâmetro, como também à já citada peculiaridade da região femoral, considerando-se que determinadas aferições do gênero foram realizadas em sítios ectópicos (tecido celular subcutâneo de ratos).

O tecido conjuntivo fibroso (TCF) foi um achado mais frequentemente presente na primeira fase da observação microscópica. Aos 15 dias, houve diferença entre os grupos I e II, apontando para uma graduação moderada no primeiro, e leve no segundo. Já ao final do experimento, a maioria dos espécimes teve tal parâmetro graduado como inexistente ou incipiente. A comparação intra-grupos demonstrou, por exemplo, uma modificação no

padrão do grupo II, que passou a pertencer a esta categoria. Sabe-se que a presença de tecido conjuntivo, nestas circunstâncias, tanto revela potencialidade para a posterior osteogênese quanto, por outro lado, poderia interferir na osteointegração de determinados biomateriais (CARDOSO, 2008). Embora não diferenciado significativamente dos demais aos 30 dias, o grupo I mostrou uma tendência à presença mais marcada de TCF.

Novamente, a realização de avaliações mais tardias poderiam ser úteis na averiguação deste critério. Entretanto, a correlação de tais achados com os resultados morfométricos relativos a este grupo, sugerem a eficácia do biomaterial empregado enquanto agente osteocondutor, o que foi previamente corroborado em estudos com biomateriais xenógenos (MARINS *et al.*, 2004; CARNEIRO *et al.*, 2005; CARDOSO *et al.*, 2008).

Finalmente, foram avaliadas qualitativamente a atividade osteoblástica e a própria neoformação óssea. Mais uma vez, uma abordagem imunoquímica seria mais precisa em relação ao primeiro parâmetro, conforme realizaram ADEYEMO *et al.* (2008), estudando a expressão do Ki-67 em osteoblastos durante o reparo ósseo. Em nossa observação, as expressões morfológicas de basofilia e aumento volumétrico do citoplasma osteoblástico mostraram-se mais frequentemente intensas nos grupos enxertados do que no controle, muito embora só tenhamos atestado diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e III, aos 30 dias (intensa no primeiro, moderada no segundo). Os dados microscópicos, neste caso, coincidem com os morfométricos, que expressaram maior neoformação óssea no grupo I neste período.

Por sua vez, em relação à quantidade aparente de tecido ósseo e espessura da cortical neoformada, apenas dois espécimes do grupo III obtiveram o escore 3 (intenso), permanecendo todos os demais classificados dentro de padrão moderado (especialmente grupo II) ou leve (padrão mais frequente no grupo III). Nestes casos demonstrou-se que,

muito embora não tenha sido estabelecida, histologicamente, diferença entre as quantidades ósseas comparadas, em dois casos do grupo II percebeu-se uma tendência ao direcionamento cortical do osso neoformado, traduzindo-se em uma maior aproximação, aos 30 dias, do padrão de completude regenerativa (em que o defeito ósseo estaria totalmente reparado, tanto em extensão quanto em espessura).

O não-encontro histológico, em nenhum dos períodos, de diferenças estatisticamente relevantes quanto ao tecido neoformado coincidiu com os achados de Cardoso (2008), mas divergiu, de alguma maneira, dos dados apontados pela morfometria desta pesquisa, que expressou relevância entre os grupos I e III aos 15 dias. Tal observação vem a reforçar o caráter subjetivo das avaliações qualitativas, muito embora seja inegável sua importância contextual para o entendimento da dinâmica dos processos biológicos desenvolvidos no reparo ósseo.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Os dados obtidos ao final do período observacional deste experimento permitem concluir que:

- 1) Os defeitos ósseos submetidos à enxertia com biomateriais de origem bovina na forma composta (matriz orgânica cortical, matriz inorgânica esponjosa e colágeno bovino) e inorgânica apresentaram, histologicamente, uma melhor reparação óssea em comparação aos fisiologicamente reparados nos períodos de 15 e 30 dias.
- 2) O biomaterial na forma composta associou-se a uma reparação mais precoce, bem como uma maior deposição de matriz óssea neoformada (mm²), em comparação ao enxerto inorgânico e à não-enxertia (controle) aos 15 dias.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABOELSAAD, N. S.; SOORY, M.; GADALLA, L. M. A. *et al.* Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of bone defects (an experimental study). **Lasers Med Sci**, v. 24, p. 527-533, 2009.
- ADEYEMO, W. L.; REUTHER, T.; BLOCH, W. *et al.* Healing on onlay mandibular bone grafts covered with collagen membrane or bovine bone substitutes: A microscopical and immunohistochemical study in the sheep. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 37, p. 651-659, 2008.
- ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 2, p. 191-98, 2006.
- BATISTA JÚNIOR, E. L. *et al.* Use of bone-derived anorganic bone associated with guided tissue regeneration in intra-bony defects. Six month evaluation at re-entry. **J. Periodontol.**, v. 70, n. 9, p. 1000 – 1007, 1999.
- BUSENLECHNER, D.; TANGI, S.; MAIR, B. *et al.* Simultaneous in vivo comparison of bone substitutes in a guided bone regeneration model. **Biomaterials**, v. 29, p. 3195-3200, 2008.
- CANCEDDA, R.; GIANNOTI, P.; MASTROGIACOMO M.A. Tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. **Biomaterials**, v. 28, p. 4240 - 4250, 2007.
- CARDOSO, A. B. **Estudo histomorfométrico comparativo da reparação óssea em ratos após o uso de biomateriais de origem bovina e sintética.** 2008. 133 f. Tese (Doutorado em Odontologia. Área de concentração: Estomatologia) – Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal da Bahia. João Pessoa, 2008.
- CARNEIRO, E.; GARCIA, R. B.; OLIVEIRA, R. C. *et al.* Microscopic and radiographic analysis of the effect of particle size of demineralized bovine cancellous bone matrix on the repair of bone defects in femurs of rabbits. **J Appl Oral Sci**, v. 13, n. 2, p. 157-162, 2005.
- CHEN, K.; SHYU, P.; DONG, G. *et al.* Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. **Biomaterials**, v. 30, p. 1682-1688, 2009.
- CONZ, M. B.; GRANJEIRO, J. M.; SOARES, G. A. Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications as bone graft. **J Appl Oral Sci**, v. 13, n. 2, p. 136-140, 2005.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Ossos, articulações e tumores de partes moles. In: Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005, p.1088-1090.

CRUMP, T. B.; RIVERA-HIDALGO, F.; HARRINSON, J. W. *et al.* Influence of three membrane types on healing of bone defects. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 82, p. 365-374, 1996.

DAMIEN, C. J.; PARSON, J. R. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. **J Appl Biomater**, v. 2, n. 3, p. 187-208, 1991.

DENG, Q.; CHEN, Y.; LEE, J. D. An investigation of the microscopic mechanism of fracture and healing processes in cortical bone. **International Journal of Damage Mechanics**, v. 18, p. 491-502, 2009.

DIMITRIOU, R.; TSIRIADIS, E.; GIANNOUDIS, P.V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, v. 36, n. 12, p. 1392-1404, 2005.

DYBVIK, T.; LEKNES, K. N.; BOE, O. E. *et al.* Bioactive ceramic filler in the treatment of severe osseous defects: 12-month results. **J Periodontol** 78:403-410. doi: 10.1902/jop.2007.060263, 2007.

ELLIS III, E. Reconstrução cirúrgica dos defeitos da mandíbula. In: PETERSON, L. J. *et al.* (Org.). **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 27, p. 606-616, 1996.

ESPITALIER, F.; VINATIER, C.; LEROUXEL, E. *et al.* A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone. **Biomaterials**, v. 30, p. 763-769, 2009.

FOGAÇA, W. C. **Análise da integração do aloenxerto ósseo de crânio criopreservado e irradiado, adicionado de medula óssea autóloga: estudo experimental em coelhos**. 2007. 142f. Tese (Doutorado em Ciências – Área de concentração Cirurgia Plástica) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

FUJITA, R.; YOKOYAMA, A; KAWASAKI, T. *et al.* Bone augmentation osteogenesis using hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate blocks. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 61, p. 1045-1053, 2003.

GALEA, L. G.; BOHNER, M.; LEMAÎTRE, J. *et al.* Bone substitute: transforming β -tricalcium phosphate porous scaffolds into monetite. **Biomaterials**, v. 29, p. 3400-3407, 2008.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Cartilagem e osso. In: GARTNER, L.P; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2003. Cap. 7, p. 104-123.

GERBI, M. E. M.; PINHEIRO, A. L. B.; LIMEIRA JÚNIOR, F. A. *et al.* Assessment of bone repair associated to the use of organic bovine bone and membrane irradiated with 830nm. **SPIE, Lasers in Dentistry IX**, v. 4950, p. 137-142, 2003.

GIORDANO, V.; GIORDANO, M.; KNACKFUSS, I. G. Fatores de crescimento e diferenciação ósseos. Efeitos sobre o processo de consolidação de fratura: presente e futuro. **Rev. bras. med.**, São Paulo, v. 57, n. 9, p. 1018-1029, 2000.

GUERRA NETO, M.; PAIVA, A. O.; COSTA, N. G. Caracterização de compósitos biovidro-polihidroxibutirato quanto à morfologia e microdureza. **Revista Matéria**, v. 10, n. 1, p. 31-36, 2005.

GUTIERRES, M.; LOPES, M. A.; HUSSAIN, N. S. *et al.* Substitutos Ósseos – conceitos gerais e estado atual. **Arquivos de Medicina**, v. 19, n. 4, p. 153-162, 2006.

HUPP, J. R. Reparação das feridas. In: PETERSON, L. J. *et al.* **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 4, p. 53-68, 2005.

JENSEN, S. S.; BORNSTEIN, M. M.; DARD, M. *et al.* Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. A long-term histomorphometric study in minipigs. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, p. 171-181, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008. Cap. 8, p. 135-152.

KILIAN, O.; WENISCH, S.; KARNATI, S. *et al.* Observations on the microvasculature of bone defects filled with biodegradable nanoparticulate hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 29, 3429-3437, 2008.

KNABE, C.; KOCH, C.; RACK, A.; *et al.* Effect of β -tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans. **Biomaterials**, v. 29, p. 2249-2258, 2008.

KUZNETSOV, S. A.; HUANG, K. E.; MARSHALL, G. W. *et al.* Long-term stable canine mandibular augmentation using autologous bone marrow stromal cells and hydroxyapatite/tricalcium phosphate. **Biomaterials**, v. 29, p. 4211-4216, 2008.

LAUREANO FILHO, J. R.; BRANCO, B. L. C.; ANDRADE, E. S. S. *et al.* Comparação histológica entre o osso desmineralizado e polímero de mamona sobre a regeneração óssea. **Ver Bras Otorrinolaringol**, v. 73, n. 2, p. 186-192, 2007.

LIMEIRA JÚNIOR, F. A. **Avaliação do reparo ósseo com o uso de osso anorgânico e membrana reabsorvível após irradiação com laser diodo 830nm**. 2001. 177 p. Dissertação (Mestrado em Estomatologia) – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2001.

LIMEIRA JÚNIOR, F. A. **Estudo do Reparo de Defeitos Ósseos irradiados com Laser λ 830nm submetidos ou não a Implante de Hidroxiapatita Sintética e/ou Membrana de Osso Bovino**. 2004. 150p. Tese (Programa Integrado de Pós-Graduação em

Odontologia — Área de Concentração em Laser em Odontologia). Universidade Federal da Bahia / Universidade Federal da Paraíba. Salvador, 2004.

LIMEIRA JÚNIOR, F. A. *et al.* The biomodulative effect of low level laser therapy on the repair of bone defects submitted to xenografts. **Proc. ILSD**, Moduzzi Editore, p. 99-1-2, 2005.

LIND, M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteotomies, and implants fixation. **Acta orthop Scand**, Copenhagen, v. 69, n. 283, p. 1-37, 1998. Suplemento.

LIVINGSTON, A.T.; TRAN, T.; MCALARY, J. *et al.* A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. **Biomaterials**, v. 27, p. 1542 – 1549, 2005.

MARCATONIO JUNIOR, E; MARCATONIO, R. A. C.; CIRELLI, J. A. Regeneração óssea: vertical e horizontal. In: TUNES, U. R.; RAPP, G. E. **Atualização em Periodontia e Implantodontia**. São Paulo: Artes Médicas, 1999. Cap. 15, p. 297-316.

MARINS, L. V.; CESTARI, T. M.; SOTTOVIA, A. D. *et al.* Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. **J Appl Oral Sci**, v. 12, n. 1, p. 62-69, 2004.

MELCHER, A. H.; DENT, H. D. The use of heterogenous anorganic bone as an implant material in oral procedures. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 15, p. 996-1000, 1962.

MODOLIN, M. L. A.; SOUZA, L. C. M. Consolidação óssea e cicatrização das feridas. In: BARROS, J. J.; SOUZA, L. C. M. **Traumatismo Bucomaxilofacial**. São Paulo: Roca, 1993, cap. 03, p. 51-62.

MOREIRA, A. S. B.; PASTORELI, M. T.; DAMASCENO, L. H. F. *et al.* Estudo experimental da influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita na integração óssea. **Acta Ortop Bras**, v. 11, n. 4, p. 240-250, 2003.

NULEND, J. K.; BACABAC, R.G.; MULLENDER, M.G. Mechanobiology of bone tissue. **Pathologie Biologie**, v. 53, p. 576-580, 2005.

ORR, T. E.; VILLARS, P.A.; MITCHELL, S. L. *et al.* Compressive properties of cancellous bone defects in a rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 22, p. 1953 – 1959, 2001.

PINHEIRO, A. L. B.; LIMEIRA JÚNIOR, F. A.; GERBI, M. E. M. *et al.* Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 21, n. 6, p. 383-388, 2003.

PINTO, A. V. S.; MIAGUSKO, J. M.; PEREIRA, L.A.V. Aumento ósseo com enxerto autógeno – Áreas doadoras intrabucais. In: CARDOSO, R.J.A.; MACHADO, M. E. L.

Odontologia, arte e conhecimento: dentística, prótese, ATM e Implantodontia. 1ª ed. São Paulo: Artes Médicas, v. 3, 2003.

QUEIROGA, A. S.; SOUSA, F. B., ARAÚJO, J. M. S. *et al.* Evaluation of the bone repair in femur of rats submitted to laser therapy in different wavelengths: an image segmentation method of analysis. **Laser Physics Letters**, v. 9, p. 71-79, 2008.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing.** R Foundation for statistical computing. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em 20 de julho de 2009.

REDDI, A. H.; ANDERSON, W. A. Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification and hemopoiesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 69, p.552-572, 1976.

RIPAMONTI, U.; CROOKS, J.; KHOALI, L. *et al.* The induction of bone formation by coral-derived calcium carbonate/hydroxyapatite constructs. **Biomaterials**, v. 30, p. 1428-1429, 2009.

ROSA, A. L.; SHAREEF, M. Y.; NOORT, R. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. **Pesqui Odontol Bras**, v. 14, n. 3, p. 273-277, 2000.

SANADA, J. T.; RODRIGUES, J. G. R.; CANOVA, G. C. *et al.* Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. **J Appl Oral Sci**, v. 11, n. 3, p. 209 – 215. 2003.

SCHELL, H.; LIENAU, J.; DEVAKARA, R. *et al.* Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. **Bone**, v. 38, p. 547-554, 2006.

SCHNETTLER, R.; KNÖB, P. D.; HEISS, C. *et al.* Enhancement of bone formation in hydroxyapatite implants by rhBMP-2 coating. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, p. 75-81, 2008.

SERRA-SILVA, F. M. S.; ALBERGARIA-BARBOSA, J. R.; MAZZONETO, R. Clinical evaluation of association of bovine organic osseous matrix and bovine bone morphogenetic protein versus autogenous bone graft in sinus floor augmentation. **J Oral Maxillofac Surg**, V. 64, P. 931-935, 2006.

SICCA, C. M.; OLIVEIRA, R. C.; SILVA, T. L. *et al.* Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. **Ver FOB**, v. 8, n. 12, p. 1-10, 2000.

SIEGEL, S. **Estatísticas não-paramétricas para ciências do comportamento.** São Paulo: Ed. McGraw-Hill, 1975.

SIGURDSSON, T. J. *et al.* Periodontal repair in dogs: recombinant bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. **J. periodontal.**, Indianápolis, v. 66, p.131-138, 1995.

SOCCOL, A. T.; BETTEGA, S.; NORONHA, L. *et al.* Comparação entre os bioenxertos de hidroxiapatita de cálcio e submucosa de intestino delgado porcino o preenchimento de defeitos ósseos criados em mandíbula de ratos. **Ver Bras Otorrinolaringol**, v. 72, n. 2, p. 195-199, 2006.

SPECTOR, J. A. *et al.* Expression of bone morphogenetic proteins during bone healing. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 107, n. 1, p. 124-134, 2001.

TAGA, R.; CESTARI, T. M.; SILVA, T. L. *et al.* Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. **Rev. Bras. Implant.**, p. 13, jan./fev., 1997.
TEM CATE, A. R. **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 439p.

TUDOR, C.; SROUR, S.; THORWARTH, M. *et al.* Bone regeneration in osseous defects – application of particulated human and bovine materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 105, n. 4, p. 430-436, 2008.

WANG, S.; ZHANG, Z.; ZHAO, J. *et al.* Vertical alveolar ridge augmentation with β -tricalcium phosphate and autologous osteoblasts in canine mandible. **Biomaterials**, v. 30, p. 2489-2498, 2009.

WEISS, S.; ZIMMERMANN, G.; PUFE, T. *et al.* The systemic angiogenic response during bone healing. **Arch Orthop Trauma Surg**, v. 129, p. 989-977, 2009.

WENZ, B.; OESCH, B.; HORST, M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. **Biomaterials**, v. 22, p. 1599-1606, 2001.

WILLIAMS, SK; KLEINERT, LB; HAGEN, KM; *et al.* Covalent modification of porous implants using extracellular matrix proteins to accelerate neovascularization. **J Biomed Mater Res**, v. 78, p. 59-65, 2006.

XU, S.; LIN, K.; WANG, Z. *et al.* Reconstruction of calvarial defect of rabbits using porous calcium silicate bioactive ceramics. **Biomaterials**, v. 29, p. 2588-2596, 2008.

YOUNG, B.; HEATH, J.W. Tecidos esqueléticos. In: YOUNG, B. HEATH, J.W. **Wheater Histologia Funcional**. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2000. Cap. 10, p. 172-192.

ZAMBUZZI, W. F.; OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, F. L. Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft. **Braz Dent J**, v. 14, n. 4, p. 274-278, 2006.

ANEXOS

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

CERTIDÃO

João Pessoa, 24 de maio de 2007

CEPA Nº. 0705/07

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadores: Prof. Dr. Francisco Limeira Júnior (Orientador); Lilian Débora Paschoalin e Silva (Pesquisadora)

Departamento/Setor: Departamento de Morfologia

Ref.: Projeto de Pesquisa: "AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS SUBMETIDOS A ENXERTO BOVINO PARTICULADO E COMPOSTO DE MATRIZ ORGÂNICA E MINERAL"

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Atenciosamente,

Prof. Dr. REINALDO NOBREGA DE ALMEIDA
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB

ANEXO B

ISSN 1677-7042



DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO

República Federativa do Brasil

100 ANOS
IMPRESA NACIONAL



SEÇÃO

1

Ano CXLV Nº 196

Brasília - DF, quinta-feira, 9 de outubro de 2008

Sumário

	PÁGINA
Atos do Poder Legislativo.....	1
Atos do Poder Executivo.....	5
Presidência da República.....	7
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.....	11
Ministério da Ciência e Tecnologia.....	12
Ministério da Cultura.....	14
Ministério da Defesa.....	16
Ministério da Educação.....	16
Ministério da Fazenda.....	16
Ministério da Justiça.....	22
Ministério da Previdência Social.....	30
Ministério da Saúde.....	31
Ministério das Cidades.....	32
Ministério das Comunicações.....	37
Ministério de Minas e Energia.....	41
Ministério do Desenvolvimento Agrário.....	53
Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome.....	53
Ministério do Meio Ambiente.....	54
Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão.....	54
Ministério do Trabalho e Emprego.....	58
Ministério dos Transportes.....	59
Ministério Público da União.....	59
Tribunal de Contas da União.....	60
Poder Judiciário.....	91
Entidades de Fiscalização do Exercício das Profissões Liberais.....	92

Atos do Poder Legislativo

LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008

Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA
Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

CAPÍTULO I
DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

Art. 1º A criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, obedece aos critérios estabelecidos nesta Lei.

TABELA DE PREÇOS DE JORNAIS AVULSOS		
Páginas	Distrito Federal	Demais Estados
de 04 a 28	R\$ 0,30	R\$ 1,80
de 32 a 76	R\$ 0,50	R\$ 2,00
de 80 a 156	R\$ 1,10	R\$ 2,60
de 160 a 250	R\$ 1,50	R\$ 3,00
de 254 a 500	R\$ 3,90	R\$ 4,50

* Acima de 500 páginas = preço de tabela mais excedente de páginas multiplicado por R\$ 0,0107

§ 1º A utilização de animais em atividades educacionais fica restrita a:

I - estabelecimentos de ensino superior;

II - estabelecimentos de educação profissional técnica de nível médio da área biomédica.

§ 2º São consideradas como atividades de pesquisa científica todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio.

§ 3º Não são consideradas como atividades de pesquisa as práticas zootécnicas relacionadas à agropecuária.

Art. 2º O disposto nesta Lei aplica-se aos animais das espécies classificadas como filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, observada a legislação ambiental.

Art. 3º Para as finalidades desta Lei entende-se por:

I - filo *Chordata*: animais que possuem, como características exclusivas, ao menos na fase embrionária, a presença de notocorda, fendas branquiais na faringe e tubo nervoso dorsal único;

II - subfilo *Vertebrata*: animais cordados que têm, como características exclusivas, um encefalo grande encerrado numa caixa craniana e uma coluna vertebral;

III - experimentos: procedimentos efetuados em animais vivos, visando à elucidação de fenômenos fisiológicos ou patológicos, mediante técnicas específicas e prestabelecidas;

IV - morte por meios humanitários: a morte de um animal em condições que envolvam, segundo as espécies, um mínimo de sofrimento físico ou mental.

Parágrafo único. Não se considera experimento:

I - a profilaxia e o tratamento veterinário do animal que deles necessite;

II - o anilhamento, a tatuagem, a marcação ou a aplicação de outro método com finalidade de identificação do animal, desde que cause apenas dor ou aflição momentânea ou dano passageiro;

III - as intervenções não-experimentais relacionadas às práticas agropecuárias.

CAPÍTULO II
DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA

Art. 4º Fica criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Art. 5º Compete ao CONCEA:

I - formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica;

II - credenciar instituições para criação ou utilização de animais em ensino e pesquisa científica;

III - monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa;

IV - estabelecer e rever, periodicamente, as normas para uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa, em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil seja signatário;

V - estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações;

VI - estabelecer e rever, periodicamente, normas para credenciamento de instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa;

VII - manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados ou em andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs, de que trata o art. 8º desta Lei;

VIII - apreciar e decidir recursos interpostos contra decisões das CEUAs;

IX - elaborar e submeter ao Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, para aprovação, o seu regimento interno;

X - assessorar o Poder Executivo a respeito das atividades de ensino e pesquisa tratadas nesta Lei.

Art. 6º O CONCEA é constituído por:

I - Plenário;

II - Câmaras Permanentes e Temporárias;

III - Secretaria-Executiva.

§ 1º As Câmaras Permanentes e Temporárias do CONCEA serão definidas no regimento interno.

§ 2º A Secretaria-Executiva é responsável pelo expediente do CONCEA e terá o apoio administrativo do Ministério da Ciência e Tecnologia.

§ 3º O CONCEA poderá valer-se de consultores *ad hoc* de reconhecida competência técnica e científica, para instruir quaisquer processos de sua pauta de trabalhos.

Art. 7º O CONCEA será presidido pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia e integrado por:

I - 1 (um) representante de cada órgão e entidade a seguir indicados:

a) Ministério da Ciência e Tecnologia;

b) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq;

c) Ministério da Educação;

d) Ministério do Meio Ambiente;

e) Ministério da Saúde;

f) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

g) Conselho de Reitores das Universidades do Brasil - CRUB;

h) Academia Brasileira de Ciências;

i) Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência;

j) Federação das Sociedades de Biologia Experimental;

l) Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;

m) Federação Nacional da Indústria Farmacêutica.

II - 2 (dois) representantes das sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País.

Miguel, Lílian Débora Paschoalin

Avaliação comparativa do reparo ósseo em fêmur de ratos submetidos a enxerto bovino composto ou inorgânico / Lílian Débora Paschoalin Miguel. – Recife: O Autor, 2009.

115 folhas: il.: fig., tab., quadros

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Reparo ósseo. 2. Materiais biocompatíveis
. I. Título.

665.937	CDU (2.ed.)	UFPE
617.15	CDD (22.ed.)	CCS2010-007