

MASTOBY MIGUEL MARTINEZ MARTINEZ

**COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITA E LIGNINA COMO PROMOTOR DE
OSSEOINTEGRAÇÃO ENTRE IMPLANTE METÁLICO E TECIDO ÓSSEO:
ESTUDO EXPERIMENTAL.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, Como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Magister Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2008**

MASTOBY MIGUEL MARTINEZ MARTINEZ

COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITA E LIGNINA COMO PROMOTOR DE OSSEOINTEGRAÇÃO ENTRE IMPLANTE METÁLICO E TECIDO ÓSSEO: ESTUDO EXPERIMENTAL.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, Como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2008.

Prof. Luiz Gonzaga Pompermayer
(Co-orientador)

Prof^a. Marlene Isabel Vargas Vitoria
(Co-orientadora)

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo

Prof. Maurício Paulo Ferreira Fontes

Prof^a. Andréa Pacheco Batista Borges
(Orientadora)

A mi esposa: Olga Cristina, por brindarme todo el apoyo en la consecución de esta nueva meta propuesta.

A Maria Gabriela, mi Angelito, que en estos momentos es la razón más importante de mi vida.

A mis padres: Alejandro e Edith y a mis hermanos: Aida Edith, Leo Mario, Emilse y Alejandro David.

A la memoria de mi querida abuela: Aida Ortiz (QEPD), quien me enseñó que con constancia y positivismo muchas cosas buenas se pueden conseguir en la vida.

A mi orientadora, Andréa, por ser una persona genial que me acompañó en todo este proceso de aprendizaje y en especial por la gran amistad que me brindó en los momentos que más lo necesité.

A la Profesora Marlene, al Profesor Joaquin y sus hijas, familia a la que no encuentro palabras para expresarme. Siempre los llevare en mi corazón.

AGRADECIMENTOS

Agradezco a Dios por mantener mi camino iluminado en todo momento.

A la Universidad de Córdoba, por permitirme realizar uno de mis mayores sueños profesionales.

Al profesor Alfredo Jarman, por toda la colaboración y sabios consejos.

A la universidad Federal de Viçosa y al DVT, por darme la oportunidad de ser parte de esta gran familia universitaria.

A Emily y Liana, quienes fueron mis compañeras de maestría y mis mejores amigas en el Brasil, por lo que siempre las llevaré en mi mente y en mi corazón.

A todos aquellos profesores que con su experiencia y sabios consejos, contribuyeron en mi formación personal y profesional.

A los estudiantes de graduación: Gláucia, Alexandro, Renato, Renata, Daniel y Daniel Portela; por toda la colaboración prestada.

A la profesora Sheila, del laboratorio J.H.S.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Implantes Ósseos	3
2.2. Hidroxiapatita como constituinte do tecido ósseo.....	4
2.3. Desenvolvimento científico da utilização da hidroxiapatita.....	5
2.4. Características da hidroxiapatita sintética (HAP)	7
2.5. Hidroxiapatita associada a outros componentes.....	10
2.6. Hidroxiapatita associada a lignina.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Avaliação clínica trans-operatória e pós-cirúrgica.....	22
4.1.1. Avaliação da claudicação	22
4.1.2. Avaliação da dor.....	24
4.1.3. Avaliação da circunferência tibial	25
4.1.4. Deiscência da ferida.....	26
4.2. Avaliação da região trabalhada cirurgicamente.....	27
4.2.1. Avaliação macroscópica e medição do defeito cortical tibial	27
4.3. Aspectos radiológicos.....	32
4.4. Teste mecânico de tração.....	37

4.5. Avaliação macroscópica do canal medular.....	39
4.6. Avaliação macroscópica das roscas dos pinos intramedulares.....	42
4.7. Difração de raios x.....	44
4.8. Aspectos histológicos.....	47
5. CONCLUSÃO	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura de uma HA $Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$. 7
- Figura 2: Fotografias do procedimento cirúrgico na tíbia de coelhos. Parte I. 13
- Figura 3: Fotografias do procedimento cirúrgico na tíbia de coelhos. Parte II. 15
- Figura 4: Fotografia do molde de PVC com amostra tíbia-pino intramedular de coelho em posicionamento vertical. 18
- Figura 5: Fotografia do acoplamento da amostra tíbia-pino intramedular de coelho a máquina universal de tração mecânica. 19
- Figura 6: Linha de tendências da claudicação dos coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina e o controle, avaliados clinicamente num período de 15 dias de pós-operatório. 23
- Figura 7: Representação gráfica das médias da circunferência da diáfise região tibial (cm) dos coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina e do grupo controle, avaliados clinicamente num período de 15 dias de pós-operatório. 25
- Figura 8: Linha de tendências da circunferência tibial média (cm) de coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina e do grupo controle avaliados clinicamente num período de 15 dias de pós-operatório. 26
- Figura 9: Fotografias do defeito cortical das tíbias de coelhos ilustrando seu preenchimento centrípeto e sua coloração nos diferentes dias da avaliação. 28
- Figura 10: Representação gráfica da reparação do defeito cortical tibial (mm) dos coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina (GT) e o grupo controle (GC) por médio da mensuração de seu diâmetro transversal nos dias do estudo experimental. 30
- Figura 11: Representação estatística do diâmetro do defeito cortical tibial (mm) entre datas de um mesmo grupo de coelhos em estudo experimental, onde TT representa o grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina e TC o grupo controle. 31
- Figura 12: Radiografias da tíbia de coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina em projeção mediolateral. 33
- Figura 13: Radiografias da tíbia de coelhos do grupo controle em projeção mediolateral. 35
- Figura 14: Representação gráfica dos graus 0,1,2,3 da radiopacidade da falha óssea tibial dos coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina (GT) vs o grupo controle (GC) nos dias do estudo experimental. 36

- Figura 15: Representação gráfica dos graus 0,1,2,3 da radiopacidade ao redor do pino intramedular tibial dos coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina (GT) vs o grupo controle (GC) nas datas do estudo experimental. 37
- Figura 16: Linha de tendências do teste de tração dos coelhos do grupo tratado (TT) com hidroxiapatita sintética-lignina e do grupo controle (TC) nos dias do estudo experimental. 38
- Figura 17: Fotografias do corte longitudinal das tíbias de coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina ilustrando a distribuição e coloração dentro do canal medular. 40
- Figura 18: Fotografia do corte longitudinal da tíbia de coelho do grupo controle ilustrando a distribuição homogênea e coloração vermelha da medula óssea. 41
- Figura 19: Linha de tendências da circunferência das roscas dos pinos intramedulares dos coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina (TT) e do grupo controle (TC) nos dias do estudo experimental. 43
- Figura 20: Difratoograma do composto de hidroxiapatita sintética-lignina. 44
- Figura 21: Difratoogramas do material obtido do canal medular e das roscas dos pinos intramedulares tibiais dos coelhos do grupo controle nos dias após das cirurgias. 45
- Figura 22: Difratoograma do composto de hidroxiapatita sintética e lignina, difratoograma do material obtido do canal medular das tíbias e das roscas dos pinos intramedulares dos coelhos do grupo tratado com hap-91-l nos dias após das cirurgias, e difratoograma da cortical tibial de coelho. 46
- Figura 23: Fotomicrografias de regiões do defeito cortical realizado em tíbias de coelhos, aos oito e 30 dias após as cirurgias. 49
- Figura 24: Fotomicrografias de regiões do defeito cortical realizado em tíbias de coelhos, aos 60 e 90 dias após as cirurgias. 52
- Figura 25: Fotomicrografias de regiões do defeito cortical realizado em tíbias de coelhos, aos 120 dias após as cirurgias. 54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Classificação do grau de radiopacidade ao redor do pino intramedular utilizado na tíbia de coelhos do grupo controle e do grupo tratado com hidroxiapatita sintética–lignina. 17
- Tabela 2: Classificação do grau de radiopacidade na região da falha óssea tibial de coelhos do grupo controle e do grupo tratado com hidroxiapatita sintética–lignina. 17
- Tabela 3: Classificação em graus do diâmetro transversal (mm) do defeito experimental cortical tibial de coelhos. 18
- Tabela 4: Número de coelhos classificados (graus) de acordo com a dor à palpação digital durante exame clínico no pós-operatório de 15 dias. 24
- Tabela 5: Número de coelhos classificados (graus) de acordo ao diâmetro transversal do defeito cortical tibial avaliados aos oito, 30, 60, 90 e 120 dias após as cirurgias. 27
- Tabela 6: Medias do teste mecânico de tração (kg F) exercida no pino intramedular implantado na tíbia de coelhos tratada com hidroxiapatita sintética-lignina (GT) e na tíbia sem tratamento com hidroxiapatita sintética-lignina (GC) durante os dias de avaliação. 37
- Tabela 7: Medias da circunferência do ponto correspondente à rosca dos pinos intramedulares (mm) após de sua extração do canal medular das tíbias de coelhos nos dias da avaliação. 42

RESUMO

MARTINEZ MARTINEZ, Mastoby Miguel, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Compósito de hidroxiapatita e lignina como promotor de osseointegração entre implante metálico e tecido ósseo: estudo experimental.** Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges. Co-orientadores: Luiz Gonzaga Pompermayer, Marlene Isabel Vargas Vilorio e Maria Verônica de Souza.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o compósito de hidroxiapatita sintética associada à lignina, como promotor de integração entre um implante metálico (pino intramedular de Schanz) e o tecido ósseo. Foram utilizados 20 coelhos da raça Nova Zelândia, em cada um, a tíbia esquerda foi tratada com o compósito e a tíbia direita não foi tratada, servindo como controle. Foi realizada uma falha óssea de aproximadamente 4mm de diâmetro na face lateral proximal da tíbia, até atingir o canal medular. Do compósito, 1000mg foram amolecidos com 10 gotas de solução fisiológica utilizando parte da massa para revestir a extremidade rosqueada do pino intramedular de Schanz em aço F 138 de tamanho 2.5mm para osso cortical e a outra parte introduzida no canal medular do grupo tratado com o auxílio de cateter calibre 16 e seringa descartável. Após a introdução de 7cm de comprimento do pino no canal medular, o defeito cortical foi preenchido com 400mg do compósito. O mesmo foi realizado nas tíbias controle, sem a utilização do compósito. Os animais foram submetidos à avaliação clínica diária por 15 dias, avaliando deiscência da ferida, claudicação, sensibilidade dolorosa e circunferência tibial. Foram realizadas radiografias imediatamente após o procedimento cirúrgico e aos 8, 30, 60, 90 e 120 dias do pós-operatório caracterizando a radiopacidade do defeito cortical e a radiopacidade ao redor do pino intramedular em ambas as tíbias, sempre comparadas ao osso circunvizinho. Nas mesmas datas, exceto no dia da cirurgia, 4 animais eutanasiaram-se e a região do defeito analisada: medida do defeito cortical, teste mecânico de tração do pino intramedular, medida do material aderido na rosca do pino, avaliação macroscópica do canal medular, teste de difração de raios X do material obtido da rosca do pino e do canal medular e avaliação histológica. A maioria dos animais teve evolução clínica normal. Nas radiografias do grupo tratado, houve um decréscimo da radiopacidade tanto no defeito como na superfície ao redor do pino até se

tornar semelhante à do osso circunvizinho, quadro inverso observado no defeito cortical do grupo controle, mas a superfície ao redor do pino se manteve radiotransparente até o final da avaliação. Observou-se preenchimento completo do defeito cortical com tecido ósseo novo em ambos os grupos ao final da avaliação. No teste mecânico de tração, não se observaram diferenças significativas entre o grupo tratado e o controle, apesar de no primeiro o resultado obtido ser o dobro da resistência do no segundo. Na avaliação macroscópica do canal medular, o grupo tratado mostrou regeneração da medula óssea e perda da visibilidade do compósito em cada data de avaliação, sendo quase total na observação de 120 dias, sugerindo a fagocitose do compósito. Regeneração da medula óssea foi observada no grupo controle, desde o primeiro dia de sua avaliação. Observou-se nas medidas da circunferência do material aderido à rosca dos pinos uma tendência linear crescente com o tempo em ambos os grupos, com diferença na característica do tecido que desenvolveu aos 90 e 120 dias, sendo no grupo tratado um tecido de consistência dura com características macroscópicas de osso. Na difração de raios-X notou-se que o compósito foi absorvido com a evolução do tempo e que os picos observados nos dois últimos dias de avaliação, tiveram características cristalinas compatíveis com a parte mineral do osso. Os resultados histológicos mostraram evolução normal no processo de regeneração óssea nos dois grupos. Entretanto, nas tíbias tratadas, o processo de reparação óssea se mostrou mais precoce, a partir de 30 dias, tendo como diferença a presença de osso trabecular e compacto no canal medular ao final da avaliação. Com isso se conclui que é possível utilizar a hidroxiapatita sintética e lignina para guiar o processo regenerativo ósseo até o canal medular.

ABSTRACT

MARTINEZ MARTINEZ, Mastoby Miguel, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2008. **Hydroxyapatite-lignin composite as a metallic implant-bone tissue osseointegration improver: experimental study.** Adviser: Andréa Pacheco Batista Borges. Co-advisers: Luiz Gonzaga Pompermayer, Marlene Isabel Vargas Viloria and Maria Verônica de Souza.

This study aimed to evaluate the composite made of synthetic hydroxyapatite associated with lignin, as a promoter of integration between a metal implant (intra-medullar pin, Schanz) and bone tissue. Twenty New Zealand rabbits were used, each of them had both tibia operated: the left one was treated with the composite and the right was not treated, serving as control. A 4mm diameter defect was made in the lateral side of the proximal tibia, reaching the medullar canal. Ten drops of saline solution were added to 1000mg of the composite, resulting in a mass, part of it was used to cover the thread end of the Schanz steel F 138 intra-medullar pin for cortical bone, size 2.5mm. The other part was inserted in the medullar canal of the treated group with the help of a size 16 catheter and disposable syringe. After the insertion of the 7cm pin in the medullar canal, the cortical defect was filled with 400mg of the composite. The same procedure was done in the tibia control, without the composite. The animals were daily evaluated for 15 days, assessing the wound dehiscence, lameness, painful sensitivity and the tibia's circumference measured. Radiographs were performed immediately after surgery and 8, 30, 60, 90 and 120 days post-operative characterizing the radioopacity of cortical defect and around the intramedullary pin in both tibias, comparing to the surrounding bone. On the same dates, except on the day of surgery, 4 animals were euthanized and the region of the defect examined: measure of the cortical defect, mechanical traction test of the intramedullar pin, measure the material on the pin threads, medullar canal macroscopic evaluation, X-ray diffraction of the material obtained from the pin thread and the medullar canal, and histological evaluation. Most of the animals had normal clinical development in both groups. In treated group, both radiopacity of the defect and the surface around the pin decreased reaching a similarity to the adjacent bone, while the opposite was observed in the control group, but in this, the area around the pin remained radioluscent until the last observation date. The cortical defect was completely filled by new bone in both groups at the last evaluation date. No significant difference was found between groups for the mechanical traction

test, although the values from treated group doubled the control group. Medullar canal macroscopic evaluation in the treated group showed regeneration of bone marrow and visibility loss of the composite on each observation date, almost complete at 120 days, suggesting phagocytosis of the composite. Regeneration of the bone marrow was observed in the control group, since the first day of their assessment. The circumference measures of the material on the threaded surface showed a linear increase with time in both groups, but presented a difference in the 90 and 120 days tissue's characteristic in the group treated: a hard material with macroscopic characteristics of bone. X-ray diffraction showed the evolution on the composite absorption and that the peaks observed in the last two dates presented characteristics consistent with the bone crystalline mineral part. The histological results showed normal bone regeneration in both groups, although the treated groups defect presented an earlier process and the presence of trabecular and compact bone in the medullar canal at the end of the evaluation. It can be concluded that the synthetic hydroxyapatite associated to lignin can guide the process of bone regeneration in the medullar cavity.

1- INTRODUÇÃO

O aprimoramento técnico-científico em ortopedia faz-se necessário pela frequência de traumatismos nos animais e no homem. Além disso, muitos acidentes provocam fraturas, às vezes com perda óssea significativa. Ainda, precisa-se de um enxerto ou de um substituto ósseo para ajudar ou completar a reparação de uma deficiência esquelética devido a um trauma, tumor, doença ou desenvolvimento anormal e assim restaurar a função.

A estrutura porosa da hidroxiapatita funciona como suporte passivo à angiogêneses que leva fatores indutores da aposição óssea. Sua superfície porosa parece fornecer um substrato adicional à regeneração do tecido ósseo permitindo a junção, mitoses, migração e expressão fenotípica de células ósseas, o que resulta em formação de novo osso, em aposição direta ao biomaterial.

A lignina é um componente da parede celular das plantas lenhosas que lhes fornece rigidez e age como agente permanente de ligação entre as células. É um polímero complexo de elevado peso molecular constituído de unidades de fenilpropano. Um compósito de hidroxiapatita sintética associada à lignina poderia unir a excelente bioatividade da primeira, que não possui coesão e resistência suficientes, com as propriedades mecânicas e ligantes celulares da última.

Recentemente o termo “bioengenharia” começou a ser usado para descrever um esforço multidisciplinar envolvendo pesquisadores do ramo da engenharia e ciência da saúde para resolver problemas críticos da perda de tecidos. A diversidade das aplicações dos biomateriais, assim como seu amplo espectro de composição química e a necessidade de formas e morfologias apropriadas para sua utilização fazem da pesquisa nessa área do conhecimento um trabalho interdisciplinar. É neste contexto que um grupo de pesquisa da UFV tem concentrado seus estudos, procurando bons substitutos ósseos, buscando elucidar os mecanismos de interação entre tecido ósseo e implante e assim contribuir para a resolução do problema resultante da perda, da dificuldade de reparação e elaboração de próteses ortopédicas.

Ante os efeitos adversos que têm a resina acrílica sobre o tecido ósseo durante a fixação de próteses articulares na ortopedia veterinária e humana, um grupo de pesquisa

da UFV em trabalho conjunto com pesquisadores particulares, tem-se motivado na consecução de um biomaterial que possa guiar o processo de regeneração óssea até o canal medular e que favoreça a ligação biológica do pino implantado neste local. Por tal razão o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da hidroxiapatita associada à lignina (HAP-91-L) no processo de integração entre um implante metálico e o tecido ósseo em coelhos adultos da raça Nova Zelândia. O estudo baseou-se na caracterização do tipo de reação que ocorre no local da integração do material, nos tipos de tecido calcificado que participam da integração, nos tipos de células que participam do processo e, ainda, na resistência mecânica existente entre o implante metálico e tecido ósseo. Para tanto, foram empregados recursos clínico - cirúrgicos, radiográficos, histológicos, teste mecânico de tração e difração de Raios X.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Implantes ósseos.

Os biomateriais podem ser definidos como substância, ou a combinação de duas ou mais, de origem natural ou sintética que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos vertebrados (Hench, 2000; Calixto, 2001; Moraes, 2002; Rodriguez, 2004).

O tecido ósseo é considerado ideal para enxertos, uma vez que pode ser transplantado com sucesso de um local doador para um local receptor em um mesmo indivíduo (Moraes, 2002). O enxerto ósseo pode atuar de três maneiras distintas no processo de reparação óssea, sendo elas a osteogênese, a osteoindução e a osteocondução (Moraes, 2002; Fossum, 2002; Piermatei et al., 2006; Vital et al., 2006). Estas características dependem das propriedades físicas e químicas do material, que devem ser compatíveis com as reações fisiológicas do osso (Borges, 1998; Fehlberg, 2001; Monchau et al., 2002). Segundo Moraes (2002). O termo enxerto refere-se à transferência de tecido vivo para um local receptor, enquanto que implante refere-se ao material inanimado. Os implantes podem ser biológicos e não biológicos como os metais, as cerâmicas, os polímeros e combinações destes.

A osteogênese é a diferenciação de células da linhagem osteoblástica em tecido ósseo (Moraes, 2002; Fossum, 2002; Vital et al., 2006). A osteoindução é a capacidade de um biomaterial para recrutar e estimular células primitivas, indiferenciadas e multipotenciais do tecido mesenquimal a se diferenciarem em células osteogênicas (Moraes, 2002; Fossum, 2002; Piermatei et al., 2006; Vital et al., 2006). A osteocondução é o processo no qual o enxerto serve como arcabouço para a deposição de vasos sanguíneos e tecido ósseo.

Quando se implanta hidroxiapatita, para que o processo de osteocondução aconteça, é necessário que haja certo grau de dissolução que provoca o aumento de fosfato e cálcio nas proximidades da biocerâmica. Estes íons se associam com a matriz do osso, participando do crescimento do tecido ósseo (Jaffe e Scott, 1996). A biocerâmica pode ser fagocitada através de atividade osteoclástica e substituição por osso novo (Moraes, 2002; Fossum, 2002; Piermatei et al., 2006; Vital et al., 2006).

Os primeiros biomateriais utilizados para auxiliar a reparação óssea foram os enxertos ósseos do mesmo paciente (osso autólogo), de cadáver da mesma espécie (homólogo) e de outra espécie (heterólogo). Entretanto, devido as características

indesejáveis dos enxertos, tais como: morbidade do sitio doador, possibilidade de infecção, distúrbios sensoriais, limitação por disponibilidade, rejeição, assim como a possibilidade de transmissão de doenças (Damien et al., 1992; Breitbart et al., 1995; Pollick et al., 1995; De vicente et al., 2000; Bruce et al., 2001; Tampiere et al., 2001), têm-se pesquisado diferentes materiais não biológicos que podem ser moldados (implantes aloplásticos), tais como os metais e ligas (titânio, titânio-alumínio-vanádio, cobalto-cromo-molibdênio, ferro-cromo-níquel), as cerâmicas (hidroxiapatita, trifosfato de cálcio, aluminatos de cálcio), os polímeros (silicones, poliamida, ácido glicólico, polipropileno, polimetilmetacrilato, poliuretanas, etc) e as combinações entre eles denominadas de implantes compósitos (Mc Laughlin, 1993; Fitch, 1997; Ayers et al., 1998; Calixto, 2001; Moraes, 2002; Vital et al., 2006).

2.2. Hidroxiapatita como constituinte do tecido ósseo.

As características físicas do osso variam segundo o local, a idade, a alimentação e presença de doenças. Em geral, a fase mineral ou inorgânica constitui 60 a 70% do tecido, a água representa 5 a 8% e a matriz orgânica o restante, sendo 90 a 95% é colágeno e o resto são proteínas não colágenas (Kawachi, et al., 2000).

O componente mineral do osso inclui vários tipos de fosfatos de cálcio hidratados, sendo o mais comum a hidroxiapatita. Esta apatita encontra-se no tecido ósseo como um cristal plano de 20 a 80nm de comprimento e de 2 a 5nm de espessura (Kaplan et al., 1997) e calcula-se que da fração mineral do osso, 65% são de hidroxiapatita (Kawachi et al., 2000; Petit, 2000). Impurezas como carbonato, cloro e flúor podem substituir os grupos fosfato e hidroxila da hidroxiapatita modificando as suas propriedades físicas. Estas impurezas podem ser em consequência a hábitos alimentares e tornam o composto insolúvel (Kaplan et al., 1997; Kawachi et al., 2000; Londoño et al., 2006).

Dentre as características mecânicas da hidroxiapatita destacam-se a rigidez e a dureza, que se misturam com a elasticidade das fibras do colágeno, principal componente orgânico, que dão ao osso propriedades mecânicas tais como manutenção da postura e posicionamento corporal adequados, base da sustentação, proteção de órgãos internos, entre outras (Kay e Cook, 1993; Kawachi, et al., 2000).

Com o desenvolvimento da difração de raios X, confirmou-se em 1.926, que a fase inorgânica do osso era uma apatita (Jaffe e Scott, 1996; Mendoza et al., 2004; Peón et al., 2004; Londoño et al., 2006). A difração de raios-X é a principal técnica analítica

utilizada para identificar fases mineralógicas e para estudar estruturas cristalinas. A técnica faz uso da periodicidade com que os átomos se arranjam ao formar a estrutura cristalina dos minerais e as distâncias entre os planos atômicos que promovem difração dos raios-X. As difrações são facilmente obtidas com o uso dos atuais difratômetros de raios-X. A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio que se cristaliza no sistema hexagonal com parâmetros de rede $a = b = 9,417\text{Å}$ e $c = 6,875\text{Å}$, o que gera picos característicos aos diversos planos atômicos dentro de sua estrutura, conforme mostra a figura 20 (Fonte: Laboratório de mineralogia - Departamento de Solos - UFV).

2.3. Desenvolvimento científico da utilização da hidroxiapatita.

Atribui-se a Albee & Morrison em 1920 (Jaffe e Scott, 1996) a primeira publicação dos resultados da utilização de um composto de fosfato cálcico em forma de pó com o propósito de acelerar o processo de formação de calo ósseo.

Posteriormente, nos anos 70, iniciou-se a utilização da hidroxiapatita em forma sólida na cirurgia dental, por sua capacidade de osseointegração, com a finalidade de aumentar a borda alveolar ou então, preencher lesões periodontais (Jaffe e Scott, 1996; Schmitz et al., 1999). Em 1981, a hidroxiapatita foi comercializada, em forma de grânulos para aplicações em cirurgia maxilofacial (Manley, 1993).

As cerâmicas por apresentarem uma resistência fraca à tensão e ao impacto, são inviáveis como implante para suporte de peso e em preenchimento de cavidades ósseas (Jarcho, 1981; Cook et al., 1988, Borges, 1998; Yasunaga et al., 1999; Rodriguez, 2004; Vital et al., 2006). Furlong e Osborn (1991) trabalharam com implantes dentais metálicos recobertos com uma camada de hidroxiapatita e observaram que houve vantagens sobre aqueles não revestidos (Jaffe e Scott, 1996), inclusive em um ambiente adverso causado pelo pH ácido da saliva (Petit, 2000).

Implantes revestidos com hidroxiapatita foram utilizados experimentalmente em articulações em humanos concluindo que não houve efeitos nocivos. Isto levou a cirurgiões do grupo ARTRO no ano 1986 a implantar as primeiras próteses coxofemorais revestidas com hidroxiapatita (Geesink, R. G. T., de Groot, K. e Klein, C.; citados por Petit, 2000).

Nos Estados Unidos realizaram-se estudos experimentais para determinar as supostas vantagens dos implantes revestidos com hidroxiapatita, e em 1988, a FDA autorizou o desenvolvimento de próteses articulares revestidas com esta biocerâmica (Jaffe e Scott, 1996).

Implantes de titânio têm tido aplicação crescente na odontologia e na ortopedia (Kokubo et al., 2003). Porém eles não são bioativos e por isso têm sido utilizados recobertos com hidroxiapatita, o que lhes confere uma superfície bioativa entre o implante e o tecido ósseo (Kokubo et al., 2003; Porter et al., 2004).

Vidigal Jr e Goisman (2003), utilizando implantes de titânio e implantes de titânio recobertos com hidroxiapatita, observaram que ocorre maior formação de tecido ósseo em torno destes últimos, apresentando uma porcentagem média de contato ósseo em torno de 75,9% enquanto que os implantes de titânio apresentaram aproximadamente 50%.

Os implantes revestidos com hidroxiapatita devem reunir duas condições para que sejam eficazes: O implante deve manter uma estabilidade primária inicial suficiente para que a camada da hidroxiapatita estabeleça uma fixação efetiva com o osso circunvizinho, e a união da hidroxiapatita ao implante deve ser perdurável. A primeira condição se dá, por exemplo, em próteses de articulação coxofemoral pelo desenho do implante que é inserido no osso. A segunda depende de três fatores diferentes: a morfologia da superfície que será revestida, a energia cinética das partículas de revestimento e a ligação química ao substrato. O primeiro fator é de menor importância pelas atuais técnicas de recobrimento. A energia cinética que os sistemas de plasma dão às partículas parcialmente fundidas de hidroxiapatita, assegura uma boa aderência ao substrato metálico. Finalmente, a ligação química ao metal implicaria em uma reação deste com um radical oxigênio da cerâmica (Furlong, 1998). Esta ligação química, defendida por alguns autores (Geesink et al., 1998), se daria especialmente com o titânio e seria a responsável pela ligação da hidroxiapatita com este metal representando uma força de união de um 33% (Jaffe e Scott, 1996).

Cook et al., (1998) comparando histologicamente implantes de titânio poroso com implantes de titânio revestidos de hidroxiapatita demonstraram que nos primeiros, apesar de existir crescimento de osso até o interior dos poros, sempre se observou uma camada fibrosa separando o metal do osso. Nos implantes revestidos com a hidroxiapatita houve uma camada de osso diretamente em contacto com a cerâmica.

Tem-se demonstrado, experimentalmente, que cilindros de titânio revestidos com hidroxiapatita e inseridos no osso de humanos, inclusive em um orifício sobre dimensionado, apresenta uma considerável resistência à tração às 6 semanas de pós-operatório, alcançando o máximo aos 6 meses (Geesink et al., 1998). Outros autores tem comparado a resistência á tração de cilindros de titânio com superfície rugosa revestidos

com hidroxiapatita (Cook et al, 1998) ou com biovidro (López et al, 1997), obtendo valores de resistência à tração de 5 a 7 vezes superiores com a hidroxiapatita. Tisdell et al. (1994) concluíram que os implantes revestidos com hidroxiapatita, comparados com outros de igual desenho, mas não revestidos, apresentaram uma maior força de fixação. Friedman (1992) observou que o tempo que o implante revestido de hidroxiapatita necessitou para alcançar uma adequada fixação ao tecido ósseo foi menor do que aquele gasto quando não houve revestimento.

Estudos mecânicos de extração de implantes recobertos com hidroxiapatita mostraram que a ruptura ocorre no osso (Friedman, 1992), na camada de hidroxiapatita (Augat et al., 1995) ou inclusive na ligação da cerâmica com o metal (Moroni et al., 1992), mas não na interface, ou seja, na junção do osso com a cerâmica, o que demonstra sua biointegração e bioatividade.

2.4. Características da hidroxiapatita sintética (HAP).

A hidroxiapatita natural é o composto cristalino essencial do exoesqueleto dos crustáceos e moluscos e é o principal mineral do osso como do esmalte, cemento e dentina dos dentes (Yasunaga et al., 1999; Ono et al., 2000; Cehreli et al., 2003; Vital et al., 2006). A estrutura química da hidroxiapatita é representada pela fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (fig. 1), com uma relação cálcio/fósforo de 1.65 (Manley, 1993).

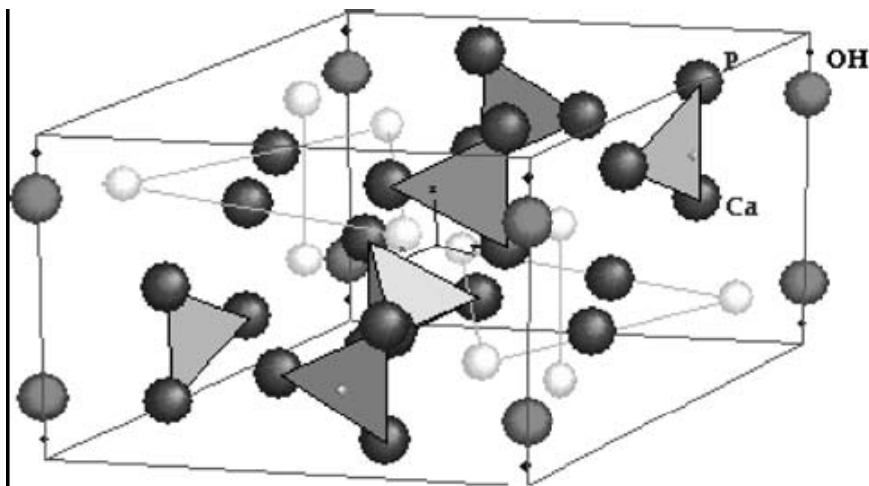


Figura 1. Estrutura de uma molécula de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$. Departamento de Química, Universidade do Estado de Moscú. (Fonte: Londoño et al., 2006).

A hidroxiapatita é um dos biomateriais mais pesquisados e que pode ser obtida de diferentes formas: a partir de corais marinhos, a partir do próprio osso ou sintetizada

em laboratório (Hemmerlè et al., 1997; Ayers et al., 1998; Bostrom, 1998; Schmitz et al., 1999; Franco et al., 2001; Legeros, 2002; Vital et al., 2006). Ela pode ser sintetizada em condições básicas a altas temperaturas ($>1050^{\circ}\text{C}$), resultando em uma boa cristalinidade com cristais grandes ou então, em temperaturas médias ($600-900^{\circ}\text{C}$), apresentando baixa cristalinidade com cristais pequenos. A hidroxiapatita precipitada por via úmida possui características similares às do tecido ósseo e dentário, diferente da hidroxiapatita sintetizada a altas temperaturas (Fulmer et al., 1992). Quando sintetizada em laboratório é livre de impurezas que retardam a osteogênese, além disso, o tamanho, a forma e a porosidade do produto podem ser controlados e predeterminados (Borges, 1998).

As propriedades biológicas da hidroxiapatita sintética (HA ou HAP) são bem documentadas na literatura. Ela já foi utilizada na correção de defeitos ósseos no homem e em várias espécies animais, com resultados satisfatórios o suficiente para ser indicada como alternativa para a enxertia óssea na rotina clínica (Franco et al., 2001; Legeros, 2002; Perez et al., 2005; Vital et al., 2006).

A HAP é biocompatível com o osso pelo fato de possuir a mesma estrutura cristalina, sendo assim considerada como o sólido inorgânico mais importante em biologia (Schmitz et al., 1999; Franco et al., 2001; Legeros, 2002; Vital et al., 2006). A HAP é esterilizável e relativamente não absorvível (Pollick et al., 1995; Ono et al., 2000; Perez et al., 2005.). É vantajosa também pela sua segurança (não é tóxica, nem alergênica ou carcinogênica) e pelo fato de sua microestrutura (tamanho dos poros) ser completamente controlável (Ono et al., 2000; Perez et al., 2005). O tamanho dos poros, sua extensão e a interconectividade entre eles deve permitir a formação de vasos sanguíneos e o crescimento ósseo, levando a uma maior resistência na fixação do conjunto implante-osso (Pollick et al., 1995; Borges et al., 2000; Lopes et al., 2000; Ono et al., 2000; Sakano et al., 2001; Legeros, 2002; Vital et al., 2006).

Para que ocorra a osteocondução existem três requisitos básicos: primeiro, o implante deve estar em aposição direta com o osso hospedeiro; segundo, o osso periférico deve estar viável e terceiro, a interface entre o osso e o implante deve ser estável, ou seja, sem movimentação (Pollick et al., 1995).

Uma hidroxiapatita para implantação deve reunir uma serie de propriedades em quanto à composição, sua morfologia, sua porosidade, sua cristalinidade e tamanho dos cristais e sem presença de impurezas (Parks e Lakes, 1992; Khor et al., 1997; Liu et al., 2003) e pequenas variações podem ocasionar diferentes comportamentos do material

implantado (Ratner, 1996), tanto na sua bioatividade e porcentagem de dissolução como na sua porcentagem de absorção (Fulmer et al., 2002; Londoño et al., 2006). Além das características citadas, outras condições que influenciam a degradação das biocerâmicas são a solubilidade do material, o pH local no meio fisiológico, a desintegração física em partículas menores e, ainda, por fatores biológicos, como a fagocitose, a presença de leucócitos e de mediadores químicos que causam a redução do pH local. A velocidade de absorção pode aumentar com o aumento da área superficial que é dependente da apresentação da partícula. A velocidade de absorção também pode aumentar com o decréscimo da cristalinidade e, no caso da hidroxiapatita, pela substituição de CO_3^{2-} nos sítios de fosfato e por Mg^{2+} , Sr^{2+} nos sítios de cálcio²⁺ (Kawachi et al., 2000).

A degradação da hidroxiapatita *in vivo* acontece por duas vias: dissolução por contato com soluções fisiológicas e fagocitose mediada por células (Jarcho, 1981). A dissolução origina a liberação de partículas de fosfato de cálcio amorfo que são fagocitadas pelos macrófagos ou ficam incorporadas ao osso neoformado. Os macrófagos podem migrar aos gânglios linfáticos regionais com estas partículas, ou as dissolvem, liberando Ca e P ao meio orgânico (Frayssinet et al., 1999). A capacidade dos macrófagos para dissolver partículas cerâmicas tem sido discutida (Bloebaum et al., 1994) e estudos em culturas celulares de monócitos parecem mostrar esta possibilidade (Benahmed et al., 1996). Não se tem observado que as partículas de fosfato de cálcio liberadas, ocasionem a ativação dos osteoclastos e conseguinte citotoxicidade e nem reações de corpo estranho (Frayssinet et al., 1999).

Egglie et al., (1988) comprovaram histomorfometricamente que aos 6 meses após da implantação de cilindros de hidroxiapatita em osso de coelho, a porcentagem de redução do volume dos mesmos foi de 5.4% quando comparado a 85.4% de redução do volume em cilindros de fosfato de tri cálcio em iguais condições. A resistência à degradação da hidroxiapatita tem sido demonstrada também ao utilizá-la como revestimento (Cook et al., 1998). Em um estudo experimental em humanos, Overgaard et al. (1997) demonstraram que os revestimentos de hidroxiapatita se reabsorvem a uma taxa de aproximadamente 20% anual, especialmente nas áreas que entraram em contato com a medula óssea.

Borges et al. (2000) em análises qualitativas em cães observaram também que a hidroxiapatita se degrada, apesar de ser considerada clinicamente não degradável. Segundo Borges (1998), outro fator que influencia sua degradação é a temperatura de sinterização. Pollick et al. (1995) citam outros fatores e que são controlados pelo

hospedeiro, dentre eles destacam-se: o local de implantação e a pressão biomecânica sobre o implante.

Suominen et al. (1996) utilizaram hidroxiapatita em defeitos ósseos provocados cirurgicamente no osso subcondral do fêmur de coelhos e registraram excelente biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade do material utilizado.

Oonishi et al. (1997), ao implantarem hidroxiapatita no fêmur de coelhos, observaram, após três semanas, que houve formação de osso trabecular entre várias partículas do implante.

Nos estudos de Borges (1998), onde se utilizou hidroxiapatita sintética na tíbia de cães, observou-se evolução da reparação óssea sendo que após 120 dias no defeito provocado havia material com características de osso normal.

Yamamoto et al. (2000) usaram hidroxiapatita para preencher cavidades resultantes da exérese de tumores ósseos benignos em 75 pacientes humanos e verificaram que não houve nenhuma reação inflamatória pós-operatória. Em todos os casos foi demonstrado radiograficamente que a hidroxiapatita implantada estava bem incorporada ao tecido ósseo circunvizinho. Avaliações periódicas revelaram que, após algum tempo, as áreas radiopacas haviam desaparecido devido ao desenvolvimento de osso novo. Concluíram que a hidroxiapatita é um substituto efetivo do implante de osso autólogo em cirurgia de retirada de tumores ósseos benignos.

2.5. Hidroxiapatita associada a outros componentes.

Recentemente, alguns compostos de hidroxiapatita com colágeno foram desenvolvidos como biomateriais para a reconstrução óssea por apresentarem uma composição similar a do osso (Rodriguez, 2004). Em estudo utilizando-se hidroxiapatita pura e associada ao lipossoma na tíbia de cães, Franco et al. (2001) observou que o processo de reparação óssea nos animais tratados com os dois tipos de compósitos foi semelhante à dos animais que não receberam tratamento. Entretanto, Franco et al. (2001) e Rodriguez (2004) observaram que a associação da hidroxiapatita com o colágeno retarda o processo de reparação óssea, demonstrando ter menor capacidade osteocondutora do que a hidroxiapatita sintética e em associação com lipossoma.

Nos estudos de Vital (2003), onde se utilizou hidroxiapatita associada ao carbono e ao carbono com fosfato biácido de sódio em ulna de coelhos, constatou-se que ambos os compósitos eram biocompatíveis e possuíam propriedade osteocondutora.

Rodriguez (2004) relatou um aumento na atividade osteocondutora da hidroxiapatita quando esta foi associada ao alandronato de sódio, em estudo de regeneração óssea em radio de cadelas submetidas ou não ovariosalpingohisterectomizadas.

Rivera et al. (2004) em um estudo comparativo em coelhos, utilizaram hidroxiapatita sintética e hidroxiapatita sintética associada à proteína morfogenética óssea (HAP-PMO), não achando diferenças significativas entre os grupos, a pesar de observar-se no grupo tratado com o implante um maior número de células (fibroblastos, osteoblastos e trabéculas) nas primeiras datas de avaliação (terceira e décima segunda semanas).

Carlo (2007) testou em ulna de coelhos polihidroxibutirato associado à hidroxiapatita sintética em diferentes concentrações (10% de HAP-91[®] e 90% de PHB, 25% de HAP-91[®] e 75 % de PHB e 50% de HAP-91[®] e 50% de PHB) observando que os três compósitos tiveram potencial de serem degradados *in vivo*, foram biocompatíveis, osteocondutores e se integraram ao tecido ósseo.

2.6. Hidroxiapatita associada à lignina.

A lignina é um polímero aromático constituído de unidades de fenil-propano que formam um sistema heterogêneo e ramificado sem nenhuma unidade repetidora definida. O sistema é totalmente amorfo e ligado quimicamente às hemiceluloses. O papel biológico da lignina nas plantas vivas é formar, juntamente com a celulose e outros carboidratos da parede celular, um tecido de excelente resistência e durabilidade. A lignina também reduz à permeabilidade da parede celular à água (Sjöström, 1993).

Acredita-se que a associação da hidroxiapatita com a lignina resultaria em um material com maior capacidade de aderência ao osso sem que haja desprendimento de calor, problema que ocorre quando se utilizam outros polímeros (Vital et al. 2006).

Vital et al., (2006) observou biocompatibilidade em seu experimento quando utilizou o compósito de hidroxiapatita sintética associada a 1% de lignina em defeitos ósseos corticais na tíbia de coelhos, não encontrando nenhum tipo de reação inflamatória ou de rejeição no tecido implantado. Além disso, mostrou uma excelente capacidade osteocondutora responsável pela aceleração do processo de regeneração na fase inicial do estudo (aos 15 e 30 dias de sua aplicação).

3. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia deste trabalho utilizando animais experimentais foi analisada pela Comissão de Ética do DVT / UFV, tendo sido aprovada em 03/05/2007 e protocolada como processo n.º 58 /2007.

Neste estudo foram utilizados 20 coelhos machos da raça Nova Zelândia, esqueleticamente maduros à confirmação radiográfica, com idade entre 10 e 12 meses e pesando entre 4-5kg., oriundos do Biotério do Departamento de Veterinária. Tiveram um período de dois meses para aclimação ao novo ambiente, em gaiolas individuais onde receberam uma dose única de ivermectina¹ 0,2 mL a 1% pela via subcutânea, ração comercial duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

A hidroxiapatita sintética (HAP-91²) utilizada, foi produzida por precipitação, após adição, gota a gota, de H₃PO₄ sobre o Ca(OH)₂ obtido a partir da calcinação da calcita e sua posterior hidratação por agitação constante. O precipitado foi calcinado a 900°C. O cálcio da HAP-91 foi determinado por volumetria de oxi-redução e o fosfato pela precipitação com fosfomolibdato de amônio, usando a análise volumétrica e a espectroscopia de UV-V (Borges, 1998). Após este processo, de acordo com o fabricante foi acrescentado à HAP-91 1% de lignina derivada de eucalipto para formar o composto HAP-91-L. Com este material foram, então, obtidos blocos circulares de 4,5mm de diâmetro com peso de 200mg e uma proporção de 99% de HAP-91 e 1% de lignina, para logo serem esterilizados em oxido de etileno a 10% e embalados em material plástico.

No pré-operatório, os animais foram mantidos em jejum hídrico e sólido de 12 horas e receberam 40.000UI/kg de penicilina sódica e procainica³, por via intramuscular, 30 minutos antes da indução anestésica. Posteriormente foram sedados com levomepromazina⁴ na dose de 2mg/kg e anestesiados com tiletamina e zolazepam⁵ na dose de 20mg/kg, ambos também pela via intramuscular. A região dos membros pélvicos, do terço proximal do fêmur até o terço distal da tíbia foi tricotomizada e desengordurada com éter.

¹ Mogimec 1%® - Mogivet produtos agro veterinários Ltda. São Paulo. Brasil.

² HAP 91® - JHS, Laboratório Químico. Sabará. Brasil.

³ Megacilin® - Agener União. Embu- Guaçu, Brasil.

⁴ Neozine® - Sanofi- Aventis. São Paulo, Brasil.

⁵ Zoletil 50® - VIRBAC do Brasil. São Paulo, Brasil.

A anestesia dissociativa se complementou com a técnica epidural lombosacra utilizando-se lidocaína⁶ a 2% em associação com a epinefrina⁷ na dose de 1ml/4Kg. Em seguida os animais foram posicionados em decúbito lateral direito. O preparo do campo operatório foi feito com iodopovidona⁸ a 10% sendo isolado com faixa esterilizada e delimitado com panos de campo apropriados. A abordagem cirúrgica foi baseada na técnica descrita por Piermattei et al. (2006) para cães e gatos e adaptada para coelhos que constou dos seguintes tempos cirúrgicos:

- Incisão cutânea parapatelar lateral do terço distal do fêmur até a diáfise proximal da tíbia (Fig. 2A).
- Incisão do tecido subcutâneo na mesma linha que a incisão cutânea (Fig. 2A).
- Incisão da fáscia lata na mesma linha que a incisão do tecido subcutâneo (Fig. 2A).
- Debridamento da musculatura craniolateral da tíbia e afastamento caudal da mesma (Fig. 2B).
- Incisão sobre o perióstio na superfície lateral da porção proximal da tíbia estendendo-se até o fim da crista tibial.

Posteriormente foi realizada em todos os animais um defeito circular na parte central da face lateral proximal da tíbia, a 2cm do platô tibial, de aproximadamente 4mm de diâmetro e profundidade suficiente para atingir o canal medular, com o auxílio de uma furadeira manual e broca de igual diâmetro (Fig. 2C e 2D).

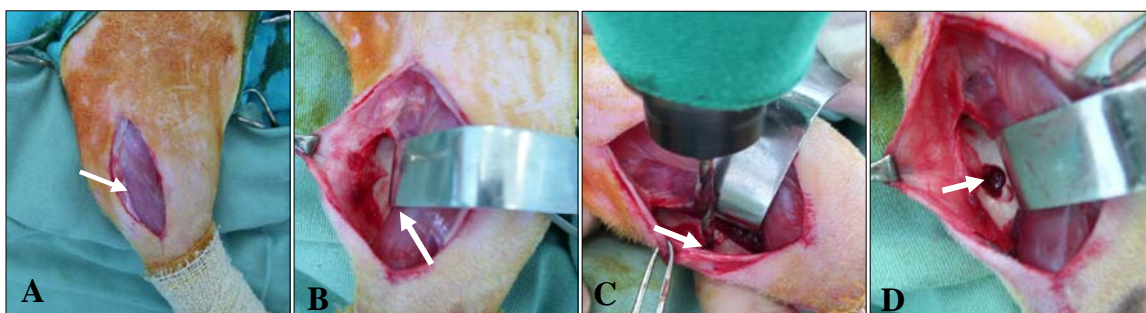


Figura 2. Fotografias do procedimento cirúrgico na tíbia de coelhos ilustrando: A) Incisão da pele, tecido subcutâneo e fáscia lata (seta); B) Afastamento caudal da musculatura craniolateral da tíbia (seta); C) Local da confecção do defeito ósseo (seta); D) Falha óssea tibial experimental (seta).

⁶ Lidocaína 2%® - Hipolabor. Sabará, Brasil.

⁷ Adren® - Hipolabor. Sabará, Brasil.

⁸ Benadine Schering – Plough Veterinária. São Paulo, Brasil.

Em um mesmo animal considerou-se a tíbia esquerda como tratada com o compósito HAP-91-L e a tíbia direita como controle.

No grupo tratado foi introduzido pelo defeito cortical um pino intramedular de Schanz em aço F 138⁹ de calibre de 1mm com o intuito de descolar a medula óssea para facilitar sua retirada, como também para irritar o endóstio por meio de movimentos de fricção repetitivos. Ainda, para favorecer a retirada da medula óssea se injetaram 10cm de ar dentro do canal medular com o auxílio de uma seringa descartável e um cateter vênular de calibre 16 (Fig. 3A), retirando-a na maior quantidade possível.

Em um recipiente, cinco comprimidos do compósito HAP-91-L (1000mg) foram amolecidos com solução fisiológica 0,9% numa relação de duas gotas por comprimido, resultando uma massa que se utilizou para revestir a rosca do pino intramedular de Schanz em aço F 138 de tamanho 2.5mm, onde a quantidade se determinou como aquela que se precisava para que a rosca não fosse visível, logo deixando secar por 10 minutos ao ambiente. Ao resto da massa adicionou-se solução fisiológica ao 0,9% em quantidade suficiente para completar um volume de 2mL, sendo logo introduzida no canal medular por meio de seringa e cateter calibre 16 (Fig. 3B). O comprimento do pino foi medido, por meio da radiografia prévia da tíbia, do local determinado para se fazer o defeito até a epífise distal tibial, mantendo um comprimento de 7cm em todos os animais. Logo após o pino ter sido cortado, ele foi introduzido pelo defeito cortical e o seu calibre foi suficiente para ocupar aproximadamente 90% da cavidade medular (Fig. 3C). Na introdução do pino foi inevitável a formação de uma falha longitudinal de aproximadamente 2mm de comprimento na borda dorsal do defeito cortical, o que não permitiu uniformidade das lesões ósseas provocadas neste local. Em seguida, o mesmo compósito em forma de bloco foi utilizado para preencher o defeito ósseo (Fig. 3D). Devido à presença de uma falha na borda dorsal do defeito em todos os animais, adotou-se o critério de empregar a quantidade de compósito necessária para o preenchimento do defeito ósseo (400mg de compósito/falha óssea). Os tecidos periosteal e subcutâneo foram aproximados por planos utilizando fio de sutura não-absorvível de náilon¹⁰ com padrão de sutura contínua simples e a pele em padrão interrompido simples com o mesmo material.

⁹ Kalmedica Ltda. Belo Horizonte, Brasil.

¹⁰ Monofilamento preto náilon 3-0. Technofarma Brasileira. São Paulo, Brasil.

O grupo controle foi submetido aos mesmos procedimentos que o grupo tratado, com exceção da introdução do compósito de HAP-91-L no canal medular e no defeito cortical. Desta forma o espaço entre o pino intramedular e endósteo foi preenchido apenas pelo coágulo que se formou normalmente.

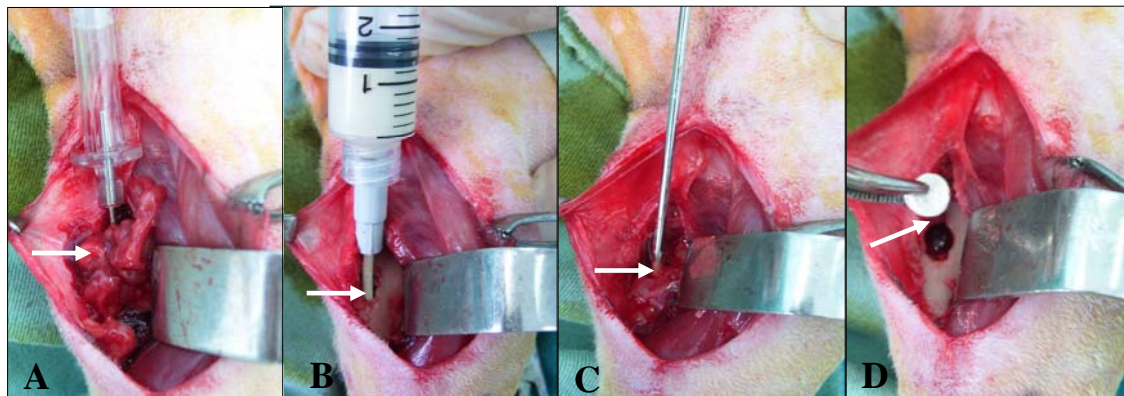


Figura 3. Fotografias do procedimento cirúrgico na tíbia de coelhos ilustrando: A) Retirada da medula óssea com injeção de ar (seta); B) Introdução da hidroxiapatita sintética-lignina no canal medular por meio de um cateter vênular (seta); C) Introdução do pino intramedular de 2,5mm de diâmetro em direção ao canal medular (seta); D) Preenchimento do defeito ósseo tibial com o compósito de hidroxiapatita sintética-lignina (seta).

No pós-operatório os animais foram submetidos a anti-sepsia da ferida cirúrgica durante 10 dias com solução iodada a 1%. Receberam morfina¹¹ 3mg/kg a cada 12 horas durante dois dias pela via subcutânea e 40.000 UI/kg de penicilina sódica e procainica a cada 24 horas durante dois dias por via intramuscular como analgésico e antibiótico terapêutico, respectivamente.

Para avaliação clínica os animais foram observados por 15 dias, onde se avaliou o grau da claudicação, a dor, o edema, a presença e a ausência de secreção purulenta e deiscência da ferida. O grau da claudicação na marcha foi avaliado considerando como grau 0 quando o animal não claudicava; grau I (claudicação moderada) quando o animal apoiava na planta do pé, ainda considerou-se que a passada apresentava uma amplitude reduzida pela metade quando comparada à passada de um animal sadio, em vista lateral e grau II (claudicação intensa) quando o apoio se dava em abdução com sustentação de peso no membro contra lateral e nos membros anteriores.

Para se avaliar a dor e o desconforto dos animais, procedeu-se à palpação da área operada com as seguintes observações: na ausência da dor, classificada como grau 0, o animal não demonstrou nenhum tipo de reação ao toque digital da área operada. O grau

¹¹ Dolo moff injetável 10mg/ml - União Química. Pouso Alegre, Br.

I se deu para aqueles animais que manifestaram dor caracterizada pela presença de alguns sinais como vocalização, dilatação pupilar e /ou aumento dos movimentos respiratórios sem retração do membro pélvico após o toque digital e grau II quando além das características da dor grau I, o animal puxava a extremidade ao toque digital, mostrava-se indiferente ao ambiente e sem interesse pelo alimento. Ainda, como os dois membros foram operados, o membro pélvico mais dolorido foi caracterizado por uma linha articular tíbio-tarsiana discretamente mais elevada que a do seu antímero.

Para determinar o aumento e diminuição de edema se mediu a circunferência da região tibial com o auxílio de uma fita métrica no ponto meio entre as articulações do joelho e a articulação tíbio-tarsal.

Os resultados da claudicação, da dor e circunferência da diáfise da região tibial foram interpretados comparando cada data de observação entre os grupos tratados e controle com a análise estatística realizada pelo teste de Friedman, significância fixada em $p < 0,05$. A evolução foi analisada, comparando as datas dentro de cada grupo pelo teste de Dunn's, também com significância estatística fixada em $p < 0,05$. O comportamento das médias da claudicação e da circunferência da diáfise da região tibial para ambos os grupos foram representados por meio de uma linha de tendências.

A deiscência da ferida e a secreção purulenta foram analisadas descritivamente e classificadas como ausente ou presente.

Para análise radiográfica do defeito cortical e da superfície ao redor do pino intramedular foram realizadas radiografias da região tibial nas projeções mediolateral e craniocaudal em todos os animais, imediatamente após a cirurgia e aos 8, 30, 60, 90 e 120 dias do pós-operatório, visando à comparação entre o osso controle e o osso tratado com o compósito. A técnica radiográfica foi padronizada (45 Kv, 100 mA e 0,03s) e as radiografias analisadas quanto à radiopacidade classificando-as visualmente em diferentes graus (Tab. 1 e 2), sempre comparando a falha óssea e a superfície ao redor do pino com o osso circunvizinho. Os resultados foram interpretados comparando cada data de observação entre os grupos tratados e controle com análise estatística realizada pelo teste de Friedman, significância fixada em $p < 0,05$. As datas dentro de cada grupo foram analisadas pela análise de variância, também com significância estatística fixada em $p < 0,05$.

Tabela 1. Classificação do grau de radiopacidade ao redor do pino intramedular na tíbia de coelhos do grupo controle e do grupo tratado com hidroxiapatita sintética–lignina.

<i>GRAU</i>	CARACTERIZAÇÃO RADIOGRAFICA
0	Radiopacidade ao redor do pino intramedular menor que a do osso circunvizinho.
1	Radiopacidade ao redor do pino intramedular semelhante à do osso circunvizinho.
2	Radiopacidade ao redor do pino intramedular discretamente maior que a do osso vizinho e menor que a correspondente do compósito.
3	Radiopacidade ao redor do pino intramedular intensamente maior que a do osso circunvizinho.

Tabela 2. Classificação do grau de radiopacidade na região da falha óssea tibial de coelhos do grupo controle e do grupo tratado com hidroxiapatita sintética–lignina.

<i>GRAU</i>	CARACTERIZAÇÃO RADIOGRAFICA
0	Radiopacidade intensamente menor do que a cortical do osso circunvizinho.
1	Radiopacidade discretamente menor do que a cortical do osso circunvizinho.
2	Radiopacidade semelhante à cortical do osso circunvizinho.
3	Radiopacidade maior do que a cortical do osso circunvizinho.

Nas mesmas datas de observação radiográfica 4 coelhos foram eutanasiados com super dosagem de tiopental sódico por via intravenosa após a tranquilização com levopromacina por via intramuscular. Posteriormente avaliou-se macroscopicamente a região trabalhada cirurgicamente, se obteve a amostra histológica da falha cortical tibial e realizou-se o teste mecânico de tração e a difração de raio X.

Se mediu o diâmetro do defeito cortical tibial com o auxílio de uma régua milimetrada em ambos os grupo, sempre em sentido transversal ao eixo longitudinal da tíbia, sendo classificado em três graus (Tab. 3) de acordo com o preenchimento do defeito considerando como grau I quando o preenchimento estava entre 0 e 33%, grau II quando estava entre 34 e 66% e grau III entre 67 e 100%.

Tabela 3. Classificação em graus do diâmetro (mm) do defeito experimental cortical tibial de coelhos.

GRAU	DIÂMETRO TRANSVERSAL DO DEFEITO CORTICAL TIBIAL
I	Quando o diâmetro transversal do defeito medeu entre 2.7 e 4 mm com um preenchimento do defeito com tecido novo entre 0 a 1.3 mm.
II	Quando o diâmetro transversal do defeito medeu entre 1.4 e 2.6 mm com um preenchimento do defeito com tecido novo entre 1.4 a 2.6 mm.
III	Quando o diâmetro transversal do defeito medeu entre 0 e 1.3 mm com um preenchimento do defeito com tecido novo entre 2.7 a 4 mm.

Para realização do teste mecânico de tração, foram utilizadas as tíbias dos animais aos 8, 30, 60, 90 e 120 dias, as quais foram mantidas imersas em solução salina a 0,9%, à temperatura constante de 37°C (Sasaki, et al., 2000; Miranda, et al., 2006). Estas foram seccionadas com cerra manual elétrica, visando à remoção da epífise proximal para que ficasse exposto 1cm do pino intramedular de tal forma que o conjunto tibia-pino apresentasse 7cm de comprimento com espessura própria da tibia. Para acoplamento da amostra ao mordente inferior da Máquina Universal de teste de tração foi necessário fazer um molde, utilizando-se um cilindro de PVC de 2,5 polegadas e 6cm de comprimento furado em sua metade para que permitisse a introdução da epífise distal da tibia, que foi, então, fixada com resina acrílica ativada quimicamente (metilmetacrilato¹²) (Fig. 4).

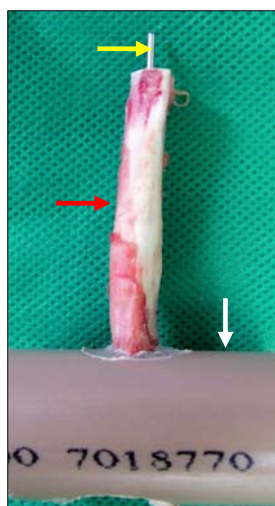


Figura 4: Fotografia do molde de PVC com uma amostra tibia-pino intramedular de coelho em posicionamento vertical. Seta amarela: pino intramedular; seta vermelha: tibia de coelho; seta branca: cilindro de PVC.

¹² JET® - Clássico LTDA - São Paulo, Brasil.

Os corpos de prova foram colocados verticalmente na máquina de ensaios universal, de tal forma que 1cm do pino intramedular permanecesse fixado ao mordente superior e o dispositivo de PVC fosse adaptado ao mordente inferior, havendo assim o encaixe de cada amostra (Fig. 5). Ato contínuo, cada um dos corpos de prova, tratado e controle, foram submetidos ao teste de tração a uma força inicial de aproximadamente 25gr e uma velocidade de deslocamento constante de 1mm/minuto até a soltura do pino.

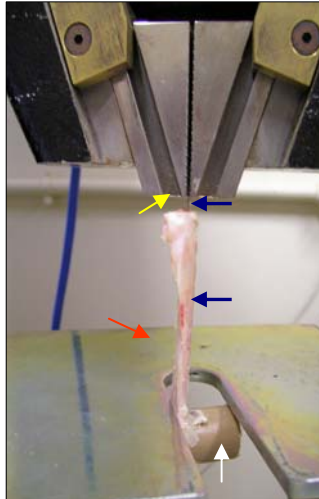


Figura 5: Fotografia do acoplamento da amostra tibia-pino intramedular de coelho (seta azul) no mordente superior (seta amarela) e no mordente inferior (seta vermelha) da máquina universal para realização do teste mecânico de tração. Molde de PVC (seta branca).

Os resultados do teste mecânico de tração foram interpretados comparando cada data de sacrifício entre os grupos tratados e controle, com análise estatística realizada pelo teste de Friedman, significância fixada em $p < 0,05$. O incremento da força com a evolução do tempo foi analisado, comparando as datas dentro de cada grupo pelo teste de Dunn's, também com significância estatística fixada em $p < 0,05$. O comportamento das médias para ambos os grupo foram representados por meio de uma linha de tendências.

Para a avaliação macroscópica do canal medular foi necessário um corte longitudinal de todas as tíbias com cerra manual elétrica onde um observador determinou a cor e distribuição da medula óssea, além da distribuição do compósito, sendo os resultados apresentados por meio de uma avaliação descritiva.

As características observadas no material aderido na rosca do pino de todas as tíbias em ambos os grupos, foram a cor (metálico, vermelho, esbranquiçado e escuro) e

a visibilidade do fundo e de sua superfície, também sendo os resultados apresentados por meio de uma avaliação descritiva.

A medição do material aderido na rosca do pino intramedular foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital e os resultados foram interpretados comparando cada data de observação entre os grupos tratados e controle, com análise estatística realizada pelo teste de Friedman, significância fixada em $p < 0,05$. A comparação das datas dentro de cada grupo foi analisada pelo teste de Dunn's, também com significância estatística fixada em $p < 0,05$. O comportamento das médias para ambos os grupo foram representados por meio de uma linha de tendências.

Com o objetivo de determinar a natureza (orgânica ou inorgânica) do tecido presente na superfície rosqueada dos pinos intramedulares e nos canais medulares das tíbias dos coelhos aos 8, 30, 60, 90 e 120 dias, se utilizou o teste de difração de Raios X (DRX). Para tal, foi necessário a secagem das tíbias em estufa elétrica a 70°C por 72 horas, para posterior retirada por raspado do material contido no canal medular e na superfície rosqueada do pino. Este material foi moído para ser reduzido a partículas menores e colocado em uma lamina de vidro escavada. Com o propósito de evitar perdas de material se adicionou cola comercial que permaneceu por 12 horas em temperatura ambiente para secagem. Após este período, foi realizado o teste de DRX num difratômetro da marca Rigaku D-Max modelo Geiger Flex equipado com tubo de cobalto (radiação $\text{Co-K}\alpha$, $\lambda = 1,79026 \text{ \AA}$), com um monocromador de cristal curvo de grafite no feixe difratado, operado com uma diferença de potencial de 40 kV e uma corrente elétrica de 30 mA. As varreduras foram realizadas no modo passo a passo em intervalo de 15 a 50° 2θ com 0.05° de incremento e 2 segundos de contagem de tempo em cada passo. Este procedimento foi conduzido nas amostras dos grupos controle e tratado. Os resultados obtidos dos difratogramas foram apresentados por meio de gráficos e análise descritiva.

Para análise histológica, das tíbias tratadas e controle, foi removido um bloco de 2cm de largura e 0.5 cm de comprimento de modo a ser obtida a região do defeito provocado na cortical para introdução do pino, contendo também o compósito.

As amostras foram fixadas em formol 10% tamponado por um tempo aproximado de 20 dias. Completada a fixação, as amostras foram descalcificadas em ácido fórmico a 10% tamponado com citrato de sódio para pH 4,5 sob vácuo moderado por aproximadamente 25 dias. A seguir, as amostras foram lavadas em água corrente e então desidratadas em álcool etílico a 70, 80, 90 e 100% durante 24 horas em cada

etapa. Após, foram diafanizadas em 2 banhos de xilol por 30 minutos cada e embebidas em parafina em estufa a 58°C por 1 hora. A seguir, cortes de 7µm foram obtidos em micrótomo rotativo e montados em lamínas de vidro. De cada bloco de parafina foram obtidos pelo menos dois cortes histológicos, que foram então submetidos às técnicas de coloração pela Hematoxilina-Eosina e Tricomico de Gomori, visando a análise em microscópio óptico.

Os resultados histológicos foram interpretados e apresentados por análise descritiva avaliando-se a regeneração tecidual com base na proliferação e diferenciação celular no tecido cicatricial, de neoformação óssea, integração da hidroxiapatita sintética ao novo osso e de maturação do osso neoformado, regeneração da medula óssea e a fagocitose do compósito testado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação Clínica trans e pós-operatória.

Durante o período trans-operatório, após a confecção do defeito ósseo tibial, evidenciou-se hemorragia em todos os locais intervindos, mas a hemostasia por compressão, indicada por Borges (1998) e Rezende et al. (1998) foi mais eficiente nas tíbias usadas como controles que para as tratadas com o compósito. Seis tíbias do grupo tratado apresentaram hemorragia leve no local cirúrgico ao final do procedimento sendo o sangramento contido com a simples sutura dos tecidos incisados, não sendo necessário o uso de bandagem compressivo em nenhum deles. Este fato também foi observado por Rodriguez (2004) e Vital et al. (2006), em trabalhos realizados em cadelas e coelhos respectivamente; não sendo necessário o uso de bandagem compressivo em nenhum animal.

Às 24 horas após a cirurgia nenhum dos animais apresentou propriocepção normal, fato que difere do reportado por Borges (1998); Rezende et al. (1998); Franco et al. (2001) e Vital et al., (2006) que observaram em todos os animais deambulação normal (apoio normal do membro operado). Possivelmente este fato se deveu ao tipo de técnica anestésica empregada nos diferentes experimentos, uma vez que a anestesia epidural lombosacra realizada neste experimento, pode ter sido responsável pelo retardo do retorno à propriocepção normal. Isto levou a decisão de iniciar a avaliação pós-operatória após 48 horas do término da cirurgia para evitar falsos diagnósticos.

4.1.1. Avaliação da claudicação

Ambos os membros foram avaliados diariamente do segundo ao 15º dia após a cirurgia. Durante este período, todos os 20 animais apresentaram claudicação grau I no membro controle e 18 no membro tratado com tendência a regredir para grau 0. Os animais restantes tiveram claudicação grau II (5%), sendo que em um deles acredita-se que foi em consequência a um processo infeccioso dos tecidos moles com evolução para formação de abscesso subcutâneo e muscular e no outro animal pela rejeição do náilon utilizado para a sutura, caracterizada pela formação de tecido com características macroscópicas granulomatosas, mesmo assim, em nenhum destes animais notou-se comprometimento ósseo.

Nos primeiros cinco dias pós-operatório, 95% dos animais operados apresentaram claudicação grau I e o 5% restante, claudicação de grau II, iniciando-se a regressão da mesma a partir do sexto dia, sendo que no décimo terceiro dia apenas três membros tratados (15%) e um controle (5%) apresentaram claudicação de grau I. Este fato difere de Borges (1998); Rezende et al. (1998), Franco et al. (2001) e Vital et al., (2006), que observaram apoio normal dos membros operados poucas horas após da cirurgia.

Ao final do período de observação, todos os animais apresentaram recuperação do processo claudicante com exceção de um coelho que apresentou claudicação de grau I na extremidade pélvica tratada. Não houve diferença perceptível entre os animais dos dois grupos o que sugere possível biocompatibilidade do implante, demonstrada também por Vital et al., (2006).

A análise estatística indicou que não se apresentaram diferenças entre o grupo tratado e o controle. Comparando as datas de observação dentro de um mesmo grupo não houve diferença desde o primeiro ao quinto dia de avaliação, nem do sexto ao décimo quinto dia, de acordo com o teste de Dunn's.

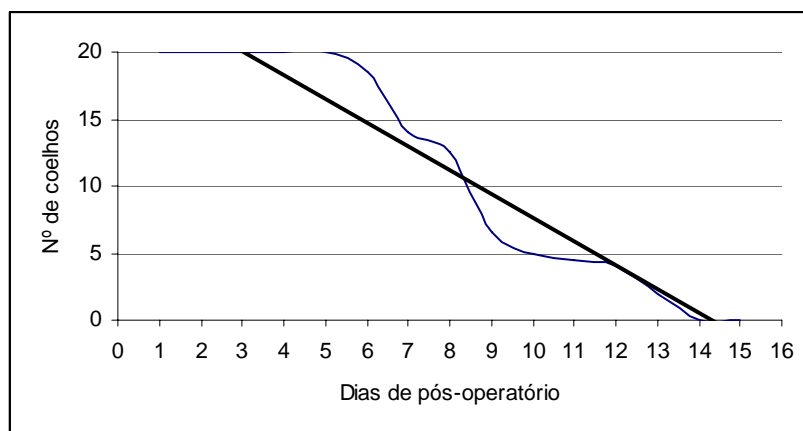


Figura 6. Linha de tendências da claudicação dos coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina e do grupo controle, avaliados clinicamente num período de 15 dias de pós-operatório.

A tendência da claudicação dos membros pélvicos nos animais da experimentação, tal como se mostra na figura 7, seguiu um comportamento linear decrescente em função do tempo, explicado pela seguinte equação linear:

$$y = - 1.7679x + 25.276 \quad (R^2 = 0.9282)$$

Onde:

y = numero de coelhos claudicantes

x = unidades em dias.

O coeficiente de determinação indicou que este comportamento da claudicação dos membros pélvicos dos coelhos no período do tempo estudado para ambos os grupos, esta explicado em 92% pela equação linear anterior (Fig. 6).

4.1.2. Avaliação da dor

Todos os animais operados apresentaram dor de grau I à palpação digital na área operada até o segundo dia de avaliação. A partir do terceiro dia houve diminuição gradativa, não se manifestando mais no dia 11 em ambos os grupos. Somente em um animal do grupo tratado se intensificou a dor, evoluindo de grau I para grau II, o que continuou até após do termino do período de avaliação (Tab. 4), possivelmente pela mesma causa que ocasionou a claudicação de grau I.

Tabela 4. Número de coelhos classificados (graus) de acordo com a dor à palpação digital durante o exame clínico no pós-operatório de 15 dias, onde G.T. e G.C. representam o grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina e o grupo controle, respectivamente.

DIAS DE PÓS-CIRÚRGICO	GRAU I		GRAU II	
	GT	GC	GT	GC
1	20	20		
2	20	20		
3	18	19		
4	16	17		
5	14	15		
6	11	13		
7	8	9		
8	4	5		
9	1	1		
10	1	1		
11	1	0		
12		0	1	
13		0	1	
14		0	1	
15		0	1	

A análise estatística indicou que não houve diferenças entre o grupo tratado e o controle. Comparando os dias de pós-operatório dentro de um mesmo grupo não houve diferença desde o primeiro ao sétimo dia de avaliação, e nem do oitavo ao décimo quinto de acordo com o teste de Dunn's. Como não houve diferença entre os grupos é

indicativo que o compósito não comportou-se como corpo estranho ou não gerou citotoxicidade no local.

4.1.3. Avaliação da circunferência tibial

A circunferência tibial serviu para determinar o aumento e diminuição de volume na medida em que o processo cicatricial evoluiu. O ponto para a medição correspondeu à diáfise da região tibial, sendo a média pré-cirúrgica de 8,07cm para ambos os grupos. O processo inflamatório se deu dentro de condições fisiológicas, já que o primeiro dia de avaliação pós-cirúrgica (48 horas após) revelou aumento máximo de 8,8cm, regredindo com o passar do tempo até alcançar a completa normalidade no dia 14. A análise estatística indicou que não se apresentaram diferenças entre o grupo tratado e o controle. Comparando as datas de observação dentro de um mesmo grupo não houve diferença do segundo ao quinto dia de avaliação, tal como o registra a figura 7.

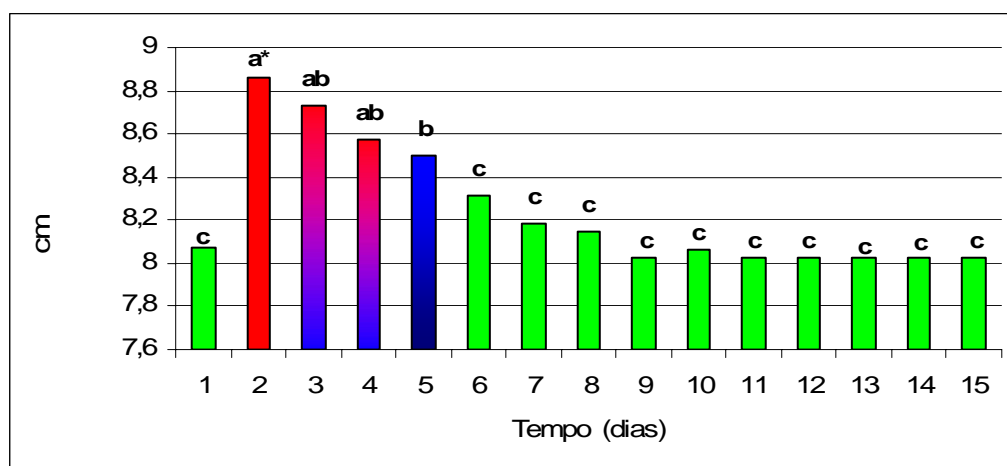


Figura 7. Representação gráfica das médias da circunferência da diáfise região tibial (cm) dos coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina e do grupo controle, avaliados clinicamente num período de 15 dias de pós-operatório.

* Colunas com uma mesma letra ou colunas que compartilham a cor nos dias do pós-operatório em ambos os grupos, são iguais de acordo ao teste de Dunn's (5%).

A tendência da circunferência da região tibial, tal como se mostra na figura 8, seguiu um comportamento linear decrescente em função do tempo, explicado pela seguinte equação quadrática;

$$y = 0,0082X^2 - 0,1849X + 9,0269 \quad (R^2 = 0,99)$$

Onde:

y = Média da diáfise da região tibial em cm

x = unidades em dias.

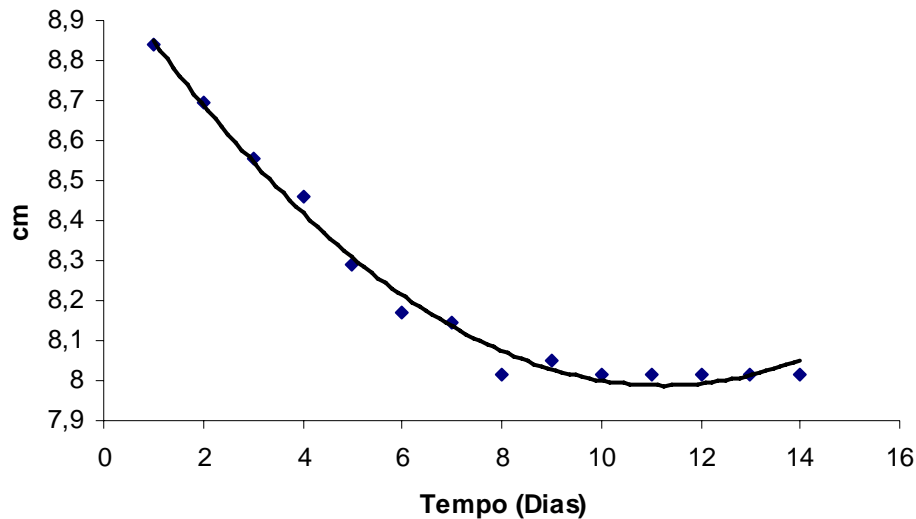


Figura 8. Linha de tendências da diáfise da região tibial (cm) de coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina e do grupo controle, avaliados clinicamente num período de 15 dias de pós-operatório.

O coeficiente de determinação indicou que este comportamento da circunferência da diáfise da região tibial no período de tempo estudado para os dois grupos, está explicado em 99% pela equação quadrática anterior (Fig. 8). A tendência do edema a desaparecer está de acordo com a observação clínica de Borges (1998) e Vital et al., (2006) que não reportaram diferença entre os grupos testados. Isto sugere que o edema presente no processo inflamatório pós-cirúrgico da diáfise da região tibial, regrediu no mesmo período de tempo para os dois grupos, sugestivo de que o composto não influenciou negativamente na resposta inflamatória. A similaridade química entre a hidroxiapatita e o tecido ósseo, provavelmente, contribuiu para isso.

4.1.4. Deiscência da ferida

Em nove membros operados ocorreu deiscência da ferida (22,5%), dos quais cinco (55%) eram do grupo tratado e quatro do grupo controle (44%), sendo que em todos eles apresentou-se secreção purulenta procedente dos tecidos moles mais superficiais e com tendência a desaparecer no final da avaliação clínica. Estes resultados se assemelham aos obtidos por Vital et al., (2006) e diferem dos descritos por Moraes

(2002) e Cehreli et al. (2003), que não observaram estes sinais no pós-operatório. Pelo fato de que tanto em animais do grupo controle quanto naqueles do grupo tratado terem apresentado sinais locais de deiscência da ferida com infecção, pode-se inferir que se deveu provavelmente ao local da cirurgia, onde as tensões pelos movimentos de flexão e extensão tanto na estática como na dinâmica causaram a deiscência da ferida com posterior complicação infecciosa do local cirúrgico, e não a uma possível reação ao compósito. Embora, um dos animais do grupo tratado apresentou reação do tipo corpo estranho em resposta ao fio de sutura (náilon) utilizado, então o qual foi demonstrado ao se retirar o fio de náilon, quando sua cicatrização ocorreu no dia 21.

4.2. Avaliação da região tibial trabalhada cirurgicamente.

4.2.1. Avaliação macroscópica e medição do defeito cortical tibial.

O processo de reparação óssea no defeito cortical tibial foi crescente e se deu em dois sentidos: da borda para o centro e do fundo para a superfície do defeito, apresentando medição e coloração característica, em cada grupo e data de avaliação conforme acontecia o aparecimento de tecido novo. Aos 8 dias após a cirurgia, quatro defeitos nas tíbias tratadas (100%) e três defeitos nas tíbias controle (75%) estavam dentro da categoria de grau I (descrito na metodologia para a reparação do defeito cortical tibial) e o quarto defeito tibial controle (25%) estava dentro da categoria de grau II (Tab. 5).

Tabela 5. Número de coelhos classificados (graus) de acordo ao diâmetro do defeito cortical tibial avaliados aos 8, 30, 60, 90 e 120 dias após as cirurgias, onde G.T. e G.C. representam o grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina e o grupo controle, respectivamente.

<i>DIAS DE AVALIAÇÃO APÓS DA CIRURGIA</i>	<i>GRAU I</i>		<i>GRAU II</i>		<i>GRAU III</i>	
	<i>(4 - 2.7 mm)</i>		<i>(2.6 - 1.4 mm)</i>		<i>(1.3 - 0 mm)</i>	
	<i>G.T.</i>	<i>G.C.</i>	<i>G.T.</i>	<i>G.C.</i>	<i>G.T.</i>	<i>G.C.</i>
8	4	3	0	1	0	0
30	2	0	2	0	0	4
60	1	0	3	0	0	4
90	1	0	0	0	3	4
120	1	0	0	0	3	4

Quanto à cor, observou-se nos defeitos nas tíbias tratadas uma coloração branca amarelada própria do compósito em quase sua totalidade, com uma pequena distribuição de coloração avermelhada sobre a superfície do compósito. Para os defeitos das tíbias controle, a cor característica foi a vermelha, que ocupou a totalidade do defeito (Fig. 9).

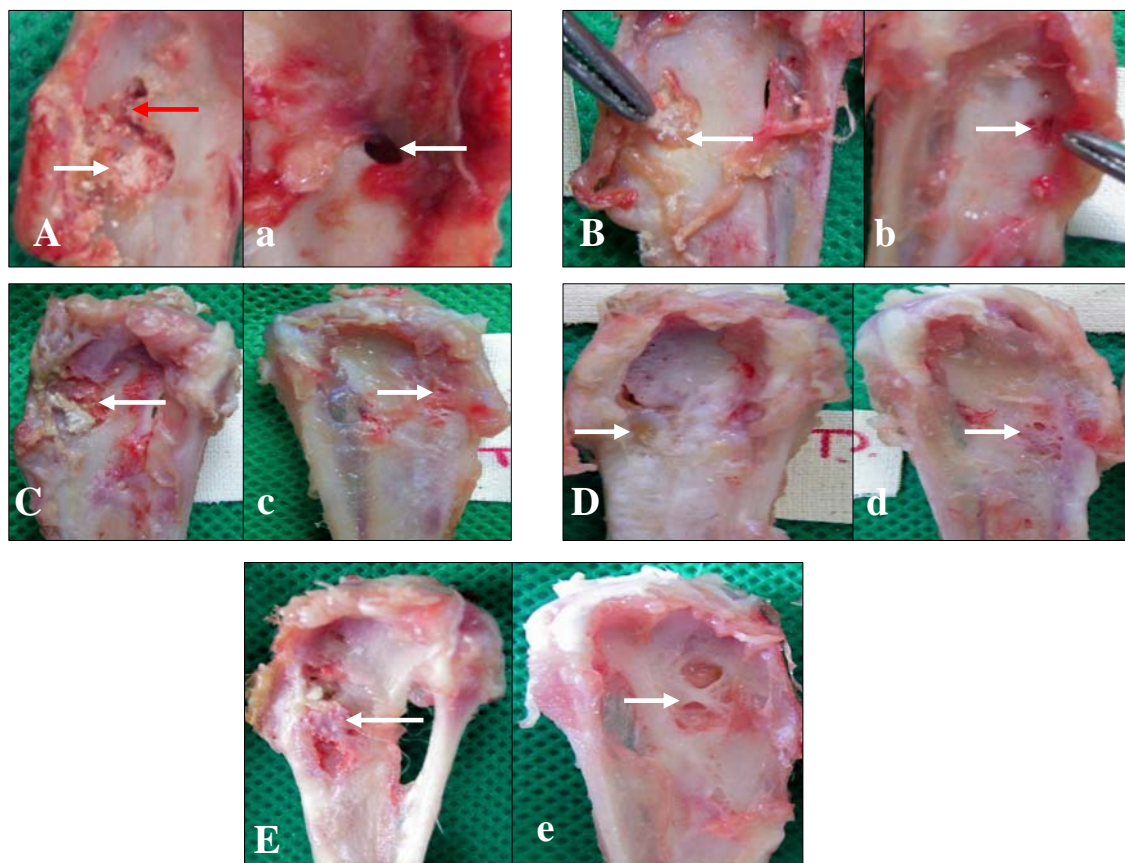


Figura 9. Fotografias da epífise proximal das tíbias de coelhos com o defeito cortical ilustrando seu preenchimento e sua coloração nos diferentes dias da avaliação (seta branca)- “A, B, C, D, E” aos 8, 30, 60, 90 e 120 dias, respectivamente, após as cirurgias no grupo tratado com hidroxiapatita sintética–lignina e “a, b, c, d, e” aos oito, 30, 60, 90 e 120 dias, respectivamente, após as cirurgias no grupo controle. Seta vermelha indica a falha longitudinal de aproximadamente dois mm de comprimento na borda dorsal do defeito cortical.

Aos 30 dias após a cirurgia, dois defeitos tibiais tratados eram de grau I (50%) e os dois restantes eram de grau II e todos os defeitos tibiais controle estavam dentro da categoria de grau III (Tab. 5). Quanto à cor, em um dos defeitos tratados se observou uma coloração amarelo cartilagem concentricamente, que invadiu o compósito em 50% o que sugere um possível processo reparativo. Para os defeitos das tíbias controle a

coloração foi amarelo cartilagem em dois casos e branco osso para os restantes, apresentando preenchimento do defeito quase em sua totalidade (Fig. 9).

Aos 60 dias após as cirurgias, um defeito tibial tratado foi categorizado de grau I e os outros três eram de grau II; e o grupo controle apresentou o mesmo quadro que aos 30 dias (Tab. 5). Quanto à cor, três dos defeitos tibiais tratados apresentaram uma coloração branco osso concentricamente que invadiam a coloração branca amarelada do compósito em 50%. No defeito tibial restante se observou coloração avermelhada que invadiu o compósito. Para as tíbias controle a coloração foi branco osso e observou-se preenchimento completo do defeito (Fig. 9). Assim, acredita-se que os fatores inerentes à técnica, citados por Cook et al. (1998) e Damiem et al. (1992), capazes de influenciar negativamente a neoformação óssea, não alteraram, macroscopicamente, o processo de reparação óssea.

Aos 90 dias após as cirurgias, um defeito tibial tratado era de grau I, os três restantes estavam dentro da categoria de grau III e todos os defeitos controle estavam dentro da categoria grau III (Tab. 5). Os defeitos das tíbias controle apresentaram preenchimento completo do defeito, tal como se apresentou na figura 9. Quanto à cor, em todos os defeitos tibiais tratados observou-se coloração branco osso em quase à totalidade do defeito, o que sugeri uma substituição do compósito pelo tecido ósseo novo (Fig. 9).

Aos 120 dias após as cirurgias, um defeito tibial tratado era de grau I e os três restantes estavam dentro da categoria de grau III (Tab. 5). Os defeitos das tíbias controle apresentaram preenchimento completo do defeito. Quanto à cor do grupo tratado, em um animal observou-se coloração amarelada do compósito com um halo de coloração amarela cartilagem e para o resto a coloração foi branco osso (Fig. 9).

Na análise estatística entre os dias do estudo dos dois grupos, observou-se que ao dia 30 e 60 de avaliação o diâmetro médio do defeito das tíbias controle foi 2mm menor que o diâmetro médio do defeito das tíbias tratada. Estes valores foram diferentes de acordo ao teste de Friedman (Fig. 10).

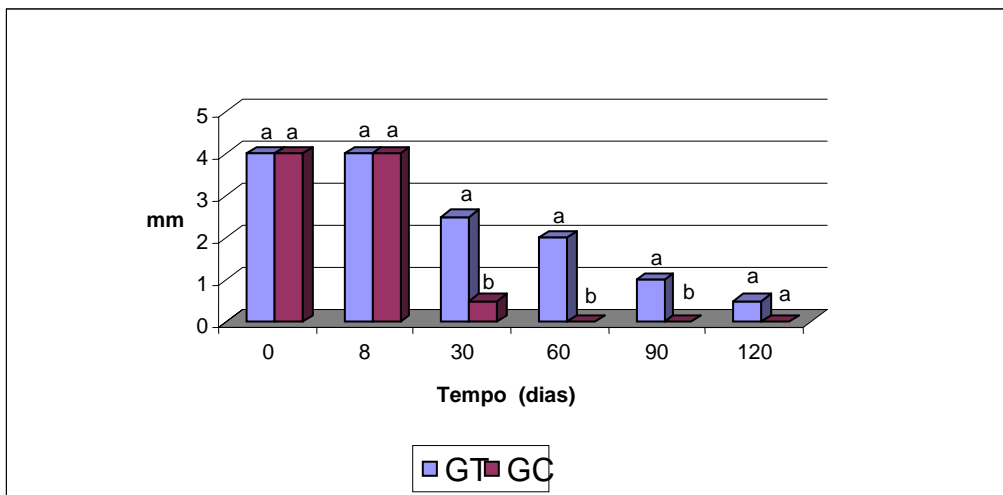


Figura 10. Representação gráfica da reparação do defeito cortical tibial (mm) dos coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética–lignina (GT) e o grupo controle (GC) por médio da mensuração de seu diâmetro transversal nos dias do estudo experimental.

*Colunas unidas com uma mesma letra num mesmo dia de avaliação, são iguais estatisticamente de acordo ao teste de Friedman (5%).

No 90º dia de avaliação as diferenças estatísticas se mantiveram, mas a diferença numérica das médias entre os dois grupos foi de 1mm a favor do grupo tratado. Já ao final da avaliação (120 dias) a diferença entre os dois grupos foi de 0,5mm que indicou não ser significativo de acordo com o teste de Friedman.

A análise estatística entre dias dentro de um mesmo grupo, tanto para o grupo tratado como controle, não mostrou diferenças de acordo com o teste de Dunn's, apesar de observar-se diferenças biológicas caracterizadas pelas diferenças de medidas oriundas do processo de reparação óssea (Fig. 11).

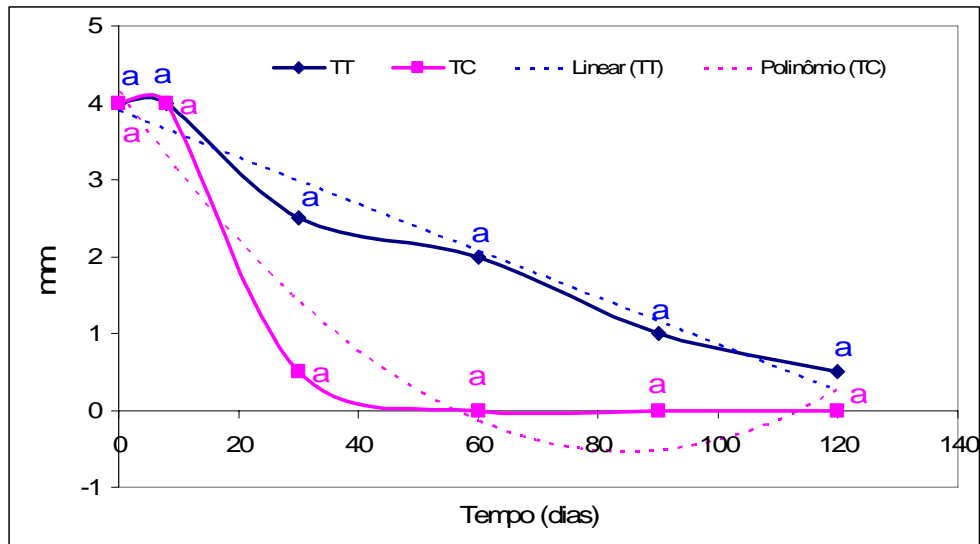


Figura 11. Representação estatística do diâmetro do defeito cortical tibial (mm) entre datas de um mesmo grupo de coelhos em estudo experimental, onde TT representa o grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina e TC o grupo controle.

*Letras iguais num mesmo grupo, são iguais estatisticamente de acordo com o teste de Dunn's (5%).

O comportamento do grupo controle pode ser explicado pela seguinte equação quadrática;

$$y = 0,0007x^2 - 0,1104x + 4,1492 \quad (R^2 = 0,9153)$$

Onde:

y = diâmetro do defeito cortical tibial em mm para o grupo controle

x = unidades em dia.

O coeficiente de determinação explica em 91% o comportamento do diâmetro do defeito cortical tibial no período do tempo estudado para o grupo controle.

O comportamento do grupo tratado pode ser explicado pela seguinte equação linear;

$$y = 0,0304x + 3,8919 \quad (R^2 = 0,9576)$$

Onde:

y = diâmetro do defeito cortical tibial em mm para o grupo tratado

x = unidades em dia.

O coeficiente de determinação explica em 95% o comportamento do diâmetro do defeito cortical tibial no período do tempo estudado para o grupo tratado.

Com a avaliação do defeito cortical tibial no grupo tratado observou-se que a implantação do compósito possivelmente reuniu os requisitos sugeridos por Pollick et al. (1995), para conseguir uma osteocondução: primeiro, o implante deve estar em

aposição direta com o osso hospedeiro; segundo, o osso periférico deve estar viável; e terceiro, a interface entre o osso e o implante deve ser estável, sem movimentação.

4.3. Aspectos radiológicos

Os resultados radiológicos das tibias do grupo controle obtidos imediatamente após a cirurgia revelaram radiopacidade grau 0 nas regiões do defeito tibial e ao redor do pino intramedular, de acordo com a classificação mostrada nas tabelas 1 e 2.

Já no grupo tratado com o compósito (Fig. 12A) observou-se no defeito cortical no mesmo período, radiopacidade maior que a da cortical do osso circunvizinho, ou seja, grau 3 (Tab. 2), o que está de acordo com o descrito por Borges (1998), Duarte (2003) e Rodriguez (2004) e difere do descrito por Vital et al. (2006) que relata a ocorrência de radiopacidade grau 2. Esta diferença pode ter sido porque utilizou uma escala de classificação diferente uma vez que os trabalhos foram feitos na mesma espécie animal, radiologicamente madura e o compósito teve a mesma composição química e porcentagens de seus componentes.

A radiopacidade ao redor do pino intramedular (Fig. 12A) foi discretamente maior que a da cortical do osso circunvizinho, ou seja, grau 2.

Assim como o descrito por Yamamoto et al. (2000) e Vital et al. (2006), as radiografias obtidas imediatamente após o procedimento cirúrgico mostraram que o compósito foi bem colocado no osso receptor (Fig. 12A). Isso sugere que apesar de ter ocorrido sangramento em todos os animais no momento da cirurgia, ele não foi suficiente para remover grande quantidade do compósito dos locais receptores, mas houve deslocamento médioproximal do compósito ao redor do pino, provavelmente favorecido por seu amolecimento com solução fisiológica. A não remoção da HAP-91-L do local da falha óssea, foi provavelmente devido ao fato de que no presente trabalho foi usado uma HAP-91-L sólida em forma de comprimido, o que facilitou sua colocação e ajuste no sítio receptor, obtendo-se um preenchimento completo do defeito sem lacunas visíveis entre o compósito e o osso.

Nas radiografias feitas aos 8, 30, 60, 90 e 120 dias no grupo tratado (Fig. 12) a radiopacidade do compósito foi gradualmente diminuindo em cada avaliação até apresentar grau 2 no defeito cortical e grau 1 ao redor do pino intramedular, ou seja, radiopacidade semelhante ao osso circunvizinho em ambos os locais de implantação. Este fenômeno foi descrito por Borges et al. (2000) e Vital et al. (2006) que atribuíram essa diminuição de radiopacidade à invasão de tecido conjuntivo como parte do

processo normal de reparação óssea. Deve-se considerar ainda que não houve alteração na densidade da hidroxiapatita, uma vez que seu número atômico não se altera. Entretanto, acredita-se que o crescimento de tecido conjuntivo e de tecido ósseo, com a evolução do processo, ao redor das partículas de hidroxiapatita, contribuiu para diminuição da radiopacidade do compósito (Rezende et al.1998).

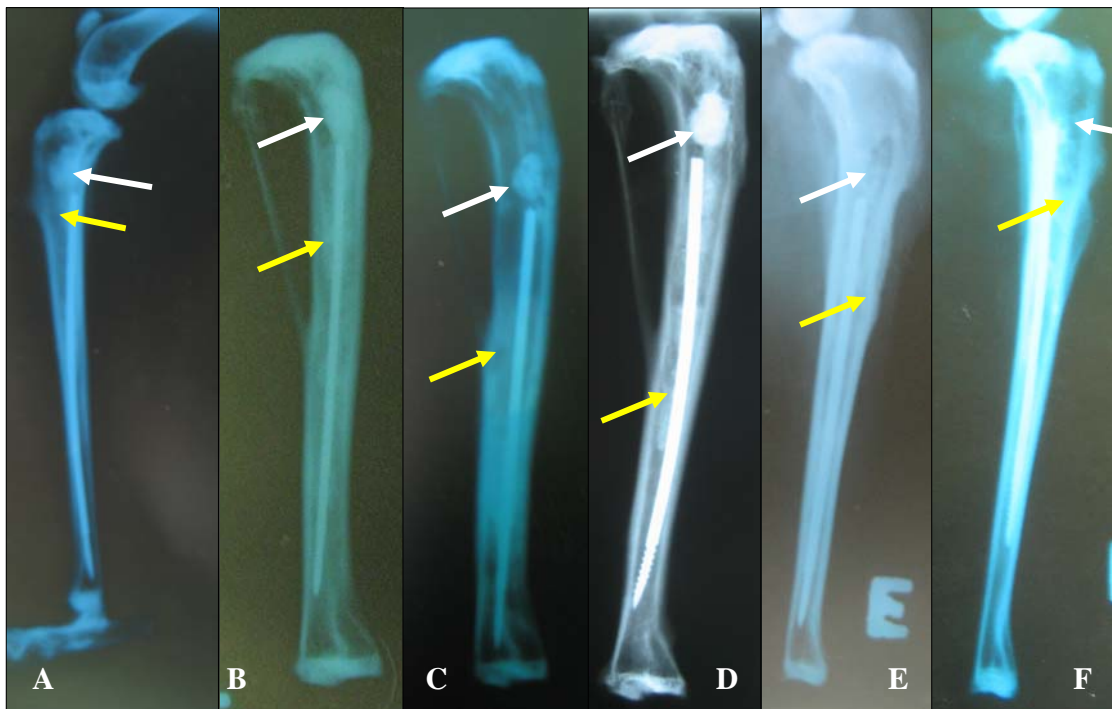


Figura 12. Radiografias da tíbia de coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina em projeção mediolateral. A, B, C, aos 0, 8 e 30 dias após a cirurgia, respectivamente. Nota-se radiopacidade grau 3 no defeito cortical (seta branca) e grau 2 ao redor do pino intramedular (seta amarela); D, E, F, aos 60, 90 e 120 dias após a cirurgia, respectivamente. Nota-se radiopacidade grau 2 no defeito cortical (seta branca) e grau 1 ao redor do pino intramedular (seta amarela).

Os dois locais implantados apresentaram semelhança com o osso circunvizinho, embora, se observou diferença na sua tonalidade de cinza, sendo menor no canal medular. Este fato não reportado na literatura pode ser devido a diferentes razões, dentre elas destaca-se a quantidade do compósito por unidade de área, sendo menor no canal medular, fato favorecido por ter-se diluído com solução fisiológica para facilitar sua introdução no canal medular; a velocidade de absorção parcial, que talvez foi mais rápida no canal medular por ter maior quantidade de sangue por unidade de área; a invasão de tecido mole a velocidade e quantidade maior junto com o processo normal de regeneração medular ou à combinação das razões anteriores.

Aos 8 dias, a análise radiográfica dos defeitos tratados não mostrou sinais de redução de radiopacidade ou quaisquer sinais de reação óssea e de absorção do compósito, entretanto ao redor do pino observou-se diminuição da radiopacidade passando a ser discretamente maior que a do osso circunvizinho (Fig. 12B).

No grupo controle para a mesma data (Fig. 13A), a falha permaneceu com radiopacidade grau 0 (Tab. 2), porque, neste mesmo período, o tecido presente na falha ainda não possuía radiopacidade suficiente para ser registrada no exame radiológico. Segundo Borges (1998) e Fehlberg (2001), em todo processo de reparação óssea, inicialmente se desenvolve tecido degranulação no foco da lesão, cuja radiopacidade é insuficiente para ser perceptível ao exame radiográfico, pelo fato dos constituintes químicos do tecido neoformado possuírem baixo número atômico. A superfície ao redor do pino também foi classificada como grau 0 (Fig 13A).

Aos dias 30, 60, 90 e 120 de avaliação (Fig. 12C, D, E, F), se observou diminuição progressiva da radiopacidade e tamanho do implante no defeito das tíbias tratadas e uma pequena mudança na forma de suas bordas dando a impressão de remodelação. Este fato foi observado por Duarte (2003) e Vital et al. (2006) e foi atribuído a um processo de absorção da hidroxiapatita na periferia do defeito. Ou ainda, isto pode sugerir a invasão por tecido conjuntivo precedendo a formação óssea na periferia do defeito após a absorção da hidroxiapatita (Fehlberg, 2001; Vital et al. 2006). No mesmo período de tempo (30, 60, 90 ou 120 dias) a radiopacidade ao redor do pino no grupo tratado se assemelhou a do osso circunvizinho.

No grupo controle (Fig. 13), para o mesmo período de tempo (30, 60, 90 e 120) observou-se na falha óssea o aumento progressivo da radiopacidade até adquirir semelhança com a do osso circunvizinho. A radiopacidade ao redor do pino intramedular se manteve como grau 0 (Fig 13).



Figura 13: Radiografias da tíbia de coelhos do grupo controle em projeção mediolateral. A, B aos 8 e 30 dias após a cirurgia, respectivamente. Nota-se radiopacidade grau 0 tanto no defeito cortical (seta amarela) como ao redor do pino intramedular (seta vermelha); C, aos 60 dias após da cirurgia, notar radiopacidade grau 1 no defeito cortical (seta amarela) e grau 0 ao redor do pino intramedular (seta vermelha); D, E, aos 90 e 120 dias após a cirurgia, respectivamente, notar radiopacidade grau 2 no defeito cortical (seta amarela) e de grau 0 ao redor do pino intramedular (seta vermelha).

Pode-se presumir que para as datas de 30, 60, 90 e 120 dias ocorreu crescimento ósseo em ambos os grupos, caracterizado pelo aumento da radiopacidade do defeito, da periferia para o centro no grupo controle, paralelamente à diminuição da radiopacidade do compósito no grupo tratado.

Na análise do teste de Friedman e ao comparar as datas de estudo entre os grupos, observou-se que somente aos 90 e 120 dias de avaliação não houve diferença significativa na radiopacidade do defeito cortical (Fig. 14). Este fato indica que a radiopacidade do defeito para estes dias de avaliação entre ambos os grupos foi semelhante, e possivelmente se deveu a que o defeito cortical do grupo controle ganhou radiopacidade pelo processo reparativo ósseo e o grupo tratado perdeu radiopacidade na medida em que o compósito foi absorvido e invadido por tecido de menor radiopacidade.

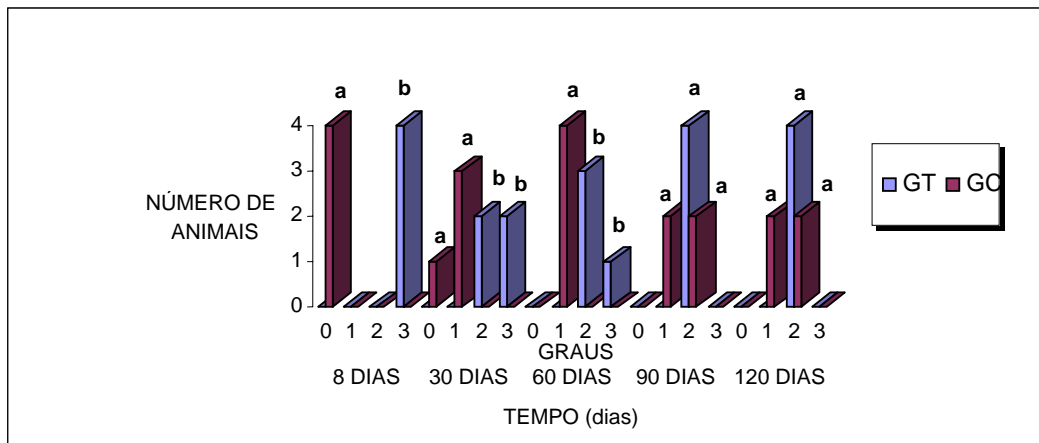


Figura 14. Representação gráfica dos graus 0,1,2,3 da radiopacidade da falha óssea tibial dos coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina (GT) vs o grupo controle (GC) nos dias do estudo experimental.

* Letras iguais em uma mesma data de avaliação, são iguais estatisticamente de acordo com o teste de Friedman (5%).

Na análise do teste de Friedman e ao comparar as datas de estudo entre os grupos, observou-se diferença significativa na radiopacidade da superfície ao redor do pino intramedular, exceção da ultima avaliação (Fig. 15). Este fato quer dizer que o espaço do canal medular ocupado pelo compósito, manteve radiopacidade sempre maior ao ser comparado com o espaço correspondente no grupo controle, exceto aos 120 dias de avaliação.

Na análise estatística entre datas para o defeito cortical e a superfície ao redor do pino intramedular do grupo tratado, não houve diferença de acordo com a análise de variância, apesar de observarem-se diferenças biológicas caracterizadas pela diminuição de radiopacidade com a evolução do tempo de acordo com os graus de classificação.

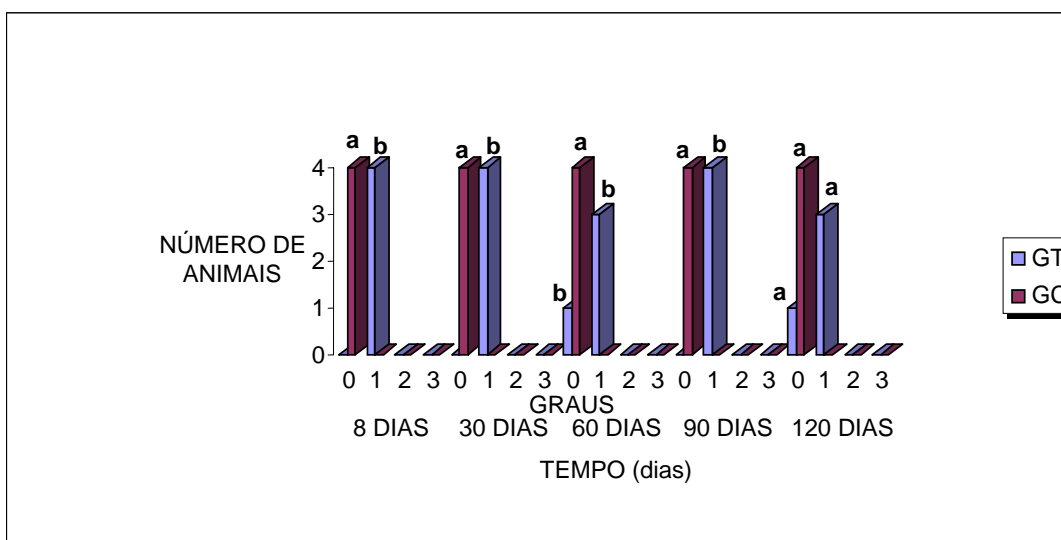


Figura 15. Representação gráfica dos graus 0,1,2,3 da radiopacidade ao redor do pino intramedular tibial dos coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina (GT) vs o grupo controle (GC) nas datas do estudo experimental.
* Letras iguais em uma mesma data de avaliação, são iguais estatisticamente de acordo com o teste de acordo com a análise de Friedman (5%).

4.4. Teste mecânico de Tração.

O teste mecânico de tração pode ser expresso em Newton/° ou em quilogramas força (kg F) e registra a força máxima que se necessita para afastar um corpo de seu centro de gravidade, sendo utilizado no presente trabalho para determinar a resistência máxima fornecida pela interface osso-pino intramedular a través do composto.

Em cada grupo o comportamento das médias do teste de tração foi linear crescente, observando-se uma diferença quantitativa considerável ao comparar as ultimas três datas de avaliação com as duas primeiras, sendo ainda maior ao comparar a avaliação final com a avaliação inicial (Tab. 6).

Tabela 6. Médias do teste mecânico de tração (kg F) exercida no pino intramedular implantado na tíbia de coelhos tratada com hidroxiapatita sintética-lignina (GT) e na tíbia sem tratamento com hidroxiapatita sintética-lignina (GC) durante os dias de avaliação.

Grupos	Dias após das cirurgias				
	8	30	60	90	120
G.T.	0,11	3,51	11,00	16,40	22,25
G.C.	0,10	1,76	8,75	7,75	10

Ao comparar as médias do grupo tratado com as do grupo controle, pôde-se afirmar que as médias do grupo tratado foram maiores que aquelas do grupo controle

em cada um dos dias avaliados, sendo que máxima diferença ocorreu aos 120 dias da avaliação, onde o grupo experimental tratado apresentou o dobro da média do grupo controle (Tab. 6). Este fato, possivelmente esteve influenciado pelas características do compósito de hidroxiapatita utilizado, onde o tamanho de seus poros, sua extensão e a interconectividade entre eles permitiu a osseointegração, levando a uma maior resistência na fixação do conjunto implante-osso (Pollick et al., 1995; Borges et al., 2000; Onno et al., 2000; Legeros, 2000; Vital et al., 2006). Apesar de que neste trabalho não se utilizaram pinos metálicos revestidos industrialmente com hidroxiapatita os resultados obtidos, são semelhantes aos observados por Tisdell et al. (1994) em pesquisas realizadas em humanos utilizando pinos revestidos com hidroxiapatita. No mesmo sentido anterior, os resultados também foram semelhantes aos obtidos por Augat et al. (1995), Moroni e Cajá, 1992; Pommer et al. (1997); Augat e Claes (1998); Moroni et al. (1998b); Moroni et al. (1998b), que afirmaram que os implantes revestidos com hidroxiapatita, comparados com outros de igual desenho, mas não revestidos, em diferentes espécies, apresentaram uma maior força de fixação.

Ao analisar estatisticamente o grupo tratado com o controle e entre dias de um mesmo grupo, não se observaram diferenças de acordo com o teste de Friedman e Duun's respectivamente (Fig 16).

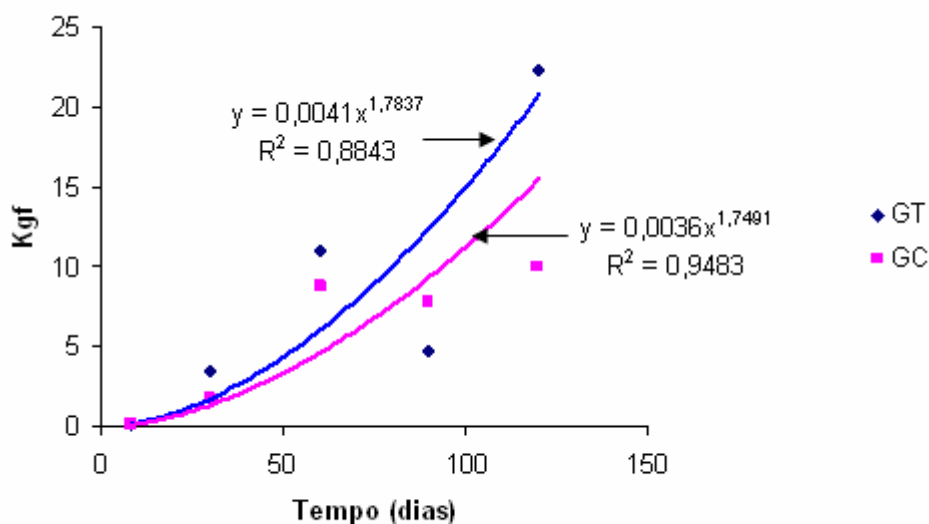


Figura 16. Linha de tendências das médias do teste mecânico de tração dos pinos intramedulares nas tíbias de coelhos do grupo tratado (GT) com hidroxiapatita sintética-lignina e do grupo controle (GC) nos dias do estudo experimental.

O comportamento das médias do grupo tratado com o compósito de hidroxiapatita sintética e lignina pode ser explicado pela seguinte equação exponencial;

$$y = 0,0041X^{1,7837}$$

onde:

y = média do teste mecânico de tração em kg F para o grupo tratado com o compósito

x = unidades em dias.

O coeficiente de determinação explica em 88% o comportamento das médias do grupo tratado com o compósito no período do estudo.

O comportamento das médias do grupo controle pode ser explicado pela seguinte equação exponencial;

$$y = 0,0036X^{1,7491}$$

x = unidades em dias.

O coeficiente de determinação explica em 94% o comportamento das médias do grupo controle no período do estudo.

Apesar de observarem-se diferenças quantitativas com a evolução do tempo em cada dia de observação entre os grupos tratados e controle e entre os dias do mesmo grupo, a análise estatística não evidenciou diferenças significativas.

Em um estudo preliminar realizado por Martinez (2007)¹⁴ os resultados demonstraram que a força necessária para fraturar a cortical tibial de coelho pela técnica de tração mecânica foi de 92,33kg F. Baseado no dado anterior, os pinos intramedulares do grupo tratado opuseram uma resistência equivalente ao 24% da força máxima média que se necessitou para fraturar a tibia de coelho e que para o grupo controle esta força correspondeu a 10%.

4.5. Avaliação macroscópica do canal medular.

Ao corte longitudinal das tíbias do grupo tratado com cerra elétrica aos 8 e 30 dias após as cirurgias, observou-se na avaliação macroscópica do canal medular uma distribuição desuniforme do compósito mais localizado na metade proximal, que se corresponde com a diáfise proximal da tibia, sendo o espaço restante ocupado pela

¹⁴ Comunicação pessoal.

medula óssea (Fig 17). O compósito, aparentemente, deu ao canal medular uma coloração branca hidroxapatita e vermelha com predomínio da primeira.

Aos 60, 90 e 120 dias após as cirurgias observou-se nas tíbias tratadas uma distribuição maior de um tecido semelhante à medula óssea, dando aparência de restrição da área ocupada pelo compósito, ou seja, observou-se uma coloração tipo vermelha de maior extensão ao ser comparada com os canais medulares dos dias anteriores.

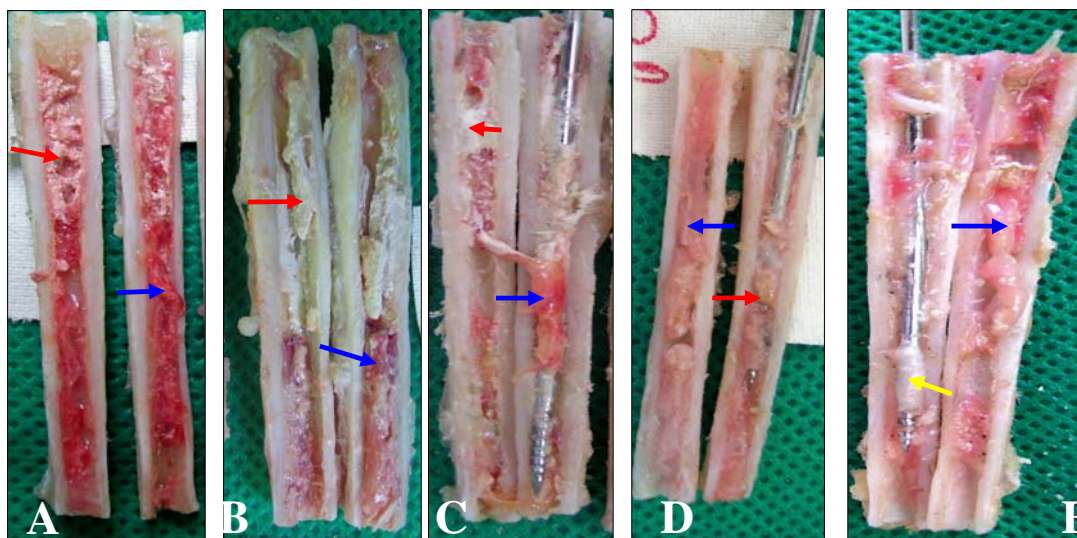


Figura 17. Fotografias do canal medular das tíbias de coelhos do grupo tratado com hidroxapatita sintética-lignina ilustrando a distribuição e coloração dentro do canal medular – A- aos oito dias; B- aos 30 dias; C- aos 60 dias; D- aos 90 dias e E- aos 120 dias após das cirurgias. Seta vermelha: indica a presença da hidroxapatita sintética-lignina no canal medular. Seta azul: indica a medula óssea. Seta amarela: indica presença de tecido esbranquiçado semelhante a tecido ósseo revestindo a rosca do pino intramedular.

É importante destacar que em um dos canais medulares aos 120 dias da avaliação, não foi visível o compósito (Fig. 17E). Esta observação permite presumir que com o passar do tempo, a hidroxapatita sintética-lignina parece ser absorvida no local da implantação e a medula óssea tende a regenerar e retomar a sua normal distribuição dentro do canal medular. Este fato pode se explicar pela presença de tecido brando à palpação, brilhante de coloração vermelha dentro do canal medular. Borges et al. (2000) em análises quantitativas em cães observaram também que a hidroxapatita se degrada, apesar de ser considerada clinicamente não degradável. Segundo Overgaard et al. (1997), em um estudo experimental em humanos demonstrou que os revestimentos com hidroxapatita são absorvidos a um ritmo de aproximadamente 20% anual,

especialmente em locais em que o revestimento está em contacto com medula óssea mas não com o osso trabecular.

A presença do compósito em maior quantidade na metade proximal do canal medular foi também observada na análise das radiografias. Este fato, possivelmente se deveu a diferentes razões: à técnica da introdução de ar através da seringa que não permitiu retirar a suficiente medula óssea da metade distal do canal medular, deixando pouco espaço para o compósito; à pressão interna do canal que atuou como força negativa repelindo a HAP-91-L durante sua introdução, fato favorecido pelo amolecimento prévio do compósito com solução fisiológica a 0.9%; ao deslocamento físico do compósito como consequência da introdução do pino intramedular que provocou sua saída parcial; à hemorragia intra-operatória do canal que produziu o deslocamento do compósito amolecido ou à combinação das razões anteriores que impossibilitaram a distribuição homogênea e em quantidade suficiente em toda a extensão do canal medular.

Nas tíbias do grupo controle observou-se normalidade na distribuição e coloração da medula óssea vermelha intensa e aparência gordurosa em todos os dias do estudo, o que demonstrou macroscopicamente uma recuperação rápida da mesma (Fig. 18).



Figura 18. Fotografia do corte longitudinal da tíbia de coelho do grupo controle ilustrando a distribuição homogênea e coloração vermelha da medula óssea (seta branca).

Na observação direta e ao se comparar os dois locais de deposição do compósito no grupo tratado, observou-se que no canal medular a hidroxiapatita sintética-lignina perdeu visibilidade mais rápido que aquela que foi colocada na falha cortical. Este fato talvez indique que a velocidade de absorção do compósito se deu em velocidades diferentes e que possivelmente foi influenciado pela consistência do compósito, sendo implantada em forma de bloco no local da falha óssea e em forma líquida no canal medular, aumentando a área de contacto com o tecido ósseo. A maior área superficial de contato é uma das razões de Kawachi, et al. (2000) para explicar a velocidade de absorção de algumas biocerâmicas. Outra possível razão é o local receptor, já que; na medula óssea a irrigação vascular é maior que na cortical, pelo que a dissolução por contato com soluções fisiológicas, e a absorção mediada por células (fagocitose) é mais acentuada (Jarcho, 1981; Kawachi, et al., 2000).

4.6.- Avaliação macroscópica das roscas dos pinos intramedulares.

Na avaliação macroscópica das roscas dos pinos intramedulares das tíbias tratadas e controle, aos 8 dias da avaliação, não se percebeu aderência de tecido sobre sua superfície, permitindo a visibilidade das mesmas, tendo como a cor característica do pino. Observou-se apenas diferença no fundo das roscas, onde no grupo tratado teve presença do compósito. Como a média da circunferência das roscas dos pinos intramedulares introduzidos nas tíbias foi igual à média de um pino normal, sugere-se que não houve aderência de nenhum tipo de tecido a elas (Tab 7).

Tabela 7. Medias da circunferência do ponto correspondente à rosca dos pinos intramedulares (mm) após de sua extração do canal medular das tíbias de coelhos nos dias da avaliação, onde, G.T. representa o grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina e G.C. representa o grupo controle.

Grupos	Dias após das cirurgias					
	0	8	30	60	90	120
G.T.	<i>1.18</i>	<i>1.18</i>	<i>1.39</i>	<i>1.35</i>	<i>1.40</i>	<i>1.59</i>
G.C.	<i>1.18</i>	<i>1.18</i>	<i>1.24</i>	<i>1.50</i>	<i>1.51</i>	<i>1.48</i>

Aos 30, 60, 90 e 120 dias de avaliação após as cirurgias em 75% das roscas dos pinos do grupo tratado e controle se observaram presença de tecido com características de tecido medular de coloração vermelha amarelada, que impedia ver o fundo da mesma e parcialmente sua superfície, sugerindo uma possível aderência de tecido. Somente em duas roscas do grupo tratado aos 90 dias e duas aos 120 dias (25%), se observaram

presença de tecido duro de coloração esbranquiçado e características macroscópicas compatíveis a tecido ósseo, correspondendo com os pinos que opuseram a maior resistência mecânica à tração mecânica (Tab. 6). Esta última observação foi semelhante ao reportado por Friedman (1992) que em estudos mecânicos de extração de implantes recobertos com hidroxiapatita em cães, observou presença do osso no implante metálico. Este fato sugeriu uma possível interface biológica, responsável pela condução do processo de ossificação até a rosca do pino metálico intramedular, semelhante à conseguida por Vidigal Jr & Goisman (2003) que utilizando implantes de titânio puro e implantes de titânio recobertos com hidroxiapatita pela técnica de aspensão térmica a plasma, observaram que ocorreu maior formação de tecido ósseo em torno dos implantes recobertos com a hidroxiapatita.

Ao comparar estatisticamente as medições das circunferências do ponto correspondente com a rosca dos pinos intramedulares após de sua extração do canal medular das tíbias de coelhos, se encontrou que nos dias do estudo entre os dois grupos, não se observou diferença de acordo com o teste de Friedman. A análise estatística entre dias de um mesmo grupo tanto para o grupo tratado como para o controle, também não mostrou diferenças de acordo com o teste de Dunn's (Fig.19).

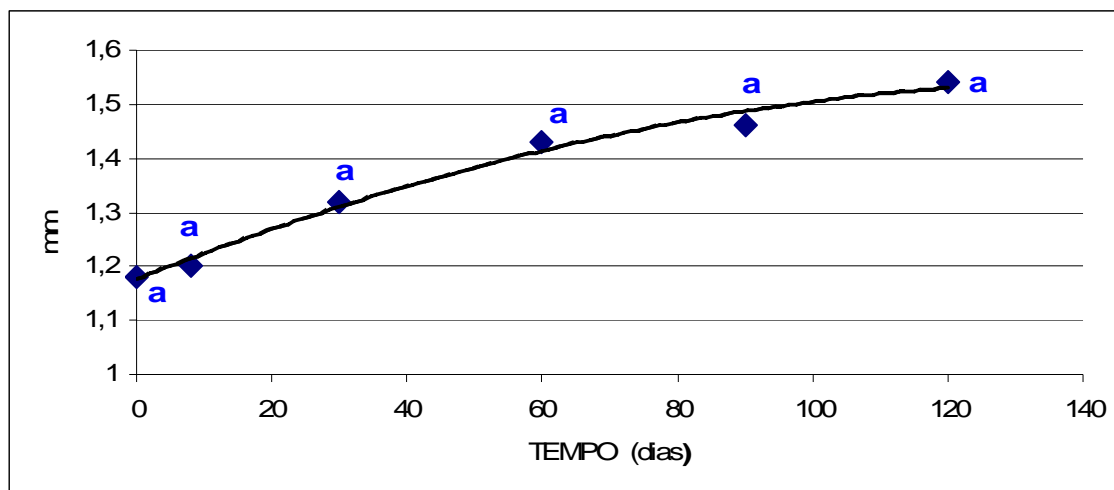


Figura 19. Linha de tendências das médias da circunferência do ponto correspondente com a rosca dos pinos intramedulares (mm) após de sua extração do canal medular das tíbias de coelhos do grupo tratado com hidroxiapatita sintética-lignina (GT) e do grupo controle (GC) nos dias do estudo experimental.
*Médias unidas com uma mesma letra nos dias da avaliação em ambos os grupos, são iguais estatisticamente de acordo com o teste de Dunn's (5%).

O comportamento das médias dos dois grupos pode ser explicado pela seguinte equação quadrática;

$$y = 2E - 0,5x^2 + 0,005x + 1,176 \quad (R^2 = 0,9888)$$

Onde:

y = média da circunferência das roscas dos pinos intramedulares em mm para ambos os grupos

x = unidades em dia.

O coeficiente de determinação explica em 98% o comportamento das médias dos grupos controle e tratado com o compósito no período de tempo estudado.

4.7- Difração de raios X (DRx).

A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio que se cristaliza no sistema hexagonal com parâmetros de rede $a = b = 9,417\text{Å}$ e $c = 6,875\text{Å}$, o que gera picos característicos aos diversos planos atômicos dentro de sua estrutura, conforme mostra a figura 20.

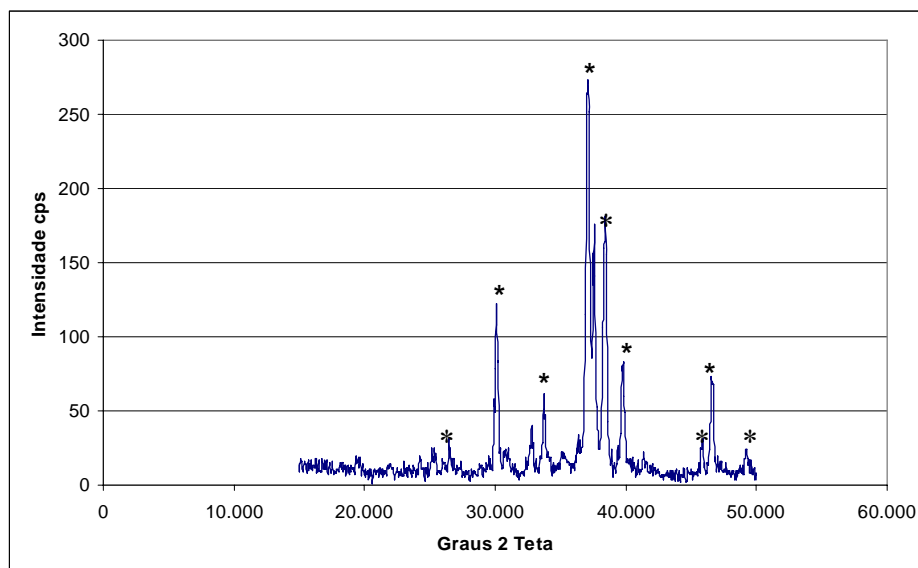


Figura 20. Difratograma do composto de hidroxiapatita sintética-lignina. *Picos de hidroxiapatita. (Fonte: Laboratório de mineralogia - Departamento de Solos - UFV).

Observa-se a cristalinidade da apatita pelos picos delgados e com uma linha de base quase reta. Esta HAP apresenta picos muito semelhantes aos obtidos com uma

HAP sintetizada a 950°C, formando cristais pequenos que a fazem absorvível quando é implantada no tecido ósseo (Londoño et al. 2006).

Na figura 21 observa-se o grupo controle nos diferentes dias da avaliação, nos quais pode-se notar a ausência de material cristalino e sim apenas uma ombreira típica de materiais orgânicos de baixa cristalinidade.

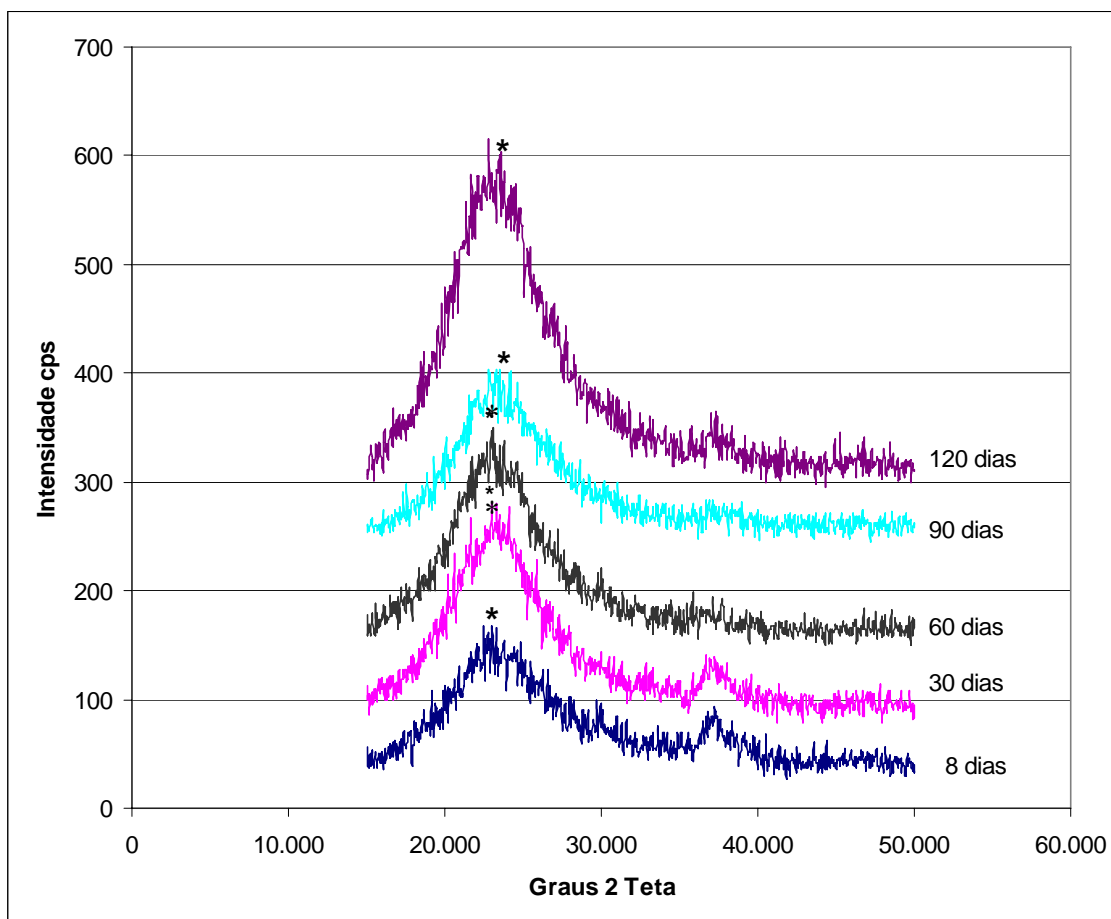


Figura 21. Difratogramas do material obtido do canal medular e das roscas dos pinos intramedulares tibiais dos coelhos do grupo controle nos dias após das cirurgias. *ombreira.

A Figura 22 mostra que aos 8 e 30 dias da avaliação após as cirurgias, a hidroxiapatita sintética-lignina manteve a sua integridade cristalina pela manutenção de todos os seus picos característicos. Aos 60 dias após de sua aplicação, existe uma perda gradual de cristalinidade com a redução de alguns picos e com o desaparecimento de outros. E aos 90 e 120 dias observa-se uma perda total de sua cristalinidade.

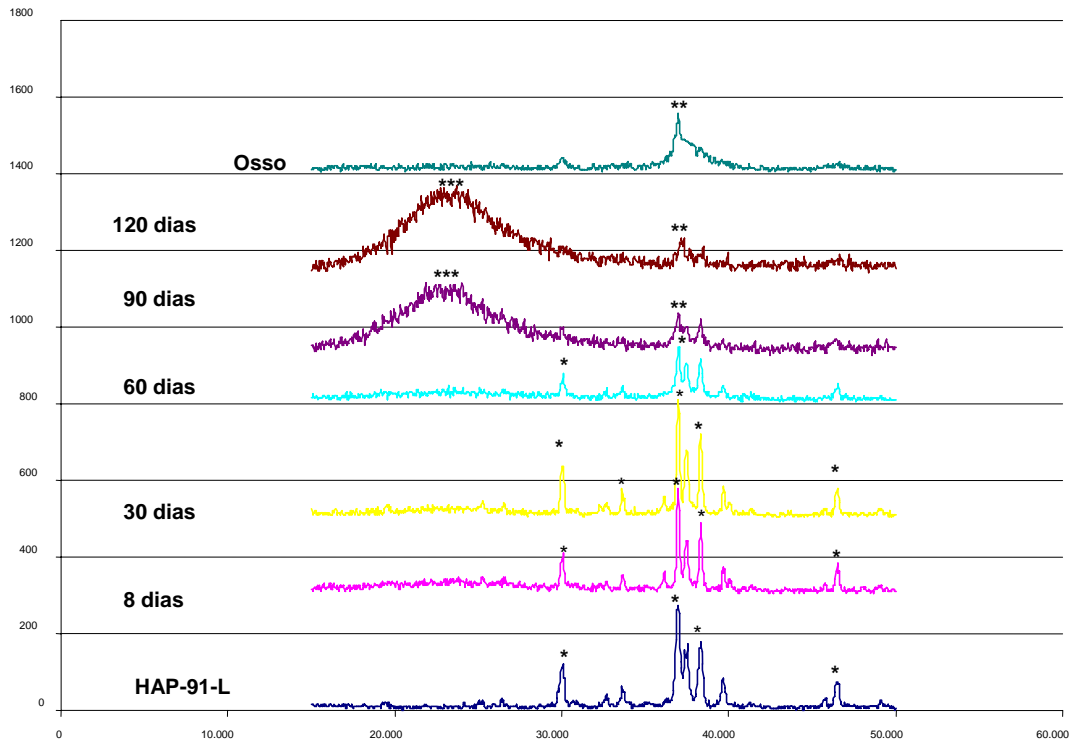


Figura 22. Difratoograma do composto de hidroxiapatita sintética e lignina, difratoograma do material obtido do canal medular das tíbias e das rosca dos pinos intramedulares dos coelhos do grupo tratado com HAP-91-L nos dias após das cirurgias, e difratoograma da cortical tibial de coelho. *picos de hidroxiapatita sintética, **picos de osso tibial, ***ombreira.

A perda da cristalinidade do material analisado pela DRx nas ultimas datas de avaliação, indicam que a hidroxiapatita sintética-lignina foi integrada ao tecido ósseo; isto baseia-se no fato de que os pequenos picos observáveis têm características compatíveis com a parte inorgânica que constitui o tecido ósseo. Este fato permite presumir que é possível guiar o processo de reparação óssea até o canal medular e até o pino intramedular com a utilização da hidroxiapatita sintética como osseocondutor, confirmando a observação previamente feita durante a avaliação macroscópica do canal medular, principalmente pelas características do material que cresceu na rosca do pino intramedular, delas análises radiográficas e histológicas e também pelas diferenças registradas no teste mecânico de tração.

4.8. Aspectos histológicos.

A presença da hidroxiapatita na falha cortical tibial na análise histológica foi caracterizada pela presença de um material refringente, amorfo, acelular, bem delimitado e sem afinidade pelo corante utilizado (Hematoxilina e Eosina), semelhante ao que foi relatado por Borges (1998), Vital (2003) e Vital et al. (2006).

Nos locais em que foram produzidas as falhas ósseas, nos dois grupos, não foram observadas evidências de infecção pós-cirúrgica. Além disso, no grupo tratado não se observou reação ao compósito, estando estes resultados de acordo com o descrito por Yasunaga et al. (1999), Cehreli et al. (2003) e Vital et al. (2006).

No oitavo dia de pós-operatório nos animais do grupo controle, foi observado reabsorção das bordas do defeito e a presença de tecido conjuntivo frouxo na sua superfície; e no centro, extravasamento de eritrócitos e fibrina, proliferação de fibroblastos e formação de capilares predominante na área hemorrágica, onde se observou tecido de granulação (Fig 23A), sendo estes últimos achados mais bem evidenciados com a coloração de Tricrômico de Gomori. Observou-se também matriz não calcificada (Fig 23A) e o início de formação de trabéculas com migração de células osteogênicas com muitos capilares. Também observou-se escassos osteócitos e condutos ósseos (Havers) revestidos por endóstio, caracterizando um processo normal de reparação óssea conforme o descrito por Borges (1998), Franco et al., (2001), Duarte (2003), Vital et al., (2006) e Flach et al., (2008).

Já no grupo tratado, aos 8 dias observou-se a presença de uma massa amorfa preenchendo o defeito e que fragmentou ao compósito de hidroxiapatita e lignina (Fig. 23B), houve presença de fibroblastos ao redor do compósito de HAP-91-L localizado na parte central da lesão com pouco extravasamento de glóbulos vermelhos e presença de tecido adiposo. Nas bordas da lesão não se observou crescimento de tecido ósseo. Este atraso no grupo tratado, quanto comparado ao grupo controle, pode ser à inibição inicial da formação óssea pela hidroxiapatita, que provavelmente atua como corpo estranho como descrito por Borges (1998), Duarte (2003) e Vital et al., (2006) nas observações de 8 dias ou a uma provável inibição mecânica exercida sobre as bordas da lesão.

No entanto, este achado difere do relatado por Tampieri et al., (2001), que observaram aos 8 dias, a presença de osso novo ao redor e no interior da hidroxiapatita. Além disso, Vital (2003) observou intensa formação óssea com o esboço de cartilagem

sendo substituído por tecido conjuntivo. Franco (2001), utilizando hidroxiapatita associada ao lipossoma, observando aos oito dias, formação de osso trabecular ao redor do implante, com numerosos osteoblastos na superfície trabecular.

Aos 30 dias após a cirurgia, os animais de ambos os grupos mostraram tecido ósseo trabecular preenchendo parcialmente a falha óssea, o que está de acordo com o descrito por Borges (1998), Lopes et al., (2000); Franco et al., (2001) e Vital et al., (2006) que observaram um processo reparativo ativo caracterizado por a formação de trabéculas ósseas e sistemas de Havers.

Nos animais do grupo controle observou-se reabsorção das bordas do defeito e no seu centro, tecido condróide, colágeno e fibroblastos com formação de tecido osteóide caracterizado pela grande quantidade de osteoblastos ativos e menor quantidade de osteócitos, além se visualizou trabéculas ósseas espessas (Fig 23C), que formaram cavidades medulares revestidas por endóstio com presença de osteoblastos e de tecido adiposo. O osso trabecular estava em contacto com o osso compacto nas bordas da lesão, o que segundo Pollick et al. (1995), Fehlberg (2001) e Vital et al., (2006) é característico de um processo de reparação normal.

No grupo tratado, aos 30 dias observou-se a presença de um processo regenerativo muito ativo, caracterizado por reabsorção das bordas do defeito, e no seu centro presença de osteoblastos e formação de capilares e células indiferenciadas que englobaram e contenham compósito de aparência granular e com tendência a se corar (Fig 23D). As células indiferenciadas tenham capacidade osteogênica, além, houve presença de tecido osteoide com início de formação de matriz óssea, tecido blástico novo conectado com o tecido trabecular (Fig 23D), não se visualizaram osteoclastos. Pôde-se observar formação óssea mais evidente no grupo tratado do que no grupo controle, evidenciando-se trabéculas mais espessas com cavidades medulares amplas e sistemas de Havers mais organizados, fato que confirma o descrito por Borges (1998) e Vital et al., (2006), que também indica a característica osseocondutiva da hidroxiapatita, sugerindo um processo de reparação óssea mais adiantada.

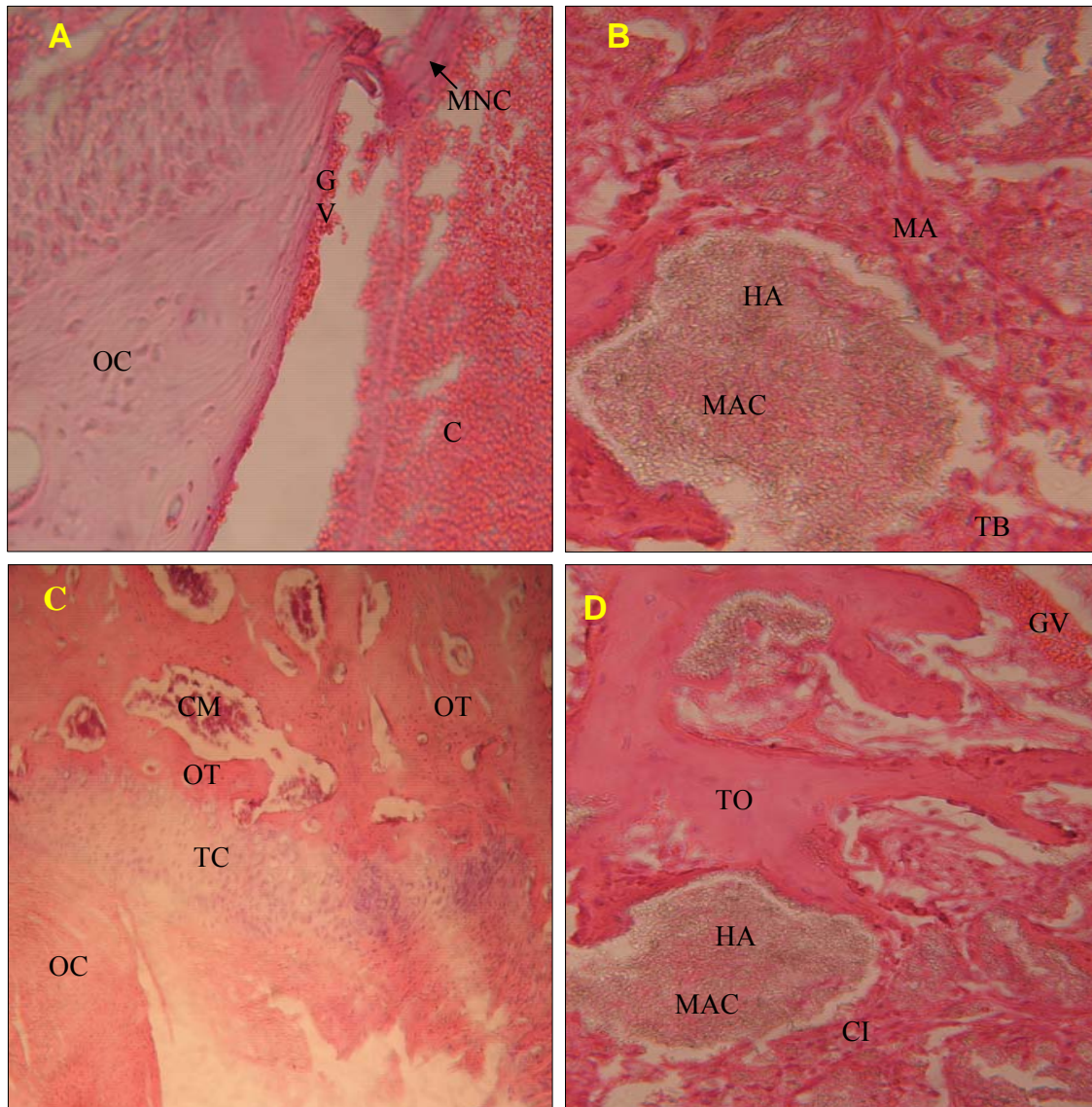


Figura 23. Fotomicrografias de regiões do defeito cortical realizado em tíbias de coelhos. **A-** Grupo controle aos 8 dias após as cirurgias. Nota-se início de formação de osso trabecular com aderência de glóbulos vermelhos. HE, 40x. **B-** Grupo tratado com HAP-91-L aos 8 dias após as cirurgias. Nota-se material amorfo ao redor da HAP-91-L como também material acidófilo na sua localização. HE, 40x. **C-** Grupo controle aos 30 dias após as cirurgias. Nota-se um processo de ossificação endocondral. HE, 20x. **D-** Grupo tratado com HAP-91-L aos 30 dias após as cirurgias. Nota-se células indiferenciadas ao redor da HAP-91-L. HE, 40X. C: coágulo, CI: células indiferenciadas, CM: cavidade medular, GV: glóbulos vermelhos, E: endósteo, HA: composto de hidroxiapatita e lignina, MA: material amorfo, MAC: material acidófilo, MNC: material não calcificado, OC: osso compacto, OT: osso trabecular, TB: tecido blástico, TC: tecido condróide, TO: tecido osteóide.

Aos 60 dias, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado observou-se uma extensa formação óssea que continua mais acentuada no segundo grupo. Nesta data, o tecido ósseo formado no grupo tratado apresentou, em alguns animais, características de

osso compacto lamelar com ósteons bem definidos e atividade celular presente, além tecido conectivo e escasso tecido adiposo. Semelhante ao descrito por Vital et al., (2006), mas diferente do observado por Oonish et al. (1997) e Franco et al., (2001) que não observaram diferenças marcantes na formação óssea dos grupos controle e tratado aos 60 dias, sugerindo que o processo de reparação óssea estava completo. Algumas partículas de HAP-91-L foram circundadas por tecido ósseo trabecular, provavelmente devido a sua característica osteocondutora. Esta característica faz com que a HAP-91-L funcione como um suporte passivo para invasão celular e, conseqüentemente, aposição óssea (Borges, 1998), o que pode ser comprovada, mais uma vez, neste experimento.

Em algumas amostras aos 60 dias observou-se tecido osteoide e presença de um material amorfo de aspecto fibrilar (Fig 24F-f) com depósitos de matriz óssea, o que dava a idéia de atuar como sinalizador da mesma. Em alguns locais da hidroxiapatita e lignina se visualizou material acidófilo (fig 24F-f1) que tal vez era matriz orgânica não mineralizada e vascularizada. Em alguns campos observou-se formação de osso com osteons primários e secundários, como também, osso trabecular em contato direto com osso compacto. Ao contrário do descrito por Duarte (2003), que não mais observou a presença de hidroxiapatita aos 60 dias de pós-operatório, no presente experimento o implante ainda era visível na falha óssea (Fig 24F-f1), sendo que se encontrava totalmente envolvido por tecido ósseo, esta diferença pode ser explicada pelo fato de que no trabalho supracitado o autor usou o osso alveolar como modelo experimental, sendo que neste local, o metabolismo ósseo é mais intenso do que na tíbia, levando a uma absorção mais rápida do implante. Este achado histológico está de acordo com o descrito por Vital et al., (2006), que reporta também, presença de HAP-91-L na mesma data de avaliação.

Aos 90 e 120 dias de pós-operatório, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado observou-se uma formação óssea, ainda mais extensa que a observada aos 60 dias, sendo mais evidente no grupo tratado.

Nos animais do grupo controle observou-se dentro do defeito formação de tecido ósseo trabecular e um espaço visível entre o osso compacto e o osso neoformado que estava ocupado por tecido adiposo (Fig 24G, Fig 25I). No grupo tratado observou-se no defeito osso compacto caracterizado pela presença de grande quantidade de trabéculas ósseas maduras e espessas interconectadas com o osso periférico, cavidades medulares de menor tamanho revestidas por endóstio contendo tecido adiposo, glóbulos vermelhos e depósitos de HAP-91-L (Fig 24H, Fig 25J-j). A observação de ilhas ósseas e a não

presença de infiltrado linfocitário sugerem que o compósito tem propriedades osseoadaptivas e além é biocompatível, já tendo sido confirmado por Vital et al., (2006).

Durante a evolução do experimento, foi observado pela análise macroscópica, a diminuição da quantidade de hidroxiapatita na falha óssea, fato confirmado com a leitura histológica, o que foi também observado por Borges (1998) e Vital et al., (2006). Também não se observou fechamento completo em nenhuma dos defeitos corticais em ambos os grupos, mas sim se pode afirmar que no grupo tratado o processo regenerativo foi mais adiantado e houve maior formação de tecido ósseo que aqueles no grupo controle.

Mesmo sendo o mecanismo de absorção da hidroxiapatita incerto (Oonish et al., 1997; Duarte, 2003), semelhante ao observado por Vital et al., (2006) e diferindo de Jarcho (1981), Bloebaum et al., (1994), Benahmed et al., (1996), Borges (1998), Frayssinet et al. (1999), no presente experimento não se observou presença de partículas de hidroxiapatita no interior de macrófagos, apesar destes terem sido visualizados em grande número. Este fato não descarta a biodegradação do implante cerâmico pela via fagocitária. Além disso, as controvérsias relacionadas à biodegradação da hidroxiapatita encontrados em vários experimentos podem ser justificadas pela diferença das características físicas dos tipos de hidroxiapatitas (Parks e Lakes, 1992; Ratner e Hofman, 1996; Khor et al., 1997; Fulmer et al., 2002; Duarte, 2003; Liu. et al., 2003; Londoño et al., 2006 e Vital et al., 2006).

Vários fatores provavelmente influenciam a resposta dos tecidos ao implante de hidroxiapatita e a sua degradação, dentre outros destacam-se o tamanho dos grânulos e a estrutura física da hidroxiapatita, que determinariam sua absorção, sua degradação, bem como a formação óssea (Osborn & Newesely, 1980; Pollick et al., 1995). Jensen et al. (1996) afirmaram que o substituto ósseo ideal além de outras características deve manter seu volume na fase inicial de regeneração óssea e então ser totalmente absorvido. No presente experimento a hidroxiapatita não havia desaparecido completamente na observação de 120 dias. Provavelmente não se observou diminuição drástica de seu volume devido ao fato de que a hidroxiapatita utilizada não ser pura. Possivelmente a lignina retardou o processo de degradação da mesma. Outra explicação provável é que 120 dias não foi um intervalo de tempo suficiente para que ocorra a degradação completa do implante cerâmico.

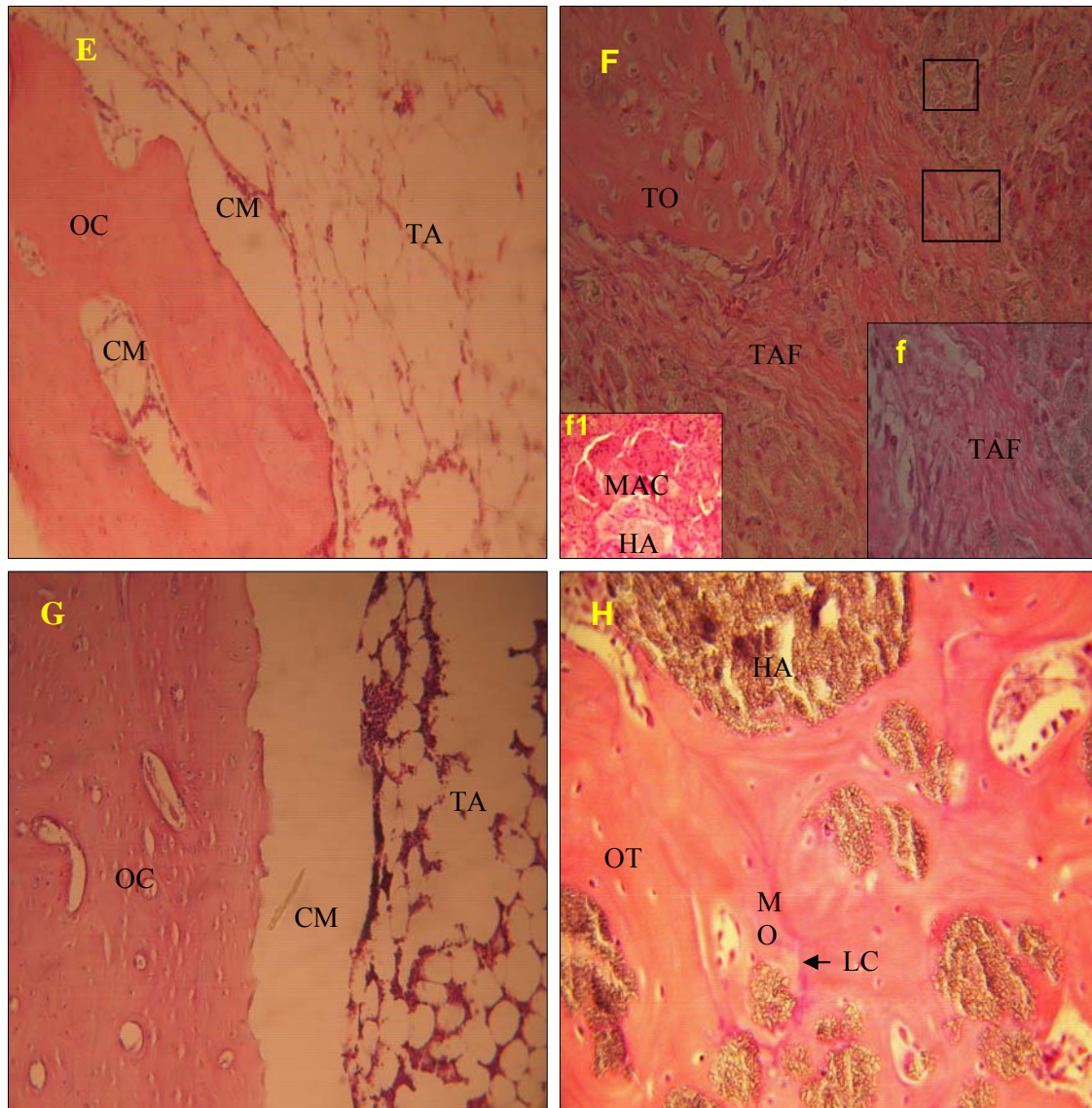


Figura 24. Fotomicrografias de regiões do defeito cortical realizado em tíbias de coelhos. **E-** Grupo controle aos 60 dias após as cirurgias. HE, 10x. **F-** Grupo tratado com HAP-91-L aos 60 dias após as cirurgias, **f-f1-** Detalhe da área demarcada em F. Nota-se em **f** material amorfo de aspecto fibrilar e em **f1** nota-se HAP-91-L com material acidófilo. HE, 40x (F), 40x (f1) e 100x (f). **G-** Grupo controle aos 90 dias após as cirurgias. HE, 20x. **H-** Grupo tratado com HAP-91-L aos 90 dias após as cirurgias. HE, 40x. CG: CM: cavidade medular, E: endósteo, HA: compósito de hidroxiapatita sintética e lignina, LC: linha cimentante, MA: matriz acidófila, MO: matriz óssea, OC: osso compacto, OT: osso trabecular, TA: tecido adiposo, TAF: tecido de aspecto fibrilar, TO: tecido osteóide.

Não foi observada a presença de linfócitos e células plasmáticas, indicativo de resposta inflamatória imunomediada, como citado por Geesink (1993), o que comprova mais uma vez a biocompatibilidade da hidroxiapatita associada à lignina.

Embora na presença do implante de HAP-91-L a resposta óssea tenha sido mais evidente nas observações de 30, 60, 90 e 120 dias de pós-operatório, o tempo necessário para a regeneração óssea foi o mesmo tanto no grupo controle quanto no grupo tratado. Este fato está de acordo com o observado por Franco et al., (2001) e Vital et al.,(2006), e é indicativo da característica osteocondutora da hidroxiapatita, guiando o crescimento do tecido novo até o implante metálico e que confirma os achados da avaliação macroscópica da rosca do pino intramedular, as diferenças obtidas com o teste mecânico de tração e os resultados fornecidos pela difração de raios X.

Um achado nas amostras do grupo controle foi a tendência de separação do tecido ósseo novo do osso compacto em alguns locais. Este fato não foi observado nas amostras do grupo tratado, podendo sugerir que o compósito possivelmente facilitou uma osseointegração mais firme, influenciando positivamente na interface formada e evitando desta maneira a fratura do osso. Uma observação semelhante foi feita por Carlo (2007), quem testou polihidroxiabutarato associado à hidroxiapatita sintética em diferentes concentrações, observou que existia mais integração do compósito ao tecido ósseo quando trabalhou com maiores concentrações de HAP-91[®].

Da mesma forma que Borges (1998) observou-se, neste estudo, a presença de tecido conjuntivo fibroso ao redor das partículas de hidroxiapatita (Fig 23b). Este fato é diferente de Cehreli et al. (2003), que afirmaram que a hidroxiapatita quando depositada em uma cavidade óssea recentemente preparada provoca a deposição de osso diretamente sobre sua superfície, sem a intervenção de tecido fibroso, seguindo um processo de calcificação normal.

Em nenhuma das avaliações do experimento no grupo tratado, se evidenciou mudança tecidual fora dos parâmetros normais de resposta óssea, nem áreas de osteonecroses circundando o compósito, estando de acordo com Duarte (2003) e Vital et al.,(2006), que não observaram reação de corpo estranho ou infecção em nenhum momento. Diferente de Borges (1998) que reportou transformação tipo sarcomatosa do periósteo, necrose óssea, com desintegração da matriz e intensa osteoclasia nas áreas de implantação da HAP-91.

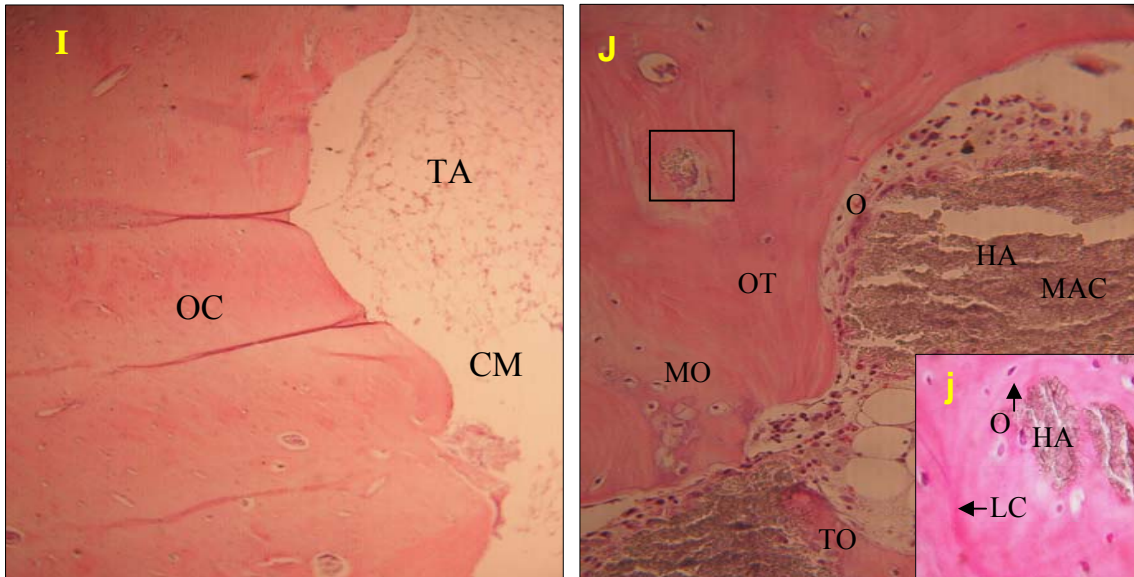


Figura 25. Fotomicrografias de regiões do defeito cortical realizado em tíbias de coelhos. **I-** Grupo controle aos 120 dias após as cirurgias. HE, 10x. **J-** Grupo tratado com HAP-91-L aos 120 dias após as cirurgias. **j-** Detalhe da área demarcada em J. Nota-se atividade osteoblástica ao redor da HAP-91-L com material acidófilo. HE, 20x e 40x respectivamente. CM: cavidade medular, HA: compósito de hidroxiapatita sintética e lignina, LC: linha cimentante, MAC: material acidófilo, MO: matriz óssea, O: osteoblasto, OC: osso compacto, OT: osso trabecular, TA: tecido adiposo, TO: tecido osteóide.

5- CONCLUSÃO

Nas condições do presente trabalho e com base nos resultados clínico-cirúrgicos, radiológicos, avaliações macroscópicas do periósteo, falha óssea tibial, canal medular e medições diretas da falha óssea e da rosca do pino intramedular, teste mecânico de tração, difração de Raios X e histologia; podem-se obter as seguintes conclusões.

- Na avaliação radiológica dos 90 e 120 dias após as cirurgias, se observou radiopacidade semelhante ao osso circunvizinho nos locais implantados com o compósito de hidroxiapatita sintética e lignina.
- Com o teste mecânico de tração se determinou que o pino intramedular dos animais tratados com o compósito de hidroxiapatita sintética associada à lignina teve a maior resistência mecânica.
- Ao final do período de análise macroscópica, no grupo tratado, o tecido formado em algumas roscas dos pinos apresentou características compatíveis com o tecido ósseo.
- A difração de raios X demonstrou absorção do compósito de hidroxiapatita sintética e lignina implantado no canal medular tibial e que o tecido que regenerou tinha cristalinidade compatível com o componente mineral do osso.
- Na análise histológica os tipos de tecido encontrados na interface da hidroxiapatita sintética e lignina indicam-na como substituto ósseo.
- Na presença do implante de hidroxiapatita sintética e lignina na falha óssea tibial a resposta óssea foi mais evidente nas observações de 30, 60, 90 e 120 dias de pós-operatório, tendo, portanto um processo de regeneração óssea de tipo progressiva que se acentuou na fase final da avaliação, sendo guiada até o canal medular.
- A hidroxiapatita sintética associada à lignina se mostrou biocompatível, osteocondutora e favorece a osseointegração; sendo um substituto ósseo eficiente.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABOE, M.; PINHOLT, E.M.; HJORTING-HANSEN E. Healing of experimentally created defects. *Journal Br. Of Oral Maxilofacial Surg*, v. 33, n. 5, p. 312-318, 1995.
- ATNER, B. and Hofman, A. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. *Academia Press*, p. 20-25, 1996.
- AUGAT, P. e CLAES, L. Removal forces of schanz screws coated with had. *Loth European conference on biomaterials*, Davos Suiza, 1998.
- AYERS, R.; SIMSKE, S.; NUNES, C.; WOLFORD, L. Longterm bone ingrowth an Residual microhardness of porous block hydroxyapatite implants in humans. *Journal of Oral Maxilofacial Surg*, v. 56, n. 6, p. 297-1301, 1998.
- BACHA, W.J. e BACHA, L.M. *Color Atlas of Veterinary Histology*. 2 ed. New Jersey: Lippincott Williams & Wilkins, p 19-26. 2000.
- BENAHMED, M.; HEYMAN, D.; BERREUR, M.; COTTREL, M.; GODARD, A.; DACULS, G. E PRADAL, G. Ultrastructural study of degradation of calcium phosphate ceramic hy munan monocytes and modulation of this activity by HILDA/LIF cytokine. *J Histochem*, v. 4. p 1131-1140.
- BLOEBAUM, R.D.; BEEKS, D.; DORR, L.D.; SAVORY, C.G.; DUPONT, J.A. E HOFMAN, A.A. Complications with hydroxiapatite particulate separation in total hip arthroplasty. *Clin orthop*, v. 298. p 19-26, 1994.
- BORGES, A.P.B. O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia, de cães (Canis familiares). Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodispersão. Belo Horizonte, MG: Escola de veterinária da UFMG, 1998, 112p. (Tese, Doutorado).
- BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B.; MELO, E.G.; NETO, P.I.N. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no proximal da tíbia de cão: aspectos à microscopia de transmissão. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.6, p.616-620, 2000.
- BOSTROM, M.P. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Journal Clin Orthop*, v. 335:(S), p. 116-123, 1998.
- BREITBART, A. S.; STAFFENBERG, D.; THORNE, C.; GLAT, P.; CUNINGHAM, N. et al. Tricalcium phosphate and osteogenin: a bioactive onlay bone graft

substitute. *Journal Plastic and Reconstructive Surg*, v. 96, n. 3, p. 699 – 707, 1995.

- BROWN, S.G.; KRAMERS, P.C. Consolidação óssea indireta (secundária). In: BOJRAB, M.J. *Mecanismos da Moléstia na cirurgia de pequenos animais*. São Paulo, Editora: Manole, 1996, p. 783.
- BRUCE, H.; JAMES, M.; DAVID, C. Valorização clínica de um xenoenxerto de osso bovino anorgânico com uma barreira de colágeno reabsorvível no tratamento dos defeitos das bifurcações molares. *Revista Internacional de Odontologia Restauradora e Periodoncia*, v. 5, n. 2, p. 169-177, 2001.
- CALIXTO, R.F.E. Implante de um floculado de resina derivada de óleo de mamona (*Ricinus communis*) em alvéolo de rato imediatamente após a extração dental. Avaliações histológica e Histométrica da biocompatibilidade e da cronologia do reparo ósseo. Ribeirão Preto, SP: Universidade de São Paulo, 2001. 72p. (Tese, Mestrado)
- CARLO, E. C. Compósitos de hidroxiapatita e polihidroxibutirato em defeitos ósseos experimentais na ulna de coelhos. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007, 58p. (Tese, Mestrado).
- CEHRELI, M.C.; SAHIN, S.; KESENCI, K. et al. Biological reactions to a poly (L-lactide)-hydroxiapatite composite: A study in canine mandible. *J. Biomat. Appl.*, v. 17, p. 265-276, 2003.
- COOK, S.D.; THOMAS, K.A.; KAY, J.F. Y JARCHO, M. Hydroxiapatite-coated porous titanium for use as an orthopedic biologic attachment system. *Clin orthop*, v. 230, p. 303-312, 1998.
- DAMIEN, C.; PARSON, R.; PREWETT, B.; HUISMANS, F.; VENZAIO. M. et al. A coralline hydroxyapatite and demineralized bone matrix gel composite for bone grafting. Excerpted. In: *Fourth world biomaterials congress*. Berlin, Federal Republic, 1992.
- DAVID, A.; EITENMULLER, J.; MUHR, G.; POMMER, A.; BAR, H.F.; OSTERMANN, P.A. e CHILDHAUER, T.A. Mechanical and histological evaluation of had.coated, titanium-coated and grit-blasted surfaces under weight-bearing conditions. *Arch Orthop trauma Surg*, v. 114, p. 112-118. 1995.
- DE VICENTE, J.C.; LOPEZ-ARRANZ, E.; LOPEZ-ARRANZ, S. Regeneração tissular em defeitos ósseos, adjacentes a Implantes endoósseos: um estudo piloto

experimental. *Revista Internacional de Odontologia Restauradora e Periodoncia*, v. 4, n. 1, p; 41-49, 2000.

- DUARTE, T. S. Osseointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de case. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2003. 58p. (Tese, Mestrado).
- EGGLI, P.; MULLER, W. E SCHENK, R. Porous hydroxiapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bone ingrowth and implant substitution. *Clin orthop*, v. 232. p 127-138. 1998.
- FEHLBERG, A.F. Hidroxiapatita sintética na regeneração da falha óssea provocada em fratura completa de terço intermédio de tibia imobilizada pela fixação percutânea em cães. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 42p. (Tese, Mestrado).
- FITCH, R. Bone autografts and allografts in dogs. *Compendium on continuing education*, v. 19, n. 5, p. 558-573, 1997.
- FLACH, D.M.; GORGOZINHO, K.B.; PRAZERES, M.N. et al. Regeneração óssea em cães e gatos. 2002 http://www.uff.org.br/regeneracao_ossea.htm. Acessado em 15/01/2008.
- FOSSUM, T.W. Cirurgia de pequenos animais. São Paulo: ed Roca Ltda, p. 848-853, 2002.
- FRANCO, K.L.; BORGES, A.P.B.; VILÓRIA, M.I.V. et al. Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tibia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. *Arq. Bras. Med.Vet. Zootec*. 2001; 53: 431-436.
- FRAYSSINET, P.; VIDALAIN, J.; RANZ, X.; CARTILLIER, J. E ROUQUET, N. Hydroxiapatite particle migration. *Eur j orthop surg traumatol*, v. 9, p. 95-98, 1999.
- FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near-physiological temperature. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, v.3, p. 299-305, 1992.
- FULMER M. T.; ISON, I. C.; HANKERMAYER, C. R.; CONSTANTZ, B. R. And ROS, J. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. *Biomaterials*. Elsevier, v. 23, p. 751-755, 2002.

- FURLONG, R.J. e OSBORN, J.F. Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings. *J Bone Joint Surg Br*, v.73, p. 741-745, 1991.
- FURLONG, R. The application clinical behaviour of hydroxyapatite ceramic in prosthetic coatings. *J Bone joint Surg Br*, v. 80, p. 31-32, 1998.
- GEESINK, R. Hydroxiapatite-coated total hip replacement: five year clinical and radiological results. En: Geesink, R.G.T. y Manley, M.T. (Eds.). Hydroxiapatite coatings in orthopaedic surgery. New York: *raven press, Ltd.*, p 171-208, 1993.
- GEESINK, R.; DE GROOT, K.; KLEIN, C.P. Bonding of bone to apatite-coated implants. *J Bone Bonding joint surg Br*, v. 70, p. 17-22, 1998.
- HEMMERLÉ J, CUISINIER G, SCHULTZ P, VOEGEL C. HRTEM Study of biological crystal growth mechanisms in the vicinity of implanted synthetic hydroxyapatite crystals. *Journal Dental Research*, v. 76, n. 2, p. 682-687, 1997.
- HENCH, L.L. The challenge of orthopaedic materials. *Current orthopaedics*, v.14, p.7-15, 2000.
- JAFFE, W. y SCOTT, B. Current concepts review. Total hip arthroplasty with hydroxiapatite-coated protheses. *J Bone Joint Surg Am.*, v. 78, p. 1918-1934, 1996.
- JARCHO, M. Calcium phosphate ceramics as hear tissue prosthetics. *Clin orthop*, v 157, p. 259-278, 1981.
- JENSEN, S.S.; AABOE, M.; PINHOLT, E.M. et al. Tissue reaction and material characteristics of our bone substitutes. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v. 11, n.1, p. 55-66, 1996.
- KAWACHI, E.Y.; BERTRAN, C.A.; REIS, R.R.; ALVES, O.L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova*, v. 23, n.4, p.518-522, 2000.
- KAPLAN, F. S.; HAYES, W.; KEAVENY, T.; BOKEY, A.; EINHAR, T. y IANNOTTI, J. Forma y función del hueso. En: Sinon, S.R. (Ed.) Ciencias básicas en ortopedia. *America Academy of Orthopaedic Surgeons*, p. 135-1991, 1997.
- KAY, J. F. y COOK, S. D. Biologic profile of calcium phosphate coating. En: Geesink, R.G.T. y Manley, M.T. (Eds.) Hydroxyapatite coating in orthopaedic surgery. New Cork: *Raven press, Ltda.*, p. 89-106, 1993.
- KHOR K. A.; Cheang , P. and Wang , B. The thermal spray processing of HA powders and coatings. New York, Feb. 1997. *Journal of Minerals, Metals & Materials Society*, v. 49, p. 51-57, 1997.

- KOKUBO, T; KIM, H; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, v. 24, n.13, p. 2161-2175, 2003.
- LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, v.395, p.81-98, 2002.
- LIU, J.; YE, X.; WANG, H.; ZHU, M.; WANG, B. and YAN, H. The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method. *Ceramics International*, v. 29, p. 629-633, 2003.
- LONDOÑO, M. E; ECHAVARRÍA A; DE LA CALLE F. Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas... Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín (Colômbia). *Revista EIA* 2006; 5: 109-118.
- LOPES, M. A.; SANTOS, J. D.; MONTEIRO, F. J et al. Push-out testing and histological evaluation of glass reinforced hydroxyapatite composites implanted in the tibia of rabbits. *J. Biomed. Mater. Res* 2000; 48: 734-740.
- LÓPEZ, S. A.; VAL B. J.; GONZALO, O. J.; GORROCHATEGUI, S. I.; BUELTA, C. L. La influencia del revestimiento de hidroxiapatita y biovidrio en la oseointegración de implantes de titanio. *Rev Ortop traum*, v. 41, p. 173-181, 1997.
- MANLEY, M. Calcium phosphate biomaterials: a review of the literature. Em: Greesink, r.g.t. y Manley, M.T. (Eds). *Hydroxyapatite Coatings in orthopaedic surgery*. New York: *Raven press, Ltd*, p. 1-23. 1993.
- MENDOZA, B. C.; MELÉNDEZ L. M.; GARCIA L. E.; HERNÁNDEZ F. C. Caracterización estructural y biointegración del sustituto óseo BioOsteo. *Revista Mexicana de Física*, v. 50, n.1, p. 19-23, 2004.
- MIRANDA, A.L.; FRANCO DA SILVA, L. A.; TAVARES, G. A.; COUTO DO ANDRÉIA, V. A.; GUIMARÃES DE MIRANDA, H. Abraçadeira de náilon: resistência à tração em testes físicos e seu emprego como cerclagem no fêmur de cães. *Rev. Ciência Animal Brasileira*, v. 7, n.3, p. 299-307, 2006.
- MC LAUGHLIN, R.M. Autogenous cancellous and corticocancellous bone grafting. In: *Symposium Fracture Management, 1, Vet Med.*, p.1063-1080, 1993.
- MONCHAU, F.; LEFÈVRE, A. DESCAMPS, M.; et al. In Vitro studies of human and rat osteoclast activity on tricalcium phosphate, calcium carbonate. *Biomolecular Eng*, v. 19, n. 26, p. 143 – 152, 2002.
- MORAES, P.C. Biocompatibilidade e comportamento do cimento de fosfato de cálcio, reforçado com diferentes tipos de fibras, implantado no radio de coelhos.

- Jabotical, SP: UNESP, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 73p, 2002. (Tese, Mestrado).
- MORONI, A; CAJA, V.L., EGGER, E. GOTTSÄUNER-WOLF, F. TRINCHESE, L; ROLLO, G. y CHAO, E.Y. Porous titanium implants with and without hydroxiapatite coating. Em: Ravaglioli, A. y Krajewsky, A. (Eds.) Bioceramics and the human body. Barking: *Elsevier Science Publishers, Ltd.*, v, 141. 1992.
- MORONI, A; ASPENBERG, P.; TOKSVIG, L.; FALZARANO, G.; GIANNINI, S. Enhanced fixation with hyd. Coated pins. *Clin. Orthop.*, v, 346, p. 171-177, 1998a.
- MORONI, A; TOKSVIG, L.S.; MALTERELLO, M.C.; ORIENTI, L.; STEA, S. e GIANNINI, S. Acomparison of hyd-coated, titanium-coated and uncoated tapered external-fixation pins. *J Bone Joint Surg Am*, v. 80, p. 547-554, 1998b.
- ONISHI, H.; KUSHITANI, S.; YASUKAWA, E. et al. Particulate bioglass compared with hydroxiapatite as a bone graft substitute. *Clinic. Orthop. Rel. Res*, v. 334, p. 316-325, 1997.
- ONO, I.; TATESHITA, T.; NAKAJIMA, T. Evaluation of a high density polyethylene fixing system for hydroxyapatite ceramic implants. *Journal Biomaterials*, v.21, p.143-151, 2000.
- OVERGAARD, S.; OBALLE, K.; LIND, M. E BUNGER, C. Resorption of hydroxiapatite and fluorapatite coatings in man. An experimental study in trabecular bone. *J Bone Joint Surg Br*, v. 79. p 654-659, 1997.
- PARKS, J. and LAKES, R. Biomaterials : an introduction. New York, Plenum PRESS. 2a ed. 1992.
- PEÓN, E.; FERNÁNDEZ, E. M.; JIMÉNEZ A.; GARCÍA, M. C.; GALVÁN, J. C.; ESCUDERO, M. L.; SIMANCAS, J. Recubrimientos de hidroxiapatita sobre la superaleación MA956. *Ingeniería Electrónica, Automática y Comunicaciones*, v. 25, n. 1, 2004.
- PETIT, R. The use of hydroxyapatite in orthopaedic Surgery: A ten-year review. *Eur J. Orthop. Surg. Traumatol*, v. 9, p. 71-74, 2000.
- PÉREZ Á.; ORTEGA, V. et al. Implante óseo de la espuma de hidroxiapatita-09 Estudio experimental en conejos. *Rev Esp Patología*, v, 38, n.1, p. 14-20, 2005.
- PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L.; DECAMPO, C.E. Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair, 4 ed. Missouri: Saunders Elsevier, p. 139-140, 2006.

- POLLICK, S.; SHORS, E.C.; HOLMES, R.E. et al. Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramics placed in bone and ectopic sites. *Journal. Oral Maxillofac. Surg.* 1995; 53: 915-922.
- POMMER, A.; DAVID, A.; RICHTER, J.; HAHN, M. e MUHR, G. Strength of hydrocoated fixateur external pins in vivo. En: 64 th annual meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons 1997; 15 feb, Rosemont, 219 p.
- PORTER, A.E.; TAAK, P.; HOBBS, L.W. et al. Bone bonding to hydroxiapatite and titanium surfaces on femoralstems retrieved from human subjects at autopsy. *Biomaterials* 2004; 25(21): 5199-5208.
- PUTLAYEV, Valery. Calcium phosphates. Departamento de Química da Universidade de Moscú. www.hsms.msu.ru/pdf/bio-dresden.ppt. Página consultada em junho do 2007.
- RATNER, B. e HOFFMAN, A. An introduction to materials in medicine. *Biomaterials Science Academic press* 1996; 473p.
- REZENDE, C. M. F.; BORGES, A. P. B.; BERNIS, et al. Aspectos clínicos-cirúrgicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães. *Arq. Bras. Med. Vet. E Zootec* 1998; 50 (5): 537-545.
- RIAÑO, C.; ECHEVARRÍA, A.; NOREÑA, A. Hidroxiapatita sintética de porosidad inducida-comparación con el hueso calcinado. *Universidad de Antioquia, Rev Facultad de Ingeniería* 1999; 19 (56): 64.
- RIVERA, J.A.; RIAÑO, C. et al. Injertos óseos - Nueva alternativa. Fase III. Obtención, caracterización y evaluación de Hidroxiapatita Sintética y el compuesto de Hidroxiapatita Sintética porosa – Proteínas morfogenéticas Óseas en un modelo experimental Lapino . *Rev Col Cienc Pec* 2004; 17 (1): 25.
- RODRIGUEZ, A., I., R. Avaliação da reconstituição óssea do radio de cadelas submetidas ou não a ovarioossalpingohisterectomia, utilizando hidroxiapatita com alandronato e hidroxiapatita com colágeno (avaliações densitométricas e radiográficas). Tese, Mestrado Jaboticabal, SP. Universidade Estadual Paulista, 2004, 58p. ()
- RUMPERL, E.; WOLF, E.; KAUSCHKE, E.; BIENENGRBER, V.; BAYERLEIN, T.; GEDRANGE, T.; PROFF, P. The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo. *Folia Morphology*, v.65, n. 1, p.43-48, 2006.

- SAKANO, H.; KOSHINO, T.; TAKEUCHI, R. et al. Treatment of the instable distal radius fracture with external fixation and a hydroxyapatite spacer. *Journal Hand Surg.*, v.26, p.923-929, 2001.
- SASAKI, S.U.; STUGINSKI, R.M.; MATTAR, Jr. R. et al: Estudo biomecânico comparativo da resistência à tração entre dois tipos diferentes de miniâncoras de sutura. *Rev Bras Ortop*, v, 35, p. 231-234, 2000.
- SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O.; MILAM, S.B. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. *Journal Oral Maxillofac. Surg.*, v.57, p.1122-1126, 1999.
- SJÖSTRÖM, E. Wood chemistry: fundamentals and applications. San Diego, *Academic Press*, 293p, 1993.
- STEA, S.; VISENTIN, M.; SAVARINO, L.; CIAPETTI, G.; DONATI, M.; MORONI, A.; CAJA, V.L. e PIZZOFERRATO, A. Microhardness of bone at the interface with ceramic-coated metal implants. *J Biomed Mater Res*, v. 29, p. 695-699, 1995.
- SUN, J.; TSUANG, Y.; CHANG, W.H. et al. Effect of hydroxyapatite particle size on mioblasts and fibroblasts. *Biomaterials*, v. 18, n. 9, p. 683-689, 1997.
- SUOMINEN, E.; AHO, A.J.; VEDEL, E. et al. Subchondral bone and cartilage repair with bioactive glasses, hydroxyapatite and hydroxyapatite.glass composite. *J. Biomed. Mat. Res*, v. 32, p.543-551, 1996.
- TAMPIERE, A.; CELLOTI, G.; SPRIO, S.; DELCOGLIANO, A.; RANZESE, S. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. *Biomaterials*, v. 22, n. 11, p. 1365- 1370, 2001.
- TISDEL, C.L.; GOLBERG, V.M.; PARR, J.A.; BENSUSAN, J.S.; STAIKOFF, L.S. Y STEVENSON, S. The influence of hydroxyapatite and tricalcium phosphate coating on bone growth into titanium fiber-metal implants. *J Bone Joint Surg Am*, v. 76, p. 159-171, 1994.
- VIDIGAL Jr., G.M.; GOISMAN, M. Osseointegração × biointegração: uma análise crítica. *Rev.Bras. Odontol*, v.4, p.54, 1997.
- VITAL, C.C. Hidroxiapatita sólida associada ao carbono e associada ao carbono e fosfato biácido de sódio como substituto em falha óssea na ulna de coelhos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2003, 23p. (Monografia, Especialização).

- VITAL, C.C.; BORGES, A.P.B.; FONSECA, C.C. Et al. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.2, p.175-183, 2006.
- YAMAMOTO, T.; ONGA, T.; MARUI, T.; et al. Use of hydroxiapatite to fill cavities after excision of benign bone tumors. *J. Bone Joint Surg*, v. 82-B, p. 1117-1120, 2000.
- YASUNAGA, T.; MATSUSUE, Y.; FURUKAWA, T. et al. Bonding behavior of ultrahigh strength unsintered hydroxiapatite particles/poly (L-lactide) composites to surface of tibial cortex in rabbits. *Bioceramics*, v. 9, p. 391-394, 1999.