

CRISTIANE CARNEIRO VITAL

**HIDROXIAPATITA ASSOCIADA À LIGNINA
NO PREENCHIMENTO DE FALHA ÓSSEA
EXPERIMENTAL NA TÍBIA DE COELHOS**

Tese 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
2005**

DEDICO:

À minha família: meus pais, Benedito e Lúcia e meus irmãos, Márcio e Marquinhos. Obrigada por tudo.

À minha orientadora, Andréa, por ser uma pessoa tão especial, que me ensinou tanto. Você é um modelo de profissional pra mim, obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus porque, sem Ele nada é possível.

À minha família, principalmente aos meus pais;

Ao DVT, por todos estes anos de aprendizado, alegrias e crescimento pessoal e profissional;

À Universidade Federal de Viçosa;

Às minhas colegas de especialização Gyanini, Fabrícia, Ana Paula, Manuela, Luciane, Luciana e Janete com quem compartilhei tantos momentos importantes.

À Andréa por ser além de orientadora, uma amiga tão querida. Vou sentir muito a sua falta;

Ao professor Gonzaga, por ser um exemplo de profissional e pela ajuda com a anestesia;

Ao professor Cláudio Fonseca, pela ajuda preciosa na leitura das lâminas e no preparo das pranchas;

Ao professor Zé Antônio, por ser uma pessoa tão especial;

Ao Breno e Renner pela amizade e ajuda importantíssima nas cirurgias, radiografias, cuidados clínicos e eutanásia dos animais. Sem vocês teria sido impossível;

Ao Breno pela ajuda com a fotos;

À Andressa e Manú pela amizade tão especial e ajuda nas radiografias, cirurgias e na alimentação dos animais;

À Anna Laetícia pela ajuda nas cirurgias e radiografias;

À Érica pela amizade e ajuda nas cirurgias e radiografias;

Ao Cláudio e ao Adão, pelo preparo das lâminas de histologia e pela ajuda na eutanásia dos animais;

À Maninha pela ajuda sempre constante durante as cirurgias;

A todos os outros funcionários do DVT que de alguma forma colaboraram com este experimento;

À todas as outras pessoas que me ajudaram durante o experimento e que porventura eu tenha esquecido de citar;

Ao meu pai e meu irmão Marquinhos pela ajuda com a análise estatística;

Aos professores, por terem transmitido o seu conhecimento;

A Betânia pela amizade e por ter me incentivado para tentar a prova de monitoria;

À turma de especialização de 2004, Andressa, Alexandra, Gustavo, Fábio, Kelly, Luana, Léo, Paloma, Paula e Juliana. Aprendi muito com todos vocês. Vou sentir saudades!

Aos meus colegas de mestrado, Manú, Luciane, Renner, Breno, Ana Paula, Janete e Fabrícia;

À Tatinha, por ter me ensinado tanto;

À Sheila, do laboratório J.H.S. ;

A todos os meus colegas da graduação, principalmente a G7. Morro de saudades de vocês;

Aos animais, que são a razão deste trabalho.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Implantes ósseos.....	4
2.2. Características da hidroxiapatita sintética (HAP).....	4
2.3. Regeneração óssea na presença de hidroxiapatita.....	8
2.4 Hidroxiapatita associada a outros componentes.....	11
2.5. Hidroxiapatita associada à lignina.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1.Aspectos clínicos e cirúrgicos.....	19
4.2.Aspectos radiológicos.....	22

4.3.Aspectos histológicos.....	29
5. CONCLUSÃO.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas do procedimento cirúrgico.	15
Figura 2: Radiografias de ulna de coelho do grupo controle evidenciando o defeito ósseo produzido na ulna e sua evolução de radiopacidade.	27
Figura 3: Radiografias de ulna de coelho tratada com hidroxiapatita.	28
Figura 4: Fotomicrografias da tíbia de coelho dos grupos controle e tratado	35
Figura 5: Fotomicrografia da tíbia de coelho do grupo controle aos 8 dias de pós-operatório.	36
Figura 7: Fotomicrografias da tíbia de coelho dos grupos controle e tratado	37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Classificação do grau de radiopacidade na região da falha óssea de coelhos do grupo controle e do grupo tratado com hidroxiapatita associada à lignina 17
- Tabela 2. Classificação do edema no pós-operatório avaliado durante exame clínico imediatamente após o procedimento cirúrgico (dia 0) até 7 dias nos animais do grupo controle (GC) e nos animais do grupo tratado com HAL (GT) 20
- Tabela 3. Classificação da dor no pós-operatório avaliada durante exame clínico imediatamente após o procedimento cirúrgico (dia 0) até 7 dias nos animais do grupo controle (GC) e nos animais do grupo tratado (GT) 21
- Tabela 4. Radiopacidade média do centro e da periferia do defeito ósseo produzido experimentalmente na tíbia de coelhos. Comparação com o osso vizinho. GC: grupo controle; GT: grupo tratado 24

RESUMO

VITAL, Cristiane Carneiro, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2005. **Hidroxiapatita associada à lignina no preenchimento de falha óssea experimental na tíbia de coelhos.** Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges. Conselheiros: Cláudio César Fonseca e Luiz Gonzaga Pompermayer.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a hidroxiapatita sintética associada à lignina em forma de bloco, como substituto na regeneração óssea. Para tanto, foram utilizados vinte coelhos, clinicamente saudáveis, da raça Nova Zelândia. Os animais foram divididos em dois grupos, com 10 animais em cada. O grupo um recebeu hidroxiapatita associada à lignina e o grupo dois não recebeu o implante. Após a realização de protocolo anestésico rotineiro, foi feita uma incisão de pele no terço médio do membro pélvico direito, expondo a tíbia. Um fragmento ósseo circular de 4,5 mm de diâmetro foi retirado, com o auxílio de uma broca trefina, nos animais dos dois grupos, e o defeito foi preenchido de acordo com o protocolo de cada grupo. Os animais foram submetidos à avaliação clínica diária com o objetivo de se observar reação inflamatória e sensibilidade dolorosa. Foram realizadas radiografias imediatamente após o procedimento cirúrgico e aos quatro, oito, 15, 30 e 60 dias do pós-operatório para se avaliar o processo de regeneração óssea. Nas mesmas datas, exceto no dia da cirurgia, dois animais de cada grupo foram sacrificados objetivando a coleta de material para histologia. As amostras foram fixadas em formol 10%, tamponado, e processadas segundo técnicas rotineiras de histologia. Os resultados clínicos mostraram que a maioria dos animais teve evolução clínica normal, sem indícios de infecção ou de rejeição do implante. As radiografias mostraram, no grupo tratado, um decréscimo de radiopacidade do defeito, até que a imagem ficasse semelhante ao osso. Já no grupo controle, observou-se o inverso, ou seja, aumento gradual da radiopacidade do defeito. Os resultados histológicos mostraram evolução normal no processo de regeneração óssea nos dois grupos. Entretanto, nos animais tratados, o processo de reparação

óssea se mostrou mais precoce nas observações de 15 e 30 dias, não havendo diferença entre os grupos na observação subsequente. Com isto se conclui que a hidroxiapatita associada à lignina como substituto ósseo é eficiente, não causando reação inflamatória e se mostrando biocompatível.

ABSTRACT

VITAL, Cristiane Carneiro, M.S., Universidade Federal de Viçosa, march, 2005.
Hydroxyapatite associated to lignin in the filling of experimental bone defect in rabbit's tibia. Adviser: Andréa Pacheco Batista Borges.
Committee members: Cláudio César Fonseca and Luiz Gonzaga Pompermayer.

The propose of this work was to evaluate synthetic hydroxyapatite with lignin in solid form as substitute in bone regeneration. Twenty rabbits, from New Zealand race, clinically healthy were used. The animals were divided in two groups with 10 animals each one. Group one received hydroxyapatite associated lignin and group two didn't received the implant. After customary anesthetic and surgical protocol in all the animals, a skin incision was made on lateral surface in the right pelvic member in their third middle. A circular bone fragment with 4,5 mm of diameter was retreated from the tibia in all groups, and the bone defect was filled up as a protocol for each treatment group. The animals were submitted to a daily clinical inspection to observe inflammatory reaction and painful sensibility. Radiographs were taken immediately after the surgery and at four, eight, 15, 30 and 60 days after surgery to evaluate bone healing. At same time, two animals per time period were sacrificed and fragments for histopathological evaluations through optical microscopy were collected. The samples were fixed in 10% formol and processed as customary technical in histopathology. The clinical results showed that most of the animals had a normal clinical evolution without infection or rejection of the implants. The results of the X-rays showed a decreasing of opacity on the bone defect until they look like regular bone in the groups that received hidroxyapatite. In the control group, the X-rays revealed increasing of opacity on the bone defect. The histological results showed normal evaluation of the bone regeneration in control group and in the treated one, although it was more precocious in the group that received hidroxyapatite until the 30th day observation. Therefore, the use of hidroxyapatite associated with lignin as bone substitute showed to be efficient, without inflammatory reaction and showing to be biocompatible.

1- INTRODUÇÃO

As enfermidades ósseas e as fraturas são um sério problema de saúde que afetam significativamente a qualidade de vida de seus portadores. Em muitos casos, o tratamento de falhas ósseas requer o uso de implantes ósseos (KOKUBO et al., 2003). A utilização de biomateriais no reparo de partes danificadas do tecido ósseo tem revolucionado a ortopedia e odontologia atuais. O emprego de substâncias químicas que facilitem a reparação óssea, através da osteogênese, osteoindução e osteocondução vem sendo alvo de pesquisas constantes (BORGES, 1998; FRANCO et al., 2001; LEGEROS, 2002; MORAES, 2002).

Os implantes ósseos mais usados são enxertos alógenos e autógenos, entretanto, a coleta de osso autógeno danifica partes saudáveis do corpo e a quantidade que se consegue coletar é limitada. Além disso, este procedimento aumenta os tempos anestésico e cirúrgico. O uso de enxertos alógenos aumenta os riscos de infecção podendo ocorrer reações de rejeição do implante, e em adição a isso, a quantidade de osso alogênico disponível é limitada (MONCHAU et al., 2002; KOKUBO et al., 2003).

Materiais artificiais implantados em defeitos ósseos são geralmente encapsulados por tecido fibroso e se tornam isolados do osso circunvizinho. Conseqüentemente, eles não se aderem ao osso, e isso tem sido um problema crítico para seu uso na reparação óssea. Desde a década de 70, esse

problema tem sido solucionado através do uso de cerâmicas bioativas que espontaneamente se ligam ao osso (KOKUBO et al., 2003).

Numerosos materiais têm sido utilizados como substitutos ósseos, porém poucos apresentam resultados satisfatórios já que a maioria provoca, em maior ou menor grau, uma resposta imunológica do organismo receptor (MORAES, 2002).

Os biomateriais podem ser definidos como uma substância, ou a combinação de duas ou mais substâncias de origem natural ou sintética que são tolerados de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos vertebrados (CALIXTO, 2001; MORAES, 2002; RODRIGUEZ, 2004). Eles devem ser inertes, degradáveis e ou absorvíveis, além de favorecer o crescimento ósseo por condução, e se possível, por indução. 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).

As propriedades biológicas da hidroxiapatita sintética (HAP) são bem documentadas na literatura. Ela tem sido estudada por tratar-se de uma substância bioativa não tóxica que provoca pouca reação tecidual (MOREIRA et al., 2003). A hidroxiapatita 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 (REZENDE et al., 1998; FRANCO et al., 2001; LEGEROS, 2002). Seu emprego tem sido muito diversificado, sendo utilizada para o preenchimento de falhas ósseas, reconstrução de defeitos ósseos provocados por ressecções cirúrgicas

e revestimento de componentes metálicos para fixação óssea (MOREIRA et al., 2003).

Segundo BORGES (1998), SCHMITZ et al. (1999), FRANCO et al. (2001) e LEGEROS (2002) 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. Por ter excelente capacidade osteocondutora e ser altamente biocompatível, a hidroxiapatita é uma ótima alternativa aos enxertos de osso homólogo e autógeno em falhas ósseas tanto no ser humano como em animais domésticos.

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 fenil-propano. A lignina ocorre na maioria das plantas, mas sua composição não é idêntica em todas elas, já que apresenta variações em sua estrutura básica (SJÖSTRÖM, 1993).

O objetivo deste trabalho foi testar a eficiência da hidroxiapatita associada à lignina, em forma sólida, como substituto ósseo em falha provocada na tíbia de coelhos. O estudo baseou-se na caracterização do tipo de reação que ocorre na osteointegração do material, nos tipos de tecido calcificado que participam desta osteointegração e, ainda, nos tipos de células que participam do processo. Para tanto, foram empregados recursos clínico-cirúrgicos, radiográficos e histológicos.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Implantes ósseos

O tecido ósseo é considerado ideal para enxertos, uma vez que pode ser transplantado com sucesso de um local para outro ou de um indivíduo para outro (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 (PIERMATEI & FLO, 1999; MORAES, 2002; FOSSUM, 2002).

A osteogênese é a formação de tecido ósseo no local da implantação do enxerto, o qual funciona como fonte de células osteoprogenitoras (MORAES, 2002; FOSSUM, 2002). A osteoindução é a capacidade do enxerto ósseo de recrutar e estimular células primitivas, indiferenciadas e multipotenciais do tecido mesenquimal a se diferenciarem em células osteogênicas (PIERMATEI & FLO,1999; ALBREKTSSON & JOHANSSON, 2001; MORAES, 2002). A osteocondução é processo no qual o enxerto serve como um arcabouço para a deposição de vasos sanguíneos e tecido ósseo. O enxerto é lentamente reabsorvido através de atividade osteoclástica e substituído por osso novo (PIERMATEI & FLO,1999; MORAES, 2002; FOSSUM, 2002).

Tomando como referência a origem do biomaterial, os enxertos podem ser classificados como autógeno, ou seja, material orgânico obtido e empregado no mesmo indivíduo, alógeno ou homogêneo, que é o material orgânico obtido de outro indivíduo da mesma espécie e heterógeno ou xenoenxerto, que é o material orgânico obtido de indivíduo de espécie diferente (MELLONIG, 1998). MORAES (2002) considera que o termo enxerto implica na transferência de tecido vivo para um organismo receptor, enquanto que implante refere-se ao material conservado. Os implantes também podem ser constituídos de materiais não biológicos, como metais, cerâmicas e polímeros, sendo denominados de implantes aloplásticos (CALIXTO, 2001; MORAES, 2002).

Os autoenxertos ou enxertos autógenos possuem potencial osteogênico máximo e resposta mais precoce (PIERMATEI & FLO, 1999) principalmente os de osso esponjoso, que além de fornecer fatores de indução óssea, possuem uma estrutura porosa que favorece o crescimento fibrovascular em seu interior (CALIXTO, 2001). São os mais utilizados devido à ausência de resposta imunológica, sendo sempre compatíveis (MORAES, 2002; FOSSUM, 2002). No entanto, este tipo de enxerto tem a inconveniência da morbidade cirúrgica da fonte doadora, além da disponibilidade limitada do material, problemas arquitetônicos e estruturais do enxerto. Outro problema em potencial é o ritmo de absorção do material, que pode ser mais rápido do que o tempo necessário para que ocorra a regeneração óssea (CALIXTO, 2001; WU et al., 2003; KOKUBO et al., 2003 e RODRIGUES et al., 2003). De acordo com CEHRELI et al. (2003), a alta taxa de reabsorção dos enxertos autógenos é

provavelmente o fator que mais indicaria o uso clínico extenso de materiais sintéticos e biológicos para o tratamento de defeitos ósseos.

Os enxertos alógenos (homógenos) e os xenoenxertos também são uma opção viável (CALIXTO, 2001). Porém deve-se levar em conta o risco de transmissão de doenças e da ativação do sistema imunológico do hospedeiro (PIERMATEI & FLO, 1999; KOKUBO et al., 2003; WU et al., 2003 e RODRIGUEZ 2004).

Na enxertia heterógena tem-se utilizado principalmente ossos de origem bovina, que além de serem amplamente disponíveis, parecem desenvolver alto grau de interação com o tecido ósseo hospedeiro (CALIXTO, 2001).

Os materiais aloplásticos mais comumente utilizados nas cirurgias médicas e odontológicas são os metais ou ligas metálicas (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 os compósitos (amálgama) (CALIXTO, 2001).

2.2- Características da hidroxiapatita sintética (HAP)

A hidroxiapatita natural é o elemento cristalino essencial dos componentes calcificados do esqueleto e é o principal mineral do osso, esmalte, cimento e dentina (YASUNAGA et al., 1999; ONO et al., 2000; CEHRELI et al., 2003).

O grupo de biomateriais que mais se assemelham à composição do osso é o grupo das cerâmicas de fosfato de cálcio (REZENDE et al., 1998; FEHLBERG, 2001; LEGEROS, 2002); dentre as quais a mais difundida é a hidroxiapatita (HAP) cuja estrutura química é representada pela fórmula $C_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. A HAP tem sido produzida sinteticamente desde o início dos anos 70 e tem sido usada clinicamente desde o início dos anos 80 (SCHMITZ et al., 1999).

A HAP é preparada por precipitação em condições básicas e sinterizada usualmente entre 1100 e 1150°C (LEGEROS, 2002). 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 pré-determinados (BORGES, 1998). 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; ONO et al., 2000; LEGEROS, 2002). A HAP é esterilizável e relativamente não absorvível (POLLICK et al., 1995; ONO et al., 2000), é vantajosa por causa de sua composição uniforme, alta biocompatibilidade, segurança (não é tóxica, nem alergênica ou carcinogênica) e pelo fato de sua microestrutura (tamanho dos poros) ser completamente controlável (ONO et al., 2000; NILSSON et al., 2004).

Apesar de clinicamente ser considerada não degradável, análises quantitativas em cães têm mostrado que a hidroxiapatita se degrada (BORGES et al., 2000). Esta degradação é influenciada por vários fatores, sendo que alguns deles são controlados pelo implante; tais como: porosidade, área de

superfície, cristalinidade e tamanho dos cristais (OSBORN & NEWSELY, 1980; POLLICK et al., 1995). Segundo BORGES (1998), outro fator que influencia a degradação da hidroxiapatita, é sua temperatura de síntese. Outros fatores são controlados pelo hospedeiro, dentre eles destacam-se: a espécie animal, o local de implantação e a pressão biomecânica sobre o implante (POLLICK et al., 1995).

2.3 - Regeneração óssea na presença de hidroxiapatita

Por décadas, as cerâmicas de fosfato de cálcio têm recebido atenção na ortopedia e odontologia por causa de sua habilidade de se ligar a tecidos vivos (SUOMINEN et al., 1996; LOPES et al., 2000; KOKUBO et al., 2003). As mais desejáveis propriedades dos materiais de fosfato de cálcio têm sido documentadas na literatura médica. Entre elas, a similaridade na composição do osso mineral, bioatividade, ou seja, habilidade do material de formar uma ligação direta e forte com o tecido ósseo, de formar uma interface direta, única e forte com o osso, além da habilidade de prover um molde para a formação de osso novo, processo denominado de osteocondução (LOPES et al., 2000; SAKANO et al., 2001; LEGEROS, 2002). A principal vantagem dos biomateriais à base de cerâmica é a sua baixa reatividade química, sendo geralmente biocompatíveis (MORAES, 2002). Estudos biológicos, histológicos e biomecânicos da implantação de hidroxiapatita no osso relatam que esta é segura e tem excelente propriedade osteocondutora (YAMAMOTO et al., 2000).

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, sem movimentação (POLLICK et al., 1995).

A estrutura porosa da hidroxiapatita funciona como um suporte passivo a neoformação vascular, o que leva a proliferação de fatores indutores da aposição óssea (BORGES, 1998). Segundo VIDIGAL JR & GOISMAN (2003) a superfície porosa da hidroxiapatita parece fornecer um substrato adicional à proliferação do tecido ósseo. De acordo com RODRIGUEZ (2004), outra vantagem desta estrutura porosa é a redução da ocorrência do fenômeno de encapsulamento, aumentando a velocidade de crescimento tecidual. A hidroxiapatita permite a junção, proliferação, migração e expressão fenotípica de células ósseas permitindo a formação de novo osso em aposição direta ao biomaterial (SAKANO et al., 2001; LEGEROS, 2002). Os eventos que ocorrem na interface entre o implante e os tecidos adjacentes são resultado direto de reações químicas, mecânicas, fisiológicas e celulares evocadas pela presença deste no organismo (SUN et al., 1997).

OONISHI et al. (1997) listaram algumas vantagens do uso de hidroxiapatita, tais como: ausência de imunoreação; ausência de deslocamentos pós-operatórios se pequenos blocos e fragmentos forem adequadamente posicionados durante a cirurgia e presença de pequeno grau de absorção pós-operatória da hidroxiapatita, com substituição por tecido ósseo. Como desvantagem, os autores destacaram que as partículas de hidroxiapatita tendem a não ficar fixas em locais onde há sangramento. ONO et al. (2000) e RODRIGUES et al. (2003), demonstraram que a capacidade da

hidroxiapatita em resistir a impactos está ligada à porosidade e espessura do implante. Quanto mais porosa, menos resistente ela se torna, exigindo um aumento na espessura do implante para compensar esta diminuição de resistência (OSBORN & NEWSELY, 1980; ONO et al., 2000). Além disso, se o implante não for bem fixado ele pode ser removido do local, reduzindo assim a eficácia do mesmo. Além de ser importante com relação à resistência do material, a porosidade da hidroxiapatita também regula mecanicamente o crescimento celular e vascular. Poros maiores favorecem a invasão de células e vasos, permitindo o crescimento ósseo (BORGES, 1998; ONO et al, 2000 e ORR et al., 2001).

A hidroxiapatita possui pequena resistência mecânica, por este motivo sua aplicação clínica é limitada a áreas onde não há suporte de peso ou em cavidades ósseas (BORGES, 1998; YASUNAGA et al., 1999; RODRIGUEZ, 2004).

OONISHI et al. (1997), após a implantação de hidroxiapatita no fêmur de coelhos, observaram, após três semanas, que houve formação de osso trabecular entre várias partículas do implante. 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 radioluscentes 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. Sua implantação promove osteointegração com poucas complicações.

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 o defeito possuía características de osso normal. FRANCO et al. (2001) observaram em seu experimento, por um período de 120 dias, que o processo de reparação óssea observado nos animais tratados com hidroxiapatita sintética foi normal e semelhante ao dos animais do grupo controle.

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.

2.4 - Hidroxiapatita associada a outros componentes:

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 cobertos com hidroxiapatita, o que lhes confere uma superfície bioativa, induzindo assim a união direta entre o implante e o tecido ósseo (KOKUBO et al., 2003; PORTER et al., 2004). VIDIGAL JR. & GOISMAN (2003) utilizando implantes de titânio puro e implantes de titânio recobertos com hidroxiapatita, observaram que ocorre maior formação de tecido ósseo em torno dos implantes cobertos com hidroxiapatita do que nos implantes de titânio. Os implantes cobertos com hidroxiapatita apresentaram uma

percentagem média de contato ósseo em torno de 75,9%, enquanto que os implantes de titânio puro apresentaram em torno de 50% de contato ósseo, sendo essa uma diferença significativa.

A hidroxiapatita pode ser associada a diversos materiais principalmente com o intuito de potencializar sua característica osteocondutora, sua capacidade de fixação ao osso e sua resistência mecânica (MORAES, 2002; RODRIGUEZ, 2004).

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 associada ao colágeno e associada ao lipossoma na tíbia de cães, FRANCO (2000) observou que o processo de reparação óssea nos animais tratados com os dois tipos de compósito foi normal e semelhante a dos animais que não receberam tratamento. FRANCO (2000) e RODRIGUEZ (2004), observaram que a associação da hidroxiapatita com o colágeno retarda a processo de reparação óssea, demonstrando ter menor capacidade osteocondutora do que a hidroxiapatita associada a outros componentes.

RODRIGUEZ (2004) relatou um aumento na atividade osteocondutora da hidroxiapatita quando esta foi associada ao alandronato de sódio, um bifosfanato inibidor da reabsorção óssea.

Nos estudos de VITAL (2003) e VITAL et al. (2005), onde se utilizou hidroxiapatita associada ao carbono e ao carbono e fosfato biácido de sódio constatou-se que ambos os compósitos eram biocompatíveis e possuíam propriedade osteocondutora.

2.5 - Hidroxiapatita associada à lignina:

A lignina é basicamente um polímero aromático constituído de 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 a 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 utiliza outros polímeros.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Para realização deste experimento, foram utilizados 20 coelhos adultos, fêmeas, clinicamente sadios, da raça Nova Zelândia, provenientes do setor de cunicultura do Departamento de Zootecnia da UFV. Os animais selecionados foram alojados em gaiolas individuais, onde receberam ração comercial uma vez ao dia e água à vontade. Os animais receberam uma dose única de 0,2 ml de ivermectina¹ antes de serem confinados nas gaiolas.

A hidroxiapatita sintética (HAP-91)² 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 900⁰C. O cálcio da HAP-91 foi determinado por volumetria de oxirredução 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. Com este material foram, então, obtidos blocos circulares de 4,5 mm de diâmetro.

Foram constituídos dois grupos aleatoriamente com 10 animais em cada. Os animais do grupo um receberam hidroxiapatita associada à lignina (grupo tratado) e os animais do grupo dois não receberam tratamento (grupo controle).

¹ Mogimec® Mogivet, São Paulo, Brasil

² HAP-91 - J.H.S. Laboratório Químico Ltda, Belo Horizonte, Brasil

Em todos os animais, foi produzida uma falha óssea no terço médio da tíbia direita conforme descrição a seguir: foi feita tricotomia e desengorduramento com éter do membro pélvico direito. Em seguida, os animais foram sedados com acepromazina³ 1% na dose de 0,2 mg/Kg por via intravenosa e anestesiados com Bubivacaína⁴ a 0,5% na dose de 0,5 ml/kg, por via epidural, através do espaço intervertebral lombo-sacro. O campo operatório foi preparado de maneira rotineira. Foi feita incisão na face medial no terço médio do membro pélvico direito, expondo a tíbia por meio de incisão longitudinal da pele e afastamento do tecido muscular (fig. 1 A e B). Em seguida, foi produzido um orifício córtico-medular na metáfise tibial proximal, utilizando-se uma broca trefina de 4,5mm de diâmetro (fig. 1C) no qual foi introduzido, então, um bloco circular de diâmetro igual ao da broca, de hidroxiapatita associada à lignina (HAL) nos animais do grupo um.

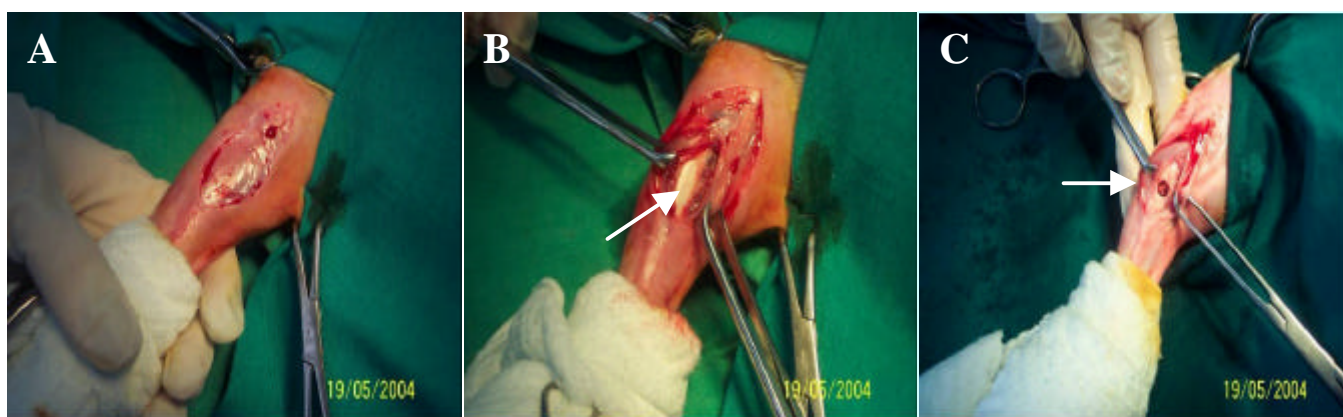


Figura 1. Etapas do procedimento cirúrgico. A: após a incisão de pele; B: exposição da tíbia (seta); C: falha óssea experimental (seta)

³ Acepram® Univet S.A., São Paulo, Brasil

⁴ BubiAbbott® Abbott Laboratórios do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil

No grupo dois este defeito provocado não recebeu tratamento, sendo utilizado como controle. Os tecidos incisados foram suturados utilizando-se náilon cirúrgico e padrão simples contínuo. Não foi utilizado nenhum tipo de antibiótico nem antiinflamatório durante o período experimental.

Os animais foram submetidos a observações diárias da ferida cirúrgica durante uma semana, avaliando-se o grau de reação inflamatória baseado na presença de edema e dor que foram graduadas em ausente, discreta, moderada e intensa. Avaliou-se, ainda, a presença de hemorragia, de secreção purulenta e de deiscência de sutura que foram classificadas em ausente ou presente.

O edema foi considerado discreto quando se limitou ao local da incisão cirúrgica, moderado quando se notou aumento de volume também na face lateral do membro e intenso quando se estendeu por todo o membro.

Para se avaliar a dor e o desconforto dos animais, procedeu-se à palpação da área operada com as seguintes observações: na ausência de dor, o animal não demonstrou nenhum tipo de reação ao toque digital da área operada. A dor foi considerada discreta quando manifestada após o toque digital, moderada quando o animal relutava em se movimentar e intensa quando, além das características de dor discreta e moderada o animal se mostrou prostrado e sem interesse pelo alimento. A análise dos resultados clínico-cirúrgicos comparou, de maneira descritiva, a presença e a evolução da resposta inflamatória, de hemorragia e de infecção entre os grupos.

Para análise radiológica foram realizadas radiografias dos membros operados nas posições mediolateral e craniocaudal em todos os animais, imediatamente após a cirurgia e aos quatro, oito, 15, 30 e 60 dias do pós-

operatório, visando a comparação entre osso controle e o osso tratado. As radiografias foram analisadas quanto a radiopacidade e classificadas em diferentes graus, sempre comparando a falha óssea à cortical do osso circunvizinho, considerado normal (tab. 1). Os resultados foram interpretados com auxílio de análise de variância não paramétrica empregando-se o teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 1. Classificação do grau de radiopacidade na região da falha óssea de coelhos do grupo controle e do grupo tratado com hidroxiapatita associada à lignina

GRAU	CARACTERIZAÇÃO RADIOGRÁFICA
0	Radiopacidade intensamente menor do que a cortical do osso circunvizinho
1	Radiopacidade discretamente menor do que a cortical do osso circunvizinho
2	Radiopacidade igual a cortical do osso circunvizinho
3	Radiopacidade maior do que a cortical do osso circunvizinho

Para análise histológica, dois animais do grupo controle e dois animais do grupo tratado eram sacrificados aos quatro, 8, 15, 30 e 60 dias do pós-operatório com super dosagem de pentobarbital sódico, a fim de que seu membro pélvico direito fosse amputado na articulação coxofemoral. O membro amputado, ainda com os tecidos moles, foi fixado em solução de formol 10% tamponado por 24 horas, após o que foi realizada a coleta de material, de aproximadamente 1,0 x 1,0 x 1,0 cm na região em que se implantou a hidroxiapatita. Fragmentos de mesmas dimensões foram retirados dos animais do grupo controle.

As amostras foram, fixadas em formol a 10%, tamponado, por aproximadamente 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, com duração média de 15 dias. A seguir, foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcoois 70, 80, 90 e 100% por aproximadamente 12 horas em cada etapa, com uma repetição no álcool absoluto e diafanizadas em dois banhos de xilol, por duas horas cada.

Os fragmentos foram embebidos em parafina e mantidos em estufa a 58°C durante uma noite, e então, incluídos em parafina. A seguir, cortes de 7 µm foram obtidos em micrótomo rotativo e montados em lâminas de vidro. De cada bloco de parafina foram obtidas pelo menos dois cortes histológicos, que foram então submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina, visando a análise histológica da amostra em microscópio óptico.

Os resultados histológicos foram interpretados através de análise descritiva avaliando-se o padrão de regeneração tecidual com base nos graus de proliferação e diferenciação celular no tecido cicatricial, de neoformação óssea, de incorporação da hidroxiapatita ao osso e de maturação do osso neoformado, proliferação de medula óssea e a taxa de absorção do material investigado.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Aspectos clínicos e cirúrgicos:

Durante o período trans-operatório, após a confecção do defeito ósseo, evidenciou-se hemorragia em todos os animais, mas a hemostasia por compressão, indicada por BORGES (1998) e REZENDE et al. (1998) foi eficiente permitindo o preenchimento da falha óssea com o implante nos animais do grupo tratado. Contudo não se evidenciou hemostasia total ao final do procedimento, o que também foi observado por RODRIGUEZ (2004), havendo necessidade de se realizar uma bandagem compressiva no pós-operatório imediato em três animais do grupo tratado e em quatro animais do grupo controle. Nos outros animais o sangramento foi contido com a simples sutura dos tecidos incisados.

Algumas horas após a cirurgia todos os animais apresentaram deambulação normal, ou seja, apoiaram normalmente o membro operado, estando este fato de acordo com o observado por BORGES (1998); REZENDE et al. (1998) e FRANCO et al. (2001). Porém nestes trabalhos o modelo experimental foi o cão e no atual, o coelho.

Não houve diferença perceptível entre os animais dos dois grupos quanto ao edema apresentado nos primeiros sete dias do pós-operatório (tab. 2). Apenas um animal do grupo controle apresentou edema moderado no

terceiro dia após o procedimento cirúrgico, ocorrendo deiscência de sutura no quinto dia. Este mesmo animal manifestou dor moderada no terceiro dia de pós-operatório. Todos os outros animais manifestaram dor discreta somente no primeiro dia após a cirurgia (tab. 3).

Em dois animais do grupo controle (20% dos animais) e em um do grupo tratado (10% dos animais) observou-se a presença de secreção purulenta no local da incisão. Estes resultados diferem do que foi descrito por BORGES (1998), MORAES (2002) e CEHRELI et al. (2003), que não observaram quaisquer indícios de reação inflamatória no pós-operatório. Pelo fato de tanto animais do grupo controle quanto do grupo tratado terem apresentado sinais locais de inflamação, atribui-se este fato ao trauma tecidual causado pela técnica cirúrgica e não à reação ao implante.

Tabela 2. Classificação do edema no pós-operatório avaliado durante exame clínico imediatamente após o procedimento cirúrgico (dia 0) até 7 dias nos animais do grupo controle (GC) e nos animais do grupo tratado com HAL (GT).

DIA	AUSENTE n ^o de coelhos		DISCRETO n ^o de coelhos		MODERADO n ^o de coelhos		INTENSO n ^o de coelhos	
	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT
0	10	10	0	0	0	0	0	0
1	5	4	5	6	0	0	0	0
2	9	10	1	0	0	0	0	0
3	9	10	0	0	1	0	0	0
4	9	10	0	0	1	0	0	0
5	7	8	0	0	1	0	0	0
6	7	8	1	0	0	0	0	0
7	8	8	0	0	0	0	0	0

Tabela 3. Classificação da dor no pós-operatório avaliada durante exame clínico imediatamente após o procedimento cirúrgico (dia 0) até 7 dias nos animais do grupo controle (GC) e nos animais do grupo tratado (GT).

DIA	AUSENTE n ^o de coelhos		DISCRETA n ^o de coelhos		MODERADA n ^o de coelhos		INTENSA n ^o de coelhos	
	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT
0	10	10	0	0	0	0	0	0
1	3	5	7	5	0	0	0	0
2	9	10	1	0	0	0	0	0
3	8	10	1	0	1	0	0	0
4	9	10	0	0	1	0	0	0
5	7	8	0	0	1	0	0	0
6	7	8	1	0	0	0	0	0
7	8	8	0	0	0	0	0	0

4.2 - Aspectos radiológicos:

Os resultados radiográficos dos animais do grupo controle obtidos imediatamente após a cirurgia revelaram radiopacidade grau 0 na região do defeito, uma vez que a falha óssea experimentalmente produzida foi mantida sem qualquer preenchimento (fig. 2A e tab. 4).

Já no grupo tratado, observou-se no mesmo período, radiopacidade semelhante à cortical do osso vizinho, ou seja, grau 2 (tab. 4), o que difere do descrito por BORGES (1998), DUARTE (2003) e RODRIGUEZ (2004) que relataram a ocorrência de radiopacidade grau 3 nos animais tratados com hidroxiapatita. Esta diferença pode ser devida ao fato de que no presente experimento a hidroxiapatita foi associada à lignina e nos trabalhos citados foi usada hidroxiapatita pura e em pó. Além disso, deve-se considerar também que as espécies animais estudadas foram diferentes. Nas radiografias feitas aos quatro, oito, 15, 30 e 60 dias a radiopacidade da hidroxiapatita foi gradualmente diminuindo até apresentar grau 1 (fig. 3). Este fenômeno era esperado e foi descrito por BORGES et al. (2000) devido à invasão de tecido conjuntivo junto ao processo normal de reparação óssea. Deve-se considerar ainda que não há alteração na densidade da hidroxiapatita, uma vez que seu número atômico não se altera. Entretanto, o crescimento do tecido conjuntivo e do tecido ósseo, ao longo do tempo e ao redor das partículas de hidroxiapatita, contribui para diminuição de sua radiopacidade (REZENDE et al., 1998).

Assim como descrito por YAMAMOTO et al. (2000), as radiografias obtidas imediatamente após o procedimento cirúrgico mostraram que a hidroxiapatita foi bem implantada no osso (fig. 3A). Isso demonstra que apesar

de ter ocorrido sangramento em todos os animais no momento da cirurgia ele não foi suficiente para remover a hidroxiapatita do sitio receptor. A hidroxiapatita não ter sido removida pelo sangramento ocorrido no local da fratura provavelmente se deve ao fato de que no presente trabalho foi usada uma hidroxiapatita sólida, o que facilita a sua colocação no sítio receptor e dificulta a remoção de suas partículas pelo sangue.

Com quatro dias, a análise radiográfica dos defeitos tratados não mostrou sinais de redução de radiopacidade ou quaisquer sinais de reação óssea e de absorção do implante (fig. 3B). No grupo controle, a falha permaneceu com radiopacidade 0 (tab. 4), porque, neste período, o tecido presente na falha ainda não possuía radiopacidade suficiente para ser registrada no exame radiográfico. Segundo FEHLBERG (2001), em todo processo de reparação óssea, inicialmente se desenvolve tecido conjuntivo 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.

Aos oito dias de pós-operatório, ainda não se notou diminuição de radiopacidade do implante na maioria dos animais. Apenas em um animal pôde-se observar a presença de um halo radiotransparente (radiopacidade grau 0) na periferia do implante. Isso sugere um processo de absorção da hidroxiapatita na periferia do defeito, como observou radiograficamente DUARTE (2003). Ou ainda, isto pode sugerir a invasão de tecido conjuntivo precedendo a formação óssea na periferia do defeito após a absorção da hidroxiapatita (FEHLBERG, 2001). No grupo controle a falha óssea continuou radiotransparente, e em ambos os grupos não havia sinais de reação óssea

periosteal (fig. 2C). Esta diferença significativa de radiopacidade entre os grupos tratado e controle, comprovada pela análise estatística, pode ser explicada pelo alto número atômico da hidroxiapatita, que faz com que ela apareça ao raio X como uma estrutura radiopaca.

Tabela 4. Radiopacidade média do centro e da periferia do defeito ósseo produzido experimentalmente na tíbia de coelhos. Comparação com o osso vizinho. GC: grupo controle; GT: grupo tratado

<i>Dias do pós-operatório</i>	<i>nº de animais</i>	GC	GC	<i>nº de animais</i>	GT	GT
		<i>Periferia do defeito</i>	<i>Centro do defeito</i>		<i>Periferia do defeito</i>	<i>Centro do defeito</i>
Logo após a cirurgia	10	0	0	10	2s	2s
4	10	0	0	10	2s	2s
8	8	0	0	8	1,75*s	2s
15	6	1	0	6	1ns	2s
30	4	2	1	4	2ns	1ns
60	2	3	2	2	3ns	1ns

0- Ausência de radiopacidade

1- Radiopacidade menor do que a do osso vizinho

2- Radiopacidade semelhante a do osso vizinho

3- Radiopacidade maior do que a do osso vizinho

* Um animal apresentou grau 0 na periferia do defeito

s- Indica diferença significativa entre o grupo tratado e o grupo controle pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade

ns- Indica que não houve diferença significativa entre o grupo tratado e o grupo controle pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade

Aos 15 dias pôde ser observada reação periosteal em todos os animais dos dois grupos. Esse achado difere do descrito por MOREIRA et al. (2003) que relataram a ocorrência desse tipo de reação somente a partir de 30 dias. Esse fenômeno, macroscopicamente, pareceu ser mais evidente nos animais tratados com hidroxiapatita. Em todos os animais pôde-se sugerir começo de crescimento ósseo, observado pelo aumento da radiopacidade do defeito, da periferia para o centro do mesmo, paralelamente à diminuição da radiopacidade da hidroxiapatita. No grupo controle, aos 15 dias notou-se ligeiro

aumento de radiopacidade (grau 1), que assim como no grupo tratado, ocorreu da periferia para o centro da falha óssea (tab. 4). Segundo a análise estatística utilizada, aos 15 dias não houve diferença significativa entre os grupos, considerando-se apenas a periferia do defeito. Este fenômeno pode ser explicado pelo fato de que aos 15 dias provavelmente existia crescimento ósseo da periferia para o centro do defeito nos dois grupos, ao mesmo tempo em que a hidroxiapatita possivelmente era absorvida no grupo tratado.

Após 30 dias, em ambos os grupos, notou-se intensa reação periosteal, não havendo diferença macroscópica e nem estatística entre grupo controle e tratado tanto no centro quanto na periferia do defeito. Observou-se crescimento da cortical e formação de ponte óssea. Na periferia do defeito pôde-se notar radiopacidade semelhante à do osso normal (grau 2), o que também foi observado por REZENDE et al. (1998), BORGES (1998) e FEHLBERG (2001), sendo este fato, um indicativo radiográfico de que havia ocorrido um processo completo de reparação óssea.

Aos 60 dias, observou-se o defeito ósseo preenchido por estrutura radiopaca em todos os animais, embora a radiopacidade da falha não fosse totalmente semelhante à do osso normal (fig. 2F), assim como o descrito por FRANCO (2000). Nos animais dos dois grupos, notou-se radiopacidade grau 3 na periferia do defeito (fig. 2F e 3F). Nos animais do grupo controle observou-se, no centro do defeito, grau 2 e nos animais do grupo tratado, grau 1, sendo que era evidente a presença de ponte óssea unindo a cortical proximal e distal. Nos animais tratados, o implante ainda era visível, preenchendo quase toda a falha óssea, sem diferença significativa entre os grupos, sendo este fato sugestivo da ocorrência de reparação óssea (fig. 3F).

Considerando-se somente os aspectos radiológicos, não parece ter havido diferença na velocidade da reparação óssea entre os grupos controle e tratado, o que também foi observado por FRANCO (2000). A lignina não pareceu interferir negativamente no processo de reparação, já que aos 60 dias se observaram indícios radiográficos de que a falha óssea estava completamente preenchida por tecido ósseo em todos os animais do grupo tratado. Este fato está de acordo com o descrito por BORGES (1998) que aos 60 dias de pós-operatório observou reparação óssea completa na tíbia dos animais que foram tratados com hidroxiapatita pura.

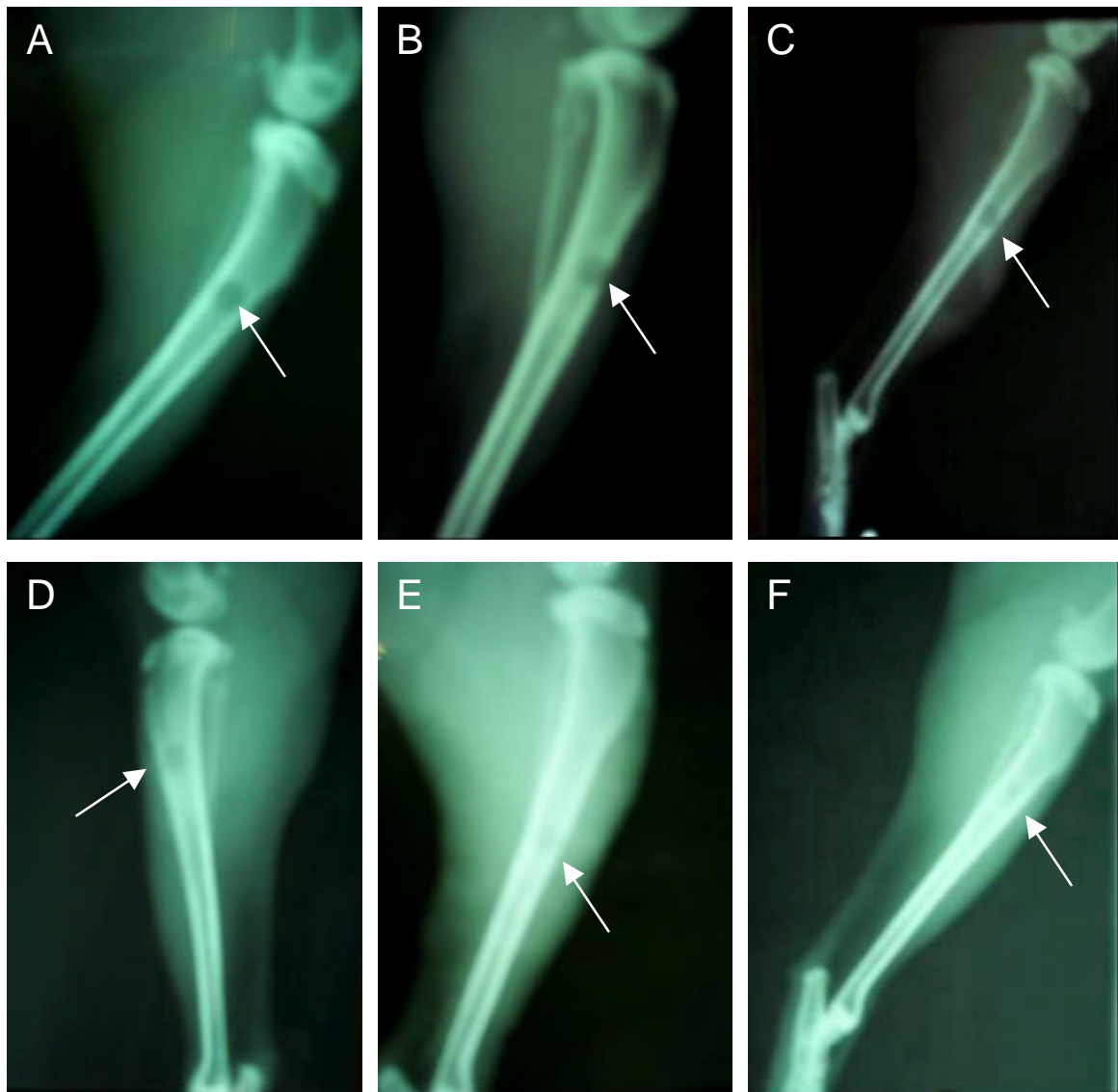


Figura 2. Radiografia da tíbia de coelhos do grupo controle em posicionamento mediolateral. A, dia 0, radiopacidade grau 0; B, 4 dias, radiopacidade grau 0; C, 8 dias, radiopacidade grau 0; D, 15 dias, radiopacidade grau 0; E, 30 dias, radiopacidade grau 1 e F, 60 dias, radiopacidade grau 2. A seta evidencia o defeito ósseo.

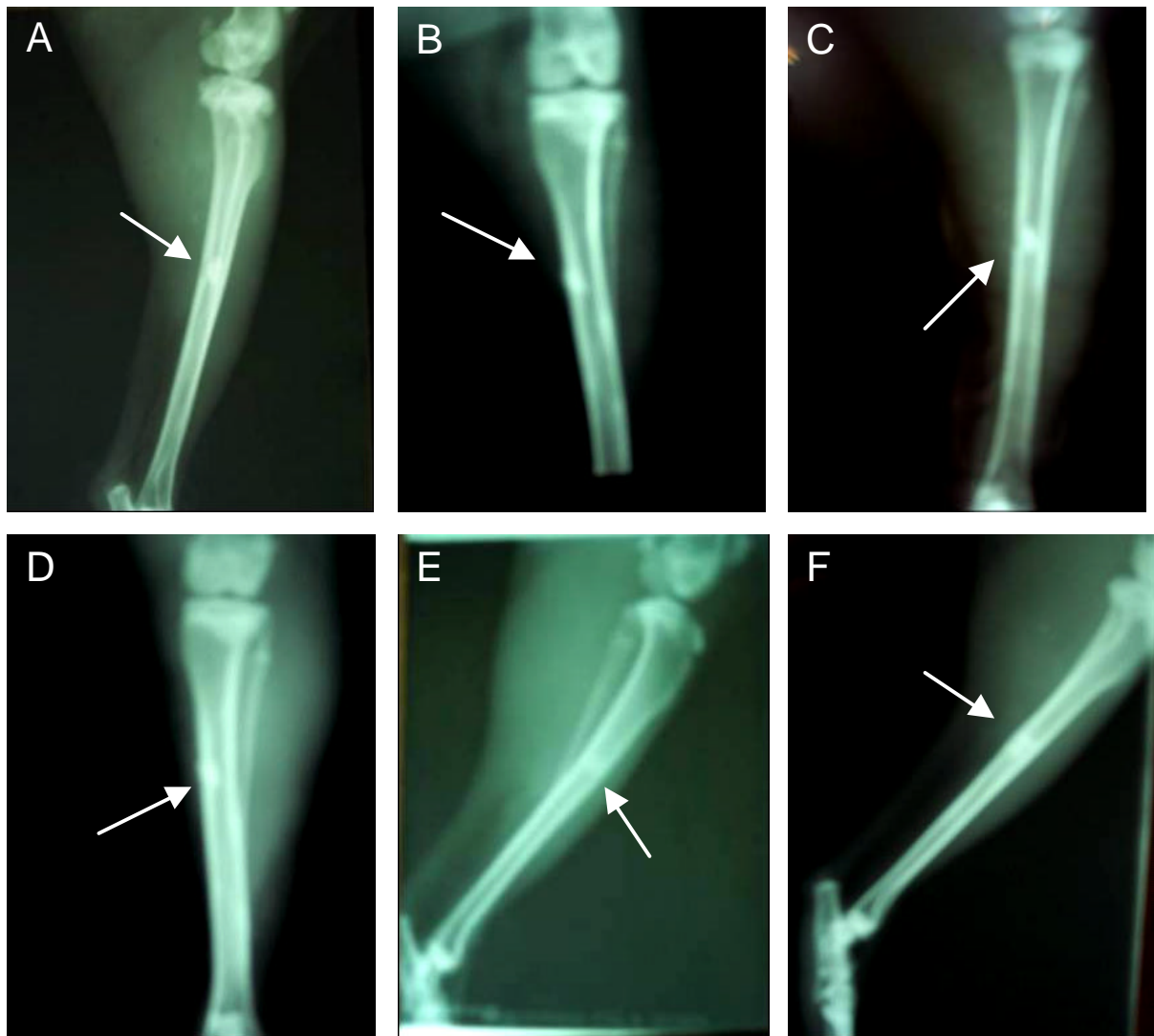


Figura 3. Radiografias da tíbia de coelhos tratados com hidroxiapatita associada à lignina em posicionamento craniocaudal (B, C e D) e mediolateral (A, E e F). A, dia 0, radiopacidade grau 2; B, 4 dias, radiopacidade grau 2; C, 8 dias, radiopacidade grau 2; D, 15 dias, radiopacidade grau 1; E, 30 dias e F, 60 dias, radiopacidade grau 1. Seta: hidroxiapatita preenchendo o defeito ósseo.

4.3 - Aspectos histológicos:

A caracterização da presença da hidroxiapatita foi feita por meio de análise histológica. Esta se apresentou sob a forma de material amorfo, acelular, bem delimitado e sem afinidade pelo corante utilizado, como caracterizado por BORGES (1998) e VITAL (2003).

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 de rejeição ao implante, estando estes resultados de acordo com o descrito por YASUNAGA et al. (1999) e CEHRELI et al. (2003).

Aos quatro dias do pós-operatório, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado não havia nenhuma indicação de formação óssea, porém havia uma grande quantidade de osteoblastos nas bordas da lesão. Em ambos os grupos foram observados extravasamento de sangue decorrente do trauma cirúrgico (fig. 4A e B). No grupo tratado pôde-se notar a presença de tecido conjuntivo frouxo, desorganizado e reabsorção das bordas da fratura, de acordo com o processo normal de regeneração óssea.

No oitavo dia de pós-operatório nos animais do grupo controle, foram observados início de reabsorção das bordas do defeito e a presença de tecido conjuntivo frouxo na sua superfície, assim como descrito por BORGES (1998), FRANCO (2000) e DUARTE (2003). Em um dos animais o defeito estava preenchido por tecido de granulação altamente vascularizado, e ainda se podia notar o mesmo extravasamento de sangue que foi observado aos quatro dias. Também foi observado tecido ósseo trabecular que se formava à partir das

bordas do defeito, sendo que nestes locais observou-se grande quantidade de osteoblastos (fig. 5), caracterizando um processo normal de reparação óssea, conforme o descrito por FLACH et al. (2002).

Já no grupo tratado, aos oito dias observou-se a presença de tecido conjuntivo frouxo, desorganizado nas bordas do defeito (fig. 6) e tecido conjuntivo fibroso ao redor das partículas de hidroxiapatita. Foi observada uma pequena área de neoformação óssea circundando o implante. Este atraso no grupo tratado, quando comparado ao grupo controle, pode ser devido à inibição inicial da formação óssea pela hidroxiapatita, que provavelmente atua como corpo estranho como descrito por BORGES (1998) e DUARTE (2003). No entanto, este achado difere do relatado por TAMPIERI et al. (2001), que observaram no mesmo período, 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 (2000), utilizando hidroxiapatita associada ao lipossoma, observou aos oito dias, formação de osso trabecular ao redor do implante, com numerosos osteoblastos na superfície trabecular.

No grupo tratado, foi observado, aos 15 dias de pós-operatório, que a hidroxiapatita estava praticamente envolvida por osso trabecular (fig. 4F), o que também foi observado por LOPES et al. (2000) e DUARTE (2003), e havia a presença de tecido conjuntivo denso e intensa vascularização. Como descrito por BORGES (1998), BORGES et al. (2000) e FRANCO (2000), evidenciou-se um grande aporte sanguíneo para a área, o que configura importante fator nos processos de reparação óssea.

Nos animais do grupo controle também se observou formação de tecido ósseo trabecular a partir das bordas da lesão. Assim como no grupo tratado, este tecido se mostrou muito ativo, com um grande número de osteoblastos, assim como observado por BORGES (1998) e CEHRELI et al. (2003). Entretanto, o tecido ósseo formado nos animais do grupo tratado, aos 15 dias, mostrou-se mais organizado e com trabéculas ósseas mais espessas do que o tecido formado nos animais do grupo controle (fig. 4E e F). Este fato, de acordo com BORGES (1998), é sugestivo da característica osteocondutora da hidroxiapatita, o que a torna desejável como substituto ósseo.

Aos 30 dias após a cirurgia, os animais de ambos os grupos mostraram tecido ósseo trabecular preenchendo toda a falha (fig. 7A e B), como descrito por BORGES (1998), FRANCO (2000) e LOPES et al. (2000).

Nos animais do grupo controle observou-se a presença de tecido conjuntivo denso no centro do defeito e osso trabecular que se formou do osso compacto a partir das bordas da lesão, o que segundo POLLICK et al. (1995) e FEHLBERG (2001), é característico de um processo de reparação normal. Assim como nas observações anteriores, este tecido se mostrou muito ativo, com uma grande presença de osteoblastos (fig. 7A).

No grupo tratado, aos 30 dias observou-se a presença de um tecido ósseo muito ativo, e ricamente vascularizado. Envolvendo a hidroxiapatita pôde-se notar a presença de tecido conjuntivo denso bem vascularizado, porém em menor quantidade do que o observado aos 15 dias, fato também descrito por BORGES (1998) e, assim como no grupo controle, osso trabecular a partir das bordas da lesão (fig. 7B). Na observação de 30 dias pôde-se observar, assim como descrito aos 15 dias, formação óssea mais evidente no

grupo tratado, evidenciando-se trabéculas ósseas mais espessas e sistemas de Havers mais organizados, fato este indicativo da característica osteocondutora da hidroxiapatita, sugerindo um processo de reparação óssea mais adiantado.

Aos 60 dias, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado observou-se uma extensa formação óssea, sendo que esse tecido se mostrou mais desenvolvido do que aos 30 dias. Nesta data, o tecido ósseo formado apresentou características de osso compacto lamelar, com ósteons bem definidos (fig. 7C e D) e pouca atividade celular. Diferente de OONISH et al. (1997) e FRANCO (2000), no presente trabalho não se observaram diferenças marcantes na formação óssea dos grupos controle e tratado aos 60 dias, sugerindo que o processo de reparação óssea estava completo.

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 ao final deste período, 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. Entretanto, durante a evolução do experimento, foi observada, visualmente, a diminuição da quantidade de hidroxiapatita, tendo este fato também sido observado por BORGES (1998).

Diferente do descrito por BORGES (1998) que observou a presença de partículas de hidroxiapatita no interior de macrófagos, neste experimento não se observou sinal de fagocitose do implante, o que poderia sugerir sua

biodegradação. Além disso, as controvérsias relacionadas a biodegradação da hidroxiapatita encontradas em vários experimentos podem ser justificadas pela diferença das características físicas dos tipos de hidroxiapatita (DUARTE, 2003). Além disso, o mecanismo de absorção da mesma é incerto (OONISH et al., 1997; DUARTE, 2003).

Vários fatores provavelmente influenciam a resposta dos tecidos ao implante de hidroxiapatita e a sua degradação. De acordo com OSBORN & NEWSELY, (1980) e POLLICK et al., (1995), estes fatores são o tamanho dos grânulos e a estrutura física da hidroxiapatita, dentre outros, que determinariam sua bioabsorção, a sua biodegradação e a formação óssea. 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 60 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 60 dias não foi um intervalo de tempo suficiente para que ocorra a degradação completa do implante.

Da mesma forma que BORGES (1998) observou-se, neste estudo, a presença de tecido conjuntivo fibroso ao redor das partículas de hidroxiapatita (fig. 4E). Este fato é diferente do descrito por 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.

Assim como o descrito por DUARTE (2003), em nenhum momento se observou qualquer reação de corpo estranho ou infecção. Diferentemente de BORGES (1998) e YAMAMOTO et al. (2000), o tecido que se formou não apresentou celularidade que indicasse uma reação de corpo estranho ou um processo de degradação da hidroxiapatita como a presença de células gigantes mononucleares do tipo fagocitárias. Assim como o observado por DUARTE (2003), não foram evidenciadas áreas de necrose óssea em nenhum dos animais tratados. A ausência de células inflamatórias foi um dos indicativos de que a hidroxiapatita associada à lignina é biocompatível.

Embora na presença do implante a resposta óssea tenha sido mais evidente nas observações de 15 e 30 dias, 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 (2000), e é indicativo da característica osteocondutora da hidroxiapatita.

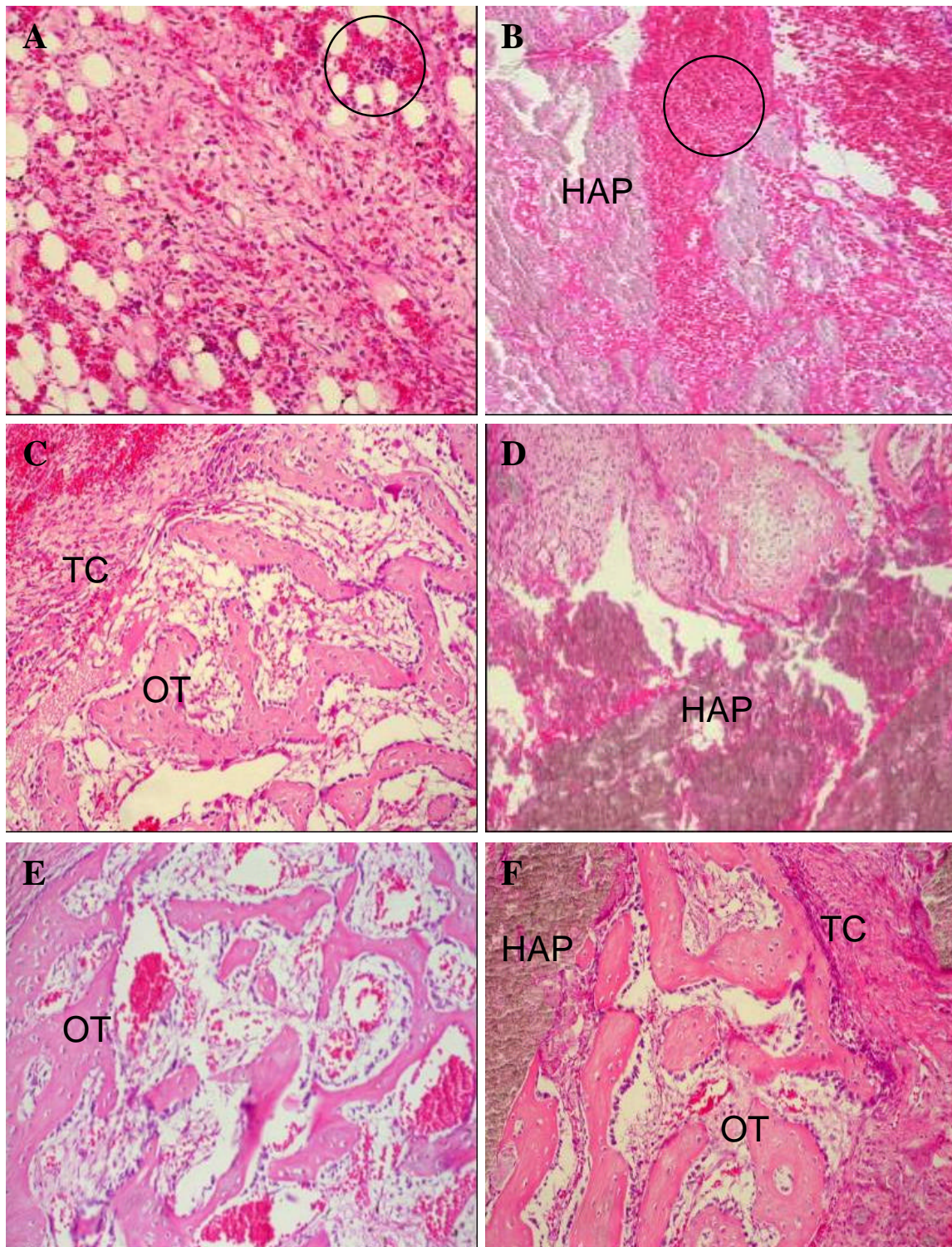


Figura 4. Fotomicrografias da tíbia de coelho dos grupos controle (A, C e E) e tratado (B, D e F). A, 4 dias; 55x. B, 4 dias; 25x. C, 8 dias; 36x. D, 8 dias; 33x. E, 15 dias; 35x. F, 15 dias; 37x. HAP: hidroxiapatita; OT: osso trabecular; TG: tecido de granulação. O círculo indica presença de sangue.

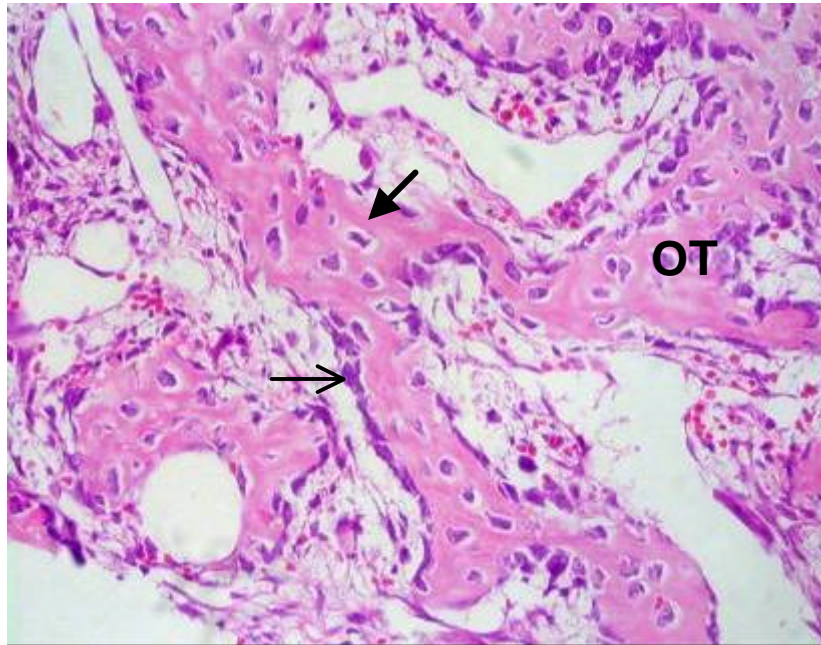


Figura 5. Fotomicrografia da tíbia de coelho do grupo controle aos 8 dias de pós-operatório, 123x. Seta espessa: osteócito encerrado em lacuna. Seta fina: osteoblasto. OT: osso trabecular

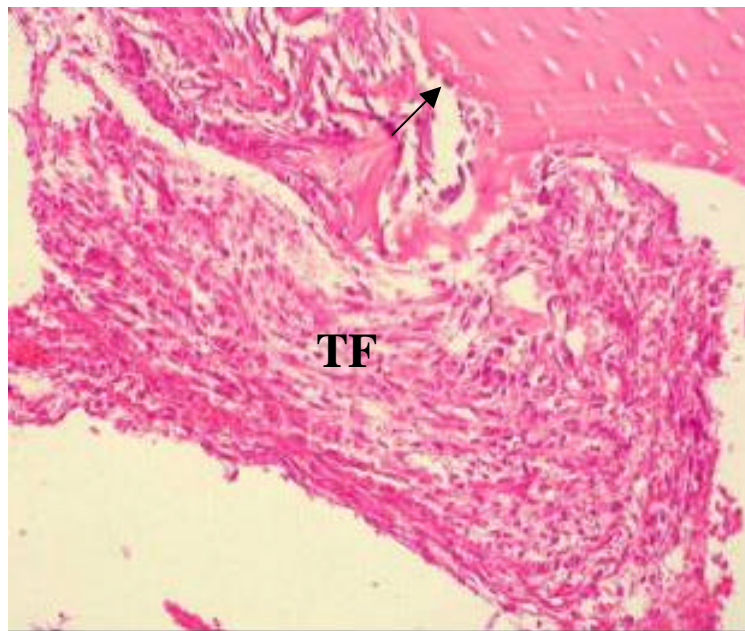


Figura 6. Fotomicrografia da tíbia de coelho do grupo tratado aos oito dias de pós-operatório, 65x. TF: tecido conjuntivo frouxo. Seta: osteoblasto

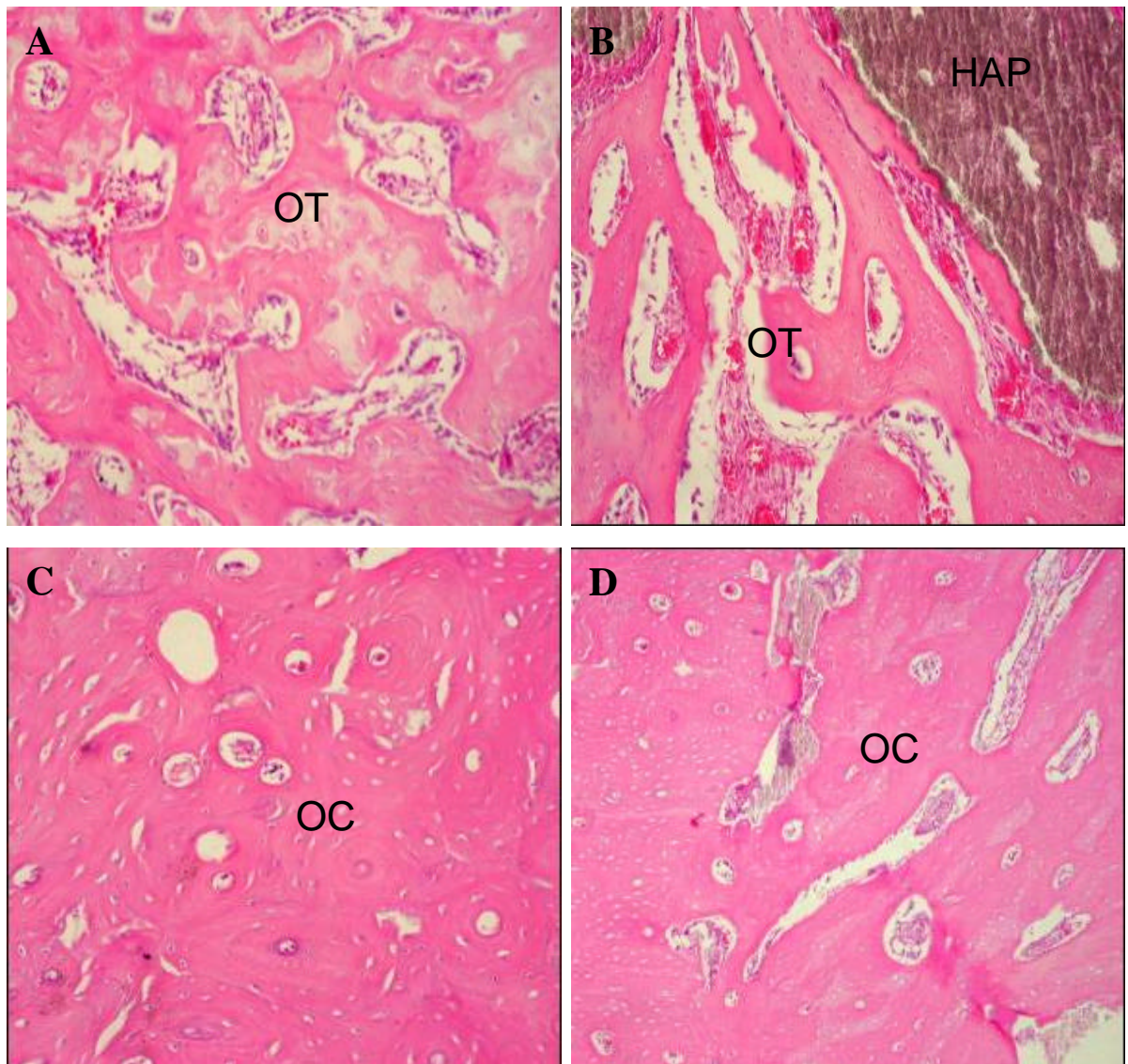


Figura 7. Fotomicrografias da tíbia de coelho dos grupos controle (A e C) e tratado (B e D). A, 30 dias; 35x. B, 30 dias; 31x. C, 60 dias; 57x. D, 60 dias; 29x. HAP: hidroxiapatita; OC: osso compacto; OT: osso trabecular

5 - CONCLUSÃO

Com base nos resultados clínico-cirúrgicos, radiológicos e histológicos, pôde-se obter as seguintes conclusões.

- A hidroxiapatita associada à lignina se mostrou biocompatível, sendo um substituto ósseo eficiente.
- A presença da lignina não provocou nenhum tipo de reação inflamatória ou de rejeição do implante, não alterando, o tempo necessário para que ocorresse a reparação óssea.
- Na presença do implante a resposta óssea foi mais evidente nas observações de 15 e 30 dias, tendo, portanto acelerado o processo de regeneração óssea na fase inicial.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur.Spine J.** v.10, p. 96-101, 2001

BORGES, A.P.B. **O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia de cães. Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodisperção.** 1998. 112p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG

BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M. de F.; RIBEIRO, M.F.B.; et al. Hidroxiapatita sintética (HAP-91) como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. **Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.** v. 52, n. 6, p. 616-620, 2000.

CALIXTO, R. F. E. **Implante de um floculado de resina derivada do 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. 2001. 72p. Tese (Mestrado) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

CEHRELI, M. C.; SAHIN, S.; KESENCI, K. et al. Biological reactions to a poly(L-lactide)-hidroxiapatite composite: A study in canine mandible. **J. Biomat. Appl.** v.17, p. 265-276, 2003.

DUARTE, T. S. **Osseointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães.** 2003. 58f. Tese (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG

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

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 23/02/2003

FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais.** São Paulo: Ed Roca Ltda, 2002. p. 848-853.

FRANCO, K. L. **Avaliação clínico-cirúrgica, radiológica e histológica da reparação óssea após a utilização de HAP-91, COL. HAP-91 e INT.**

HAP-91 em defeito provocado experimentalmente na tíbia de cães.

2000. 22p. Monografia (especialização) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

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 tíbia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. **Arq. Bras. Med. Veter. e Zootec.** v.53, n.4, p.431-436, 2001.

JENSEN, S. S.; AABOE, M.; PINHOLT, E. M. Et al. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.11, n.1, p. 55-66, 1996.

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. **Clinic. Orthop. Rel. Res.** n.395, p.81-98, 2002.

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.** v.48, p.734-740, 2000.

MELLONIG, J.Y. Periodontal Regeneetion: Bone Grafts. In: NEVINS, M., MELLONIG, J., T. **Period. Ther.** Chicago, Quintenssence, 1998, cap. 15, p. 233.

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 rádio de coelhos.** Jaboticabal, SP: UNESP, 2002. 73p. (Tese, Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

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

NILSON, M., WANG, J.S., WIELANEK, L., et al. Biodegradation and biocompatability of a calcium sulphate-hydroxyapatite bone substitute. **J. Bone Joint Surg. Br.** v.86, n.1, 2004

OONISHI, H.; KUSHITANI, S.; YASUKAWA, E. et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. . **Clinic. Orthop. Rel. Res.** n.334, p.316-325, 1997.

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

ONO, I.; TATESHITA, T.; NAKAJIMA, T. Evaluation of a high density polyethylene fixing system for hydroxyapatite ceramic implants. **Biomaterials**. v.21, p.143-151, 2000.

OSBORN, J.F.; NEWSELY, H. The material science of calcium phosphate ceramics. **Biomaterials**. v.1, n.2, p. 108-111, 1980

PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais. São Paulo: Ed. Manole Ltda, 1999. p. 139-140.

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. **J. Oral Maxillofac. Surg.** v.53, p.915-922, 1995.

PORTER, A. E.; TAAK, P.; HOBBS, L.W. et al. Bone bonding to Hydroxyapatite and titanium surfaces on femoral stems retrieved from human subjects at autopsy. **Biomaterials**. v.25, n. 21, p.5199-5208, 2004

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.**, Escola de Veterinária da UFMG, v. 50, n. 5, p.537-545, 1998.

RODRIGUES, C.V.M.; SERRICELLA, P.; LINHARES, A.B.R. et al. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. **Biomaterials**. v.24, n.27, p.4987-4997, 2003

RODRIGUEZ, A., I., R. **Avaliação da reconstituição óssea do rádio de cadelas submetidas ou não a ovariossalpingohisterectomia, utilizando hidroxiapatita com alandronato e hidroxiapatita com colágeno (avaliações densitométricas e radiográficas)** 2004. 58p. Tese (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

SAKANO, H.; KOSHINO, T.; TAKEUCHI, R. et al. Treatment of the instable distal radius fracture with external fixation and a hydroxyapatite spacer. **J. Hand Surg.** v.26, n.5, p.923-929, 2001.

SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O.; MILAM, S.B. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. **J. Oral Maxillofac. Surg.** v.57, p.1122-1126, 1999.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: fundamentals and applications**. San Diego, Academic Press, 1993, 293p.

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.

TAMPIERI, A.; CELLOTI, G.; SPRIO, S. et al. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. **Biomaterials**. v.22, p.1365-1370, 2001.

VIDIGAL JR, G. M.; GOISMAN, M. **Osseointegração x biointegração: Uma análise crítica.** 2003 <http://www.aborj.org.br/rbo/osseointegracao-critica.htm>

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.** 2003. 23p. Monografia. (Especialização). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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. O trabalho encontra-se aprovado para publicação, aguardando paginação. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 2005

YAMAMOTO, T.; ONGA, T.; MARUI, T.; et al. Use of hydroxyapatite to fill cavities after excision of benign bone tumours. **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 hydroxyapatite particles/poly (L-lactide) composites to surface of tibial cortex in rabbits. **Bioceramics.** v. 9, p. 391-394, 1999.

WU, T.; HUANG, H.; LAN, C. Studies on the microspheres comprised of reconstituted collagen and hydroxyapatite. **Biomaterials.** v. 25, n.4, p.651-658, 2003.