

LETÍCIA CORRÊA SANTOS

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

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
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S237c
2012

Santos, Leticia Corrêa, 1984-

Comósito de hidroxiapatita sintética e lignina como promotor de osseointegração entre implante metálico e tecido ósseo: estudo experimental em cães / Leticia Corrêa Santos. – Viçosa, MG, 2012. ix, 49f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Andrea Pacheco Batista Borges.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 39-49

1. Cirurgia veterinária. 2. Cão - Cirurgia. 3. Hidroxiapatita.
4. Lignina. 5. Ortopedia veterinária. 6. Materiais biomédicos.
7. Biocompatibilidade. 8. Cão - Ossos - Regeneração.
9. Materiais biocompatíveis. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.0897

LETÍCIA CORRÊA SANTOS

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

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: 03 de abril de 2012.



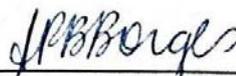
João Carlos Pereira da Silva
(Coorientador)



Alexandre Martins Reis



Emily Correna Carlo Reis



Andréa Pacheco Batista Borges
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Foram oito anos na Universidade Federal de Viçosa até a conclusão de mais essa fase de aprimoramento profissional. Sendo assim, agradeço primeiramente a Deus a oportunidade de estar aqui e de ter tido a felicidade de tantos desafios, conquistas, aprendizados e amizades.

Aos meus avós queridos, Ivan e Tereza, pelo exemplo de vida, amor e humildade. Ao meu pai, José Carlos, pelo apoio incondicional, pelas intermináveis e pacientes conversas, e à minha querida mãe, Iza, pela paciência, companheirismo e carinho. Foi através do patrocínio e crédito dos meus pais, que todos os projetos puderam ser executados.

A meu irmão Gustavo e sua família, por estar de tão longe tão perto, e ter me dado nossa joia mais preciosa, Ana Laura. Aos meus primos irmãos, Aline, Fabrício e Thiago, e todos os demais familiares que sempre de tão solícitos e carinhosos, fazem de nossa grande e unida família, um porto de imensa segurança.

Agradeço a todos os amigos de Viçosa, em especial Luciana, Elisa, Camila, Clara, Renata, Renato, João Paulo e Tatiana Borges, pelo companheirismo e apoio nas mais diversas situações.

Agradeço a todos os meus professores, da graduação e da pós-graduação, em especial Professora Andrea e Professor Ricardo. As oportunidades que me foram dadas na graduação foram decisivas para minhas escolhas profissionais, e minha identificação com a cirurgia veterinária. Esses dois professores são meus grandes inspiradores na cirurgia, tanto na conduta quanto no conhecimento. Guardarei seus ensinamentos para a vida profissional e pessoal.

A todos os funcionários do departamento de veterinária, pela amizade e companheirismo nas tarefas do dia a dia, em especial Maninha, Tatinha, Paulão, Claudio, Carmem, Toninho e Geraldinho.

Na confecção deste trabalho, agradeço aos meus estagiários, Natália, Ana Paula, Gustavo, Rafaela, Tuany e Eveline, que com tanto carinho e comprometimento cuidaram de nossos queridos cães. A todos os colegas que participaram ativamente desse projeto, Camila, Clara, Tatiana Borges, Simone, Tatiana Duarte, Rodrigo, Emily, Fabrício, e todos os funcionários da cirurgia, esterilização e patologia que deram todo o suporte para que a parte prática fosse executada. Aos colegas do departamento de Engenharia de Alimentos da UFV, através do Laboratório de Embalagens da Professora Nilda de Fátima Ferreira Soares e do Departamento de Solos, através do Laboratório de Mineralogia da UFV, coordenado pelo professor Maurício Paulo Ferreira Fontes pelo auxílio em parte das análises.

Em especial, agradeço à minha orientadora, Andrea, que soube transmitir exatamente o significado de sua função nesse trabalho. Orientando-me em todas as atividades, mas principalmente em como resolver os problemas e dificuldades da melhor forma possível... de forma clara, calma e definitiva. A ela o mérito da pesquisa e da formação de mais um pesquisador, tendo-a como exemplo de comprometimento com a vida acadêmica. Obrigada por tudo professora... sou uma trombeta orgulhosa.

Por fim agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPQ) pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou minha permanência em Viçosa para cursar o mestrado, e ao JHS Laboratório Químico Ltda, em especial à Professora Doutora Sheyla Maria Castro Máximo, pelo fornecimento do compósito.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
Introdução	1
Revisão de Literatura	3
1.	B
ioengenharia e Biomateriais.....	3
1.1 Hidroxiapatita	5
1.2 Lignina.....	7
1.3 Compósito	8
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão.....	17
1.	A
valiação clínica trans e pós-operatória.....	17
1.1 Deiscência e infecção da ferida.....	17
1.2 Avaliação da claudicação.....	18
1.3 Avaliação da sensibilidade dolorosa	20
1.4 Avaliação da circunferência tibial	21
2. Aspectos radiográficos	22
3. Teste mecânico de tração	26
4. Avaliação macroscópica	29
5. Difração de raios x (DRx)	31
6. Aspectos histológicos.....	35
Conclusão	38
Bibliografia	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental com a distribuição de grupos por períodos de acompanhamento pós-cirúrgico.	10
Figura 2 - Fotografias do procedimento cirúrgico na tíbia de cães submetidos à cirurgia experimental.	12
Figura 3 - Tíbia sendo submetida a teste de tração na máquina Instron.....	14
Figura 4 - Demonstração do teste de difração de RX em difratômetro	16
Figura 5: Projeção radiográfica médio-lateral da tíbia de cães após o procedimento cirúrgico experimental no primeiro dia de acompanhamento pós-cirúrgico.	24
Figura 6: Projeção radiográfica médio-lateral da tíbia de cães após o procedimento cirúrgico experimental no último dia de acompanhamento pós-cirúrgico respectivo de cada grupo.	25
Figura 7: Gráfico demonstrando a linha de tendência através de regressão linear simples da força média necessária para deslocamento do pino intramedular, através de equação.....	26
Figura 8: Fotografias das epífises proximais das tíbias de cães submetidos à cirurgia experimental.....	29
Figura 9: Fotografia da região medular das tíbias de cães submetidos à cirurgia experimental. Evidencia-se a região rosqueada do pino intramedular de Schanz quanto à presença de material aderido.	31
Figura 10: Difratograma da hidroxiapatita sintética (HAP-91) <i>in vitro</i>	32
Figura 11: Difratograma do compósito testado (HAP-91-L).	32

Figura 12: Difractogramas do material obtido do canal medular das tíbias de cães do MC, ou seja, das tíbias que não receberam o compósito testado.	33
Figura 13: Difractogramas de G1	34
Figura 14: Difractogramas de G2	34
Figura 15: Difractogramas de G3	35
Figura 16: Fotomicrografia da região do defeito para inserção do pino intramedular após 8 dias da realização do procedimento cirúrgico no MT (A) e MC (B) de um mesmo animal.....	37
Figura 17: Fotomicrografia da região do defeito para inserção do pino intramedular após 60 dias da realização do procedimento cirúrgico no MT.	38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Descrição dos escores estipulados para a avaliação clínica dos animais submetidos ao procedimento experimental. 13
- Tabela 2:** Número total de animais para cada grau de claudicação de acordo com os dias de acompanhamento após o procedimento cirúrgico, e os respectivos graus de claudicação para os membros tratados com o compósito HAP-91-L® (MT) e os membros controles, sem o tratamento com o compósito (MC)..... 19
- Tabela 3:** Número total de animais para cada grau de classificação de dor à palpação, de acordo com os dias de acompanhamento após o procedimento cirúrgico. Sendo MT: membro tratado com o compósito HAP-91®-L e MC: membro controle, sem o tratamento com o compósito. 21
- Tabela 4:** Médias e desvio padrão dos valores encontrados no teste de tração, expressas em quilogramas força (Kgf), que representam a força máxima exercida no pino intramedular implantado na tíbia de cães para seu deslocamento..... 27

RESUMO

SANTOS, Letícia Corrêa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2012. **Compósito de hidroxiapatita sintética e lignina como promotor de osseointegração entre implante metálico e tecido ósseo: estudo experimental em cães.** Orientadora: Andrea Pacheco Batista Borges. Co-orientadores: Ricardo Junqueira Del Carlo, João Carlos Pereira da Silva e Maria Verônica de Souza.

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar o compósito HAP-91-L®, formado por hidroxiapatita sintética (20%) e lignina (80%) como promotor de integração entre implante metálico e tecido ósseo. Ambos os membros pélvicos de 15 cães foram submetidos ao procedimento cirúrgico experimental, determinados MT (membro tratado) e MC (membro controle). Através de um orifício na face proximal lateral das tíbias foi retirada medula óssea, que acrescida ao compósito, foi recolocada no canal medular, com posterior implantação do pino intramedular de Schanz no MT. No MC a medula foi triturada com a posterior colocação do pino. Foram realizadas avaliações clínicas durante 15 dias para deiscência, claudicação, sensibilidade dolorosa e edema. Radiografias foram realizadas imediatamente após o procedimento, e nos 8, 60 e 150 dias subsequentes. Nas mesmas datas, exceto no dia da cirurgia, os animais foram eutanasiados para avaliação macroscópica das tíbias e coleta de material para histologia. Não foram observadas deiscência e infecção local. Ocorreu diferença entre MT e MC para claudicação, sensibilidade dolorosa e edema indicando leve reação inflamatória local no MT. Radiograficamente e macroscopicamente não foram observadas reações periosteais ou osteolíticas em nenhuma das tíbias avaliadas. Conclui-se que o compósito testado é biocompatível e osteocondutor.

ABSTRACT

SANTOS, Letícia Corrêa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2012. **Hydroxyapatite-lignin composite as a metallic implant-bone tissue osseointegration improver: experimental study in dogs.** Adviser: Andrea Pacheco Batista Borges. Co-advisers: Ricardo Junqueira Del Carlo, João Carlos Pereira da Silva and Maria Verônica de Souza.

The objective of this study was to evaluate the composite PAH-91-L ®, formed by synthetic hydroxyapatite (20%) and lignin (80%) as a promoter of integration between metal implant and bone tissue. Both hind limbs of 15 dogs were subjected to experimental surgical procedure, referred as MT (treated limb) and MC (control limb). The bone marrow was removed through an orifice of the lateral proximal tibia, which after added to the composite was replaced in the medullary canal with subsequent implantation of the intramedullary Schanz pin in the MT. In MC the marrow was triturated with subsequent placing of the pin. Clinical evaluations were performed for 15 days to assess dehiscence, lameness, pain and edema. Radiographs were taken immediately after the procedure, and in the following 8, 60 and 150 days. On the same dates, except on the surgery day, the animals were euthanized for macroscopic evaluation of the tibia and to collect material for histology. Dehiscence or local infections were not observed. There were differences between MT and MC for lameness, pain and edema indicating mild local inflammatory reaction in MT. Radiographically and macroscopically there were no osteolytic or periosteal reactions in none of the evaluated tibias. It was concluded that the compound tested is biocompatible and osteoconductive.

INTRODUÇÃO

Grandes desafios ainda precisam ser vencidos na ortopedia atual, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária. A necessidade crescente de estudos *in vitro* e *in vivo* impulsiona e determina o desenvolvimento de novas tecnologias. Nesse campo tem-se a atual e interdisciplinar bioengenharia, ou engenharia de tecidos, que trabalha basicamente com biomateriais e células.

O aumento progressivo da idade da população humana, melhoria na acurácia e maior acesso a métodos diagnósticos aumentando a incidência de doenças degenerativas, traumas como a maior causa de incapacitação produtiva nos jovens, dentre outros, gera a necessidade de garantir cada vez mais a qualidade da vida, com a necessidade de novas e acessíveis terapias que possam preservar, melhorar e/ou restaurar as funções teciduais perdidas. Em 2004, foram gastos pelo SUS, 585 milhões de reais somente com órteses e próteses. Estima-se que, no mundo todo, cerca de 11.750.000 pacientes poderão se beneficiar de uma terapia ortopédica associada com bioengenharia e tecnologia de biomateriais (BOROJEVIC, 2008).

Nesse contexto está a artroplastia total de quadril (ATQ), um procedimento cirúrgico amplamente utilizado para a substituição total da articulação comprometida com afecções como osteoartrite de quadril, necrose asséptica da cabeça femoral, dentre outras. A ATQ também vem ganhando espaço na medicina veterinária, estando disponível como recurso no tratamento de afecções similares àquelas da medicina humana. Apesar do sucesso de tal procedimento, algumas complicações ainda são frequentes, como o afrouxamento asséptico do implante, com consequente reabsorção óssea ao redor da prótese (MOBASHERi, 2006; MINTO, 2008; AULAKH, 2009; TANINO *et al.* 2009). Sendo assim, ainda é discutido qual é o melhor tipo de prótese para realizar a artroplastia: a prótese cimentada ou não cimentada (PEREIRA *et al.* 2007). Na literatura são relatadas diferentes opções de tratamento, como o uso de enxerto fragmentado isolado ou associado a reforços, enxerto estrutural, cimento ósseo, próteses de grandes dimensões e outros métodos para o preenchimento do defeito acetabular e

femoral. Contudo, apesar das várias estratégias cirúrgicas publicadas, ainda não há consenso sobre o melhor método a ser utilizado (IORIO *et al.*, 2008).

Os cimentos ósseos podem ser compostos por materiais bioativos, como os cimentos a base de fosfatos de cálcio, ou por materiais não bioativos, como os de polimetilmetacrilato (PMMA). Apesar de possuírem vantagens sobre os cimentos de PMMA, principalmente quanto a sua bioatividade e osteocondutividade (NI *et al.*, 2009), os cimentos a base fosfatos de cálcio possuem como desvantagem sua baixa resistência mecânica, que no melhor dos casos consegue igualar-se ao do osso trabecular, ou um quinto do osso cortical (SANTOS, *et al.*, 2001).

Na prática cirúrgica o cimento mais utilizado é o composto por PMMA, que apesar de ser utilizado como cimento há quase 50 anos, e ter se mostrado clinicamente aceitável, ainda são relatados vários problemas associados a sua utilização (Ni *et al.* 2010) chegando-se a denomina-los como “doença do cimento” (JONES, 1987). A mais grave é a de que ele não se integra ao osso, permitindo assim que se forme uma fina camada fibrosa entre a superfície do osso e do cimento (Freeman *et al.*, 1982), que é a principal causa de afrouxamento do componente femoral (Jasty *et al.*, 1990). Uma solução sugerida para superar este problema na interface é a utilização de cimento ósseo bioativo (Harper, 1998). Sendo assim, a busca por novos biomateriais, que funcionem aumentando a formação óssea ao redor do implante e tendo sua absorção completada dentro de um período que garanta a estabilidade do implante, torna-se um grande e desejado desafio dessa área.

Dentro deste contexto, encontra-se o trabalho que se segue, que buscou analisar um compósito a base de hidroxiapatita e lignina e, cuja hipótese é de que o produto seja biocompatível, que acarrete um incremento da formação óssea e resistência do conjunto compósito, implante metálico e osso, quando aplicado em região medular. Mediante os resultados encontrados por essa pesquisa e atestando-se a biocompatibilidade e características do compósito quando utilizado *in vivo*, pode-se vir a ter um incremento no leque de possibilidades de utilização desse compósito. Poderá ser ampliado seu uso na odontologia, com sua utilização peri-implantes, como suporte para culturas de células e posterior implantação em defeitos ósseos, e atestada sua capacidade de suportar cargas mecânicas

umentando a resistência do conjunto implante-compósito, este poderá ser também utilizado em artrodeses, fixação de fraturas dentre outros.

REVISÃO DE LITERATURA

1 - Bioengenharia e Biomateriais

A bioengenharia tecidual é um campo multidisciplinar que envolve a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos defeituosos ou lesionados (TABATA, 2009). Assim, o principal objetivo da bioengenharia é superar as limitações dos tratamentos convencionais vigentes, baseados na cirurgia reconstrutiva ou no transplante de órgãos. Sobretudo, sendo capaz de produzir substitutos que apresentem tolerância imunológica, para órgãos e tecidos, o que possibilita sua implantação no paciente sem risco de rejeição pelo organismo (SACHLOS e CZERNUSZKA, 2003).

Por definição, biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, naturais ou não, que não sejam drogas ou fármacos, utilizados em aplicações biomédicas, e que interagem com sistemas biológicos, que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (WILLIAMS, 1987). Assim, a escolha de um material para ser usado como biomaterial depende da análise de uma série de características. Nesse sentido, a biocompatibilidade, a biodegradabilidade, bem como a velocidade de degradação do material são características desafiadoras para o desenvolvimento e fundamentais para a escolha de um biomaterial (TABATA, 2009).

A biocompatibilidade se destaca, sendo um termo que abrange vários aspectos do material, incluindo desde suas propriedades físicas, mecânicas e químicas até seu potencial citotóxico, alergênico e mutagênico, não apresentando efeitos tóxicos ou causando injúrias na função biológica (COSTA, 2001). Seu conceito ainda tem sido muito discutido, mas existe um consenso geral de que existem dois componentes principais: a ausência de efeito citotóxico e o aspecto da biofuncionalidade (KIRKPATRICK *et al.*, 2005). Assim, a biocompatibilidade se

refere à relação de um material com organismo, de tal forma que ambos não produzam juntos efeitos indesejáveis (SILVEIRA, 2004).

Os biomateriais podem ser classificados ou subdivididos conforme sua origem (natural ou sintética) ou sua composição química (metálicos, cerâmicas, polímeros ou compósitos) (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Dentro do grupo das cerâmicas, essas ainda podem ser classificadas como sintéticas ou naturais e possuem diversas vantagens como biomateriais para utilização em substituição ao tecido ósseo. Dentre suas vantagens destacam-se a estrutura semelhante ao componente inorgânico do osso, sua biocompatibilidade, osteocondutividade além de possuírem um alto tempo de biodegradação (ABUKAWA *et al.*, 2006), permitindo a remodelação óssea no sítio do implante.

Os polímeros também podem ser de origem natural ou sintética, e sua principal característica da maioria daqueles utilizados na engenharia tecidual é a biodegradabilidade (TABATA, 2009). Os polímeros de ambas as origens, têm sido utilizados para o desenvolvimento de matrizes (“scaffolds”) tridimensionais para confecção de cartilagens, ligamentos, meniscos, ossos e discos intervertebrais, particularmente os polímeros sintéticos biodegradáveis (NAVARRO, 2008). Os principais polímeros utilizados com a finalidade de reparo do tecido ósseo são o ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), ácido polihidroxibutirato (PHB) e a policaprolactona (PCL). Dentre suas vantagens, destacam-se o fácil controle de síntese, a origem ilimitada e em alguns deles a não degradação mediada por células, também a biodegradabilidade e biocompatibilidade. Porém podem possuir pouca resistência mecânica, sofrer redução de tamanho ao longo do tempo, possuírem superfície hidrofóbica e existe a possibilidade de reação tóxica local pela liberação de subprodutos ácidos de degradação. Entretanto, estão indicados para uso na ortopedia e também como dispositivos implantados para liberação lenta de fármacos (OH *et al.*, 2006).

Para solucionar as desvantagens das cerâmicas e polímeros, novos estudos têm sido realizados no intuito de desenvolver os compósitos. Tais materiais podem ser resultado da associação entre cerâmicas, polímeros e/ou metais. O objetivo dos compósitos associando cerâmicas e polímeros é que estes possuam as vantagens dos dois biomateriais, porém com melhores taxas de

reabsorção após a implantação e melhor resistência mecânica (WAN *et al.*, 2006; MARTINEZ, 2008; CARLO *et al.*, 2009).

1.1 - Hidroxiapatita

Entre as cerâmicas, a hidroxiapatita (HA) de fórmula química $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, ocupa posição de destaque por ser uma das mais biocompatíveis devido à semelhança com o constituinte mineral dos ossos e dentes. Esse material tem sido sintetizado e utilizado para fabricação de diversas formas de implantes, tais como, blocos, grânulos ou recobrimentos, igualmente densos ou porosos (BILLOTTE, 2006). Essa cerâmica é termodinamicamente estável em pH fisiológico e participa ativamente das ligações ósseas, formando ligação química com o tecido ósseo (VAZ, 2006; ROSSI, 2011).

A hidroxiapatita sintética é um material biocompatível, bioativo e osteocondutor, ou seja, tem a capacidade de servir como suporte para o crescimento de novo osso, dentro de seus poros, a partir das margens de um defeito, mas não possui propriedade de osteoindução (REZENDE *et al.*, 1998; BORGES, 1998; BORGES *et al.*, 2000; TAMPIERI *et al.*, 2001; DUARTE *et al.*, 2006; CARLO, 2007; CARLO *et al.*, 2009). A bioatividade da HA está relacionada à sua capacidade de realizar a ligação direta com o tecido ósseo, sem interposição de tecido fibroso, como demonstrado em diversos estudos.

Foi observado que, ao entrar em contato com fluidos corpóreos como o plasma sanguíneo, o meio em torno da HA se torna ácido, como ocorre nas lesões cirúrgicas próprias do processo de implantação, permanecendo sua superfície carregada negativamente, devido a grupos OH^- e PO_4^{3-} . Esses grupos combinam seletivamente com o Ca^{+2} , carregado positivamente, formando fosfato de cálcio. À medida que o cálcio se acumula, a superfície começa a se tornar positiva, atraindo dos fluidos corporais, os íons fosfato carregados negativamente. Essa camada é instável e transiente e se transforma em camada de apatita carbonatada, que foi demonstrado por Fujibayashi *et al.* (2003) por meio da microscopia eletrônica de varredura. Esta camada é responsável pela bioatividade da HA e alguns estudos demonstram que os nanocristais de apatita, muito semelhantes à fase mineral da matriz óssea, fornecem um ambiente para células precursoras migrarem, fixarem

e diferenciarem-se em osteoblastos, produtores de osso novo. Esses nanocristais também se associam às fibras colágenas da matriz orgânica produzida pelos osteoblastos e o recrutamento dessas células precursoras leva à formação de tecido ósseo. Acredita-se que o plasma sanguíneo, primeira fase orgânica com a qual a HA entra em contato ao ser implantada, seja o iniciador de tais trocas iônicas com sua superfície. Portanto, pode-se considerar que a interface HA-tecido ósseo é um produto da combinação de interações químicas, biológicas e fisiológicas (MACNEILL *et al.*, 1999; ROHANIZADEH *et al.*, 1999; BORGES *et al.*, 2000; HENCH, 2000; KAWACHI *et al.*, 2000; KIM, 2003; KOKUBO *et al.*, 2003; CARLO, 2007)

A hidroxiapatita vem sendo utilizada como substituto ósseo em situações onde são necessárias correções de falhas ósseas, seja para dar suporte, preencher espaços vazios ou acelerar a reparação biológica (GARRIDO *et al.*, 2010). Também na odontologia, os desafios são encontrar biomateriais ideais na substituição óssea para aumento do rebordo alveolar e o tratamento de lesões osteoporóticas, deformidades maxilofaciais e defeitos ósseos periodontais (ZENÓBIO *et al.* 1998; BORGES *et al.*, 2000; DUARTE *et al.*, 2006).

Outra importante aplicação da HA é no revestimento de próteses metálicas, uma vez que, a reabsorção das apatitas e sua bioatividade permitem a osseointegração (SILVA, 2011). Essa é uma característica fundamental para assegurar a ancoragem mecânica da superfície do implante no osso, possível pela formação de ligação química e física entre o tecido e o material (HENCH, 1993).

Com os fins similares, vem sendo testadas associações da HA com diversos outros compostos, formando compósitos com maior amplitude de características desejáveis para as mais variadas propostas de uso. Alguns exemplos de compostos já associados à HA são colágeno (MAGALHÃES *et al.* 2004; SORATTO *et al.* 2006), colágeno e silicato (E'GUES *et al.* 2008), colágeno e lipossoma (FRANCO, *et al.* 2001), colágeno e zinco (SANTOS *et al.* 2007), colágeno e quitosana (AMARAL, 2006), alendronato sódico (FERNANDES *et al.* 2004), plasma rico em plaquetas (PRP) (CAMARINI *et al.* 2006; SILVA *et al.* 2007), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (TEIXEIRA, 2006; CIANI *et al.* 2006), vidro bioativo (CAMARINI, 2001), estrôncio (MACHADO *et al.* 2010),

estrôncio e alginato (ROLIM, 2010), polihidroxibutirato (CARLO *et al.* 2009) e lignina (VITAL *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2009).

1.2 - Lignina

Lignina é comumente encontrada em plantas sendo o segundo polímero orgânico mais comum no meio ambiente (KABAYASHI, 2009). Ela é depositada predominantemente nas paredes celulares, tornando-as rígidas e impermeáveis. Sua biossíntese também pode ser induzida em várias condições de estresse da planta, tais como infecção, ferimento, patógeno, estresse metabólico e perturbações na estrutura da parede celular (TRONCHE *et al.* 2010). Sabe-se que a lignina evoluiu junto com a adaptação das plantas à vida terrestre lhes fornecendo suporte estrutural necessário para um hábito de crescimento ereto (VANHOLME *et al.* 2010).

A lignina representa um dos mais importantes biorecursos para a matéria prima na síntese de polímeros ambientais. Ela é derivada de recursos renováveis, tais como árvores, ervas e culturas agrícolas, e representa cerca de 30% dos constituintes da madeira. Lignina não é tóxica e é extremamente versátil quanto a seu uso. Estima-se que a produção de lignina como um subproduto do processo de polpação no mundo seja de mais de 30 milhões de toneladas por ano. Ligninas comerciais são obtidas como subproduto das indústrias de polpa ou bio-etanol (KABAYASHI, 2009).

Sua estrutura, de ordem superior, é classificada em apenas dois componentes: um é a parte aromática e outro é a cadeia de C3, sendo o grupo OH seu único local de reação utilizável. Basicamente, três grandes unidades aromáticas estão presentes na macroestrutura da lignina, são elas: 4-hidroifenil, guauacil e sirigil que são conjugadas para produzir uma imagem tridimensional de polímeros de lignina. A lignina não tem uma estrutura regular como o da celulose, mas é um material física e quimicamente heterogêneo, e não deve ser considerada como uma substância química única, mas sim, como uma classe de materiais correlatos (KABAYASHI, 2009).

1.3 - Compósito

O objetivo principal de produzir um compósito é a obtenção de um material com propriedades superiores às dos componentes unitários (WANG, 2003). Compósitos bioativos envolvem geralmente a matriz – que confere propriedades mecânicas, físicas e químicas ao implante – e uma fase bioativa – que assegura a interação favorável entre implante e tecido vivo através da interface, onde ocorra a adesão e a proliferação celular (REA, 2004).

Com o objetivo de juntar-se a comprovada bioatividade da hidroxiapatita com as propriedades mecânicas da lignina, este compósito foi recentemente desenvolvido e testado, tendo-se como foco inicial sua utilização como alternativa de substituição do cimento ósseo em procedimentos como artroplastia total de quadril. Vital (2005), em um estudo com coelhos, concluiu que o compósito hidroxiapatita (99%) e lignina (1%) se mostrou como um bom substituto ósseo, não causando reação inflamatória e mostrando-se biocompatível. Já Martinez (2008), utilizando um compósito com mesma formulação e proporção dos componentes, utilizando como modelo experimental um pino intramedular de Schanz em coelhos, concluiu que é possível utilizar tal compósito para guiar o processo regenerativo a partir do canal medular. Abre-se assim o caminho para a continuidade das pesquisas com esse promissor compósito, variando as porcentagens de seus componentes para investigar a interferência na capacidade de aumentar a resistência mecânica do conjunto pino/osso, mas mantendo sua capacidade de osseointegração, osseocondução, e biocompatibilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (DVT-UFV) processo número 23/2010, estando de acordo com o código de Ética Profissional do Médico Veterinário e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Para a realização deste estudo, foram necessários quinze cães fêmeas, sem raça definida, esqueleticamente adultas à confirmação radiográfica, com idade entre 1 e 2 anos e pesando entre 10 e 15 Kg. Os animais, provenientes do canil experimental da UFV, foram alojados em baias individuais e receberam ração comercial diariamente e água *ad libitum*, além de tratamento contra endo¹ e ectoparasitas². Todas as fêmeas selecionadas foram submetidas à ovariossalpingohisterectomia para eliminação de demais variáveis experimentais.

A hidroxiapatita sintética (HAP-91®) utilizada na formulação do compósito, 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 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, 80% de lignina derivada do eucalipto para formar o compósito HAP-91-L®. Com este material foram, então, obtidos blocos circulares de 4,5 mm de diâmetro e peso de 200 mg que foram esterilizados em óxido de etileno a 10% e embalados em material plástico (MARTINEZ, 2008).

Os 15 animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos de igual número.

¹ Endogard 10® - Virbac do Brasil. São Paulo, Brasil

² Top Line® - Merial – São Paulo, Brasil

No grupo 1 (G1) os animais tiveram acompanhamento pós-cirúrgico de 8 dias, no grupo 2 (G2), o acompanhamento pós-cirúrgico foi de 60 dias, e no grupo 3 (G3) ocorreram 150 dias de acompanhamento, como mostra a figura 1.

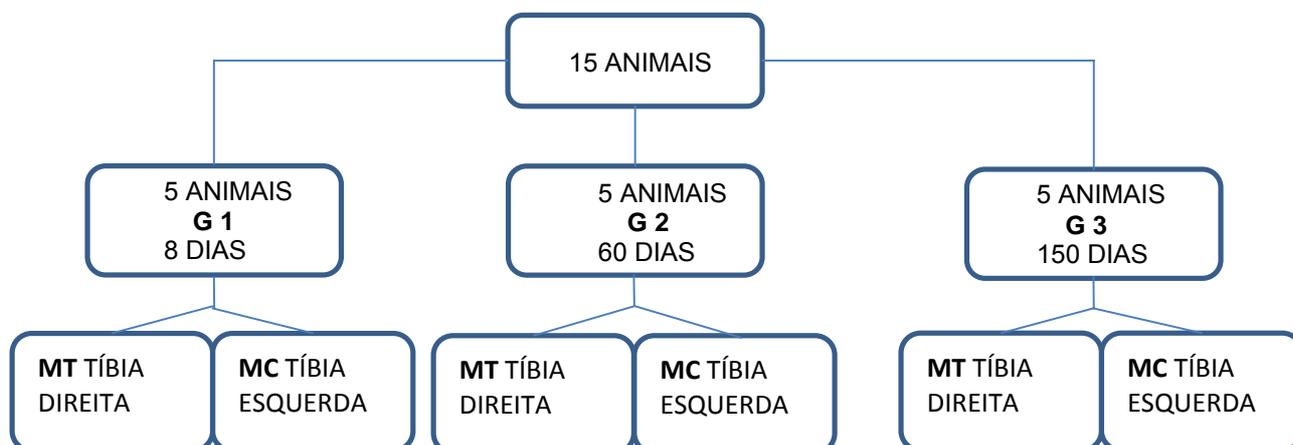


Figura 1: Delineamento experimental com a distribuição de grupos por períodos de acompanhamento pós-cirúrgico, sendo MT: membro tratado com o compósito HAP-91-L®, MC: membro não tratado com o compósito.

Os animais foram mantidos em jejum hídrico e sólido de 12 horas e receberam 20 mg/kg de cefazolina³ por via intravenosa 30 minutos prévios à indução anestésica. Em seguida, os cães foram sedados com acepromazina (0,1 mg/kg)⁴ por via endovenosa. A anestesia geral foi induzida com propofol (6 mg/Kg)⁵ também por via endovenosa e mantida com mistura de Isoflurano⁶ e oxigênio.

Em seguida os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. O preparo de campo operatório foi feito com iodopovidona⁷ 10% e isolado com malha tubular estéril e a delimitação do campo operatório com panos de campo apropriados. A abordagem cirúrgica se baseou na técnica descrita por Piermattei et al. (2006) (figura 2A).

³ Cefazolina sódica – Aurobindo. Anapolis, Br.

⁴ Acepran® 1% - Univet. São Paulo, Br.

⁵ Propofol® – Eurofarma. São Paulo, Br.

⁶ Isoflurano® - Cristália. São Paulo, Br.

⁷ Benadine Schering – Plough Veterinária. São Paulo, Br

Uma falha óssea de aproximadamente 4,5 mm de diâmetro e profundidade suficiente para atingir o canal medular foi realizada com o auxílio de uma furadeira elétrica e broca correspondente na parte central da face medial proximal da tíbia (figura 2A).

Na tíbia direita, denominada como membro tratado, após prévio descolamento da medula do canal medular por meio de pino intramedular, parte da medula óssea foi retirada utilizando-se cateter n° 14 e seringa descartável (figura 2B). O conteúdo medular retirado foi utilizado para amolecer os blocos circulares do compósito (fig. 2C) formando uma mistura que em seguida, foi injetada no canal medular (fig. 2D). Foi introduzido pelo defeito provocado, um pino intramedular de Schanz (fig. 2E) em aço F 13817 rosqueado para osso cortical, de diâmetro suficiente para ocupar aproximadamente 80% da cavidade medular. Antes de sua introdução, a ponta rosqueada do pino foi revestida com o compósito de HAP-91-L® em quantidade suficiente para contato com o endóstio. O defeito inicial para inserção do pino intramedular foi preenchido com o mesmo compósito. A musculatura e o tecido subcutâneo foram aproximados por planos utilizando fio de sutura não-absorvível de náilon 3-0 com padrão de sutura contínua simples e a pele em padrão interrompido simples com náilon 2-0.

No membro denominado controle, tíbia esquerda, foi realizado o mesmo procedimento do membro tratado, com exceção da introdução do compósito de HAP-91-L® na região da medula e na falha para inserção do pino intramedular de Schanz, permanecendo a medula fragmentada e os coágulos que se formam naturalmente.



Figura 2. Fotografias do procedimento cirúrgico na tíbia de cães submetidos à cirurgia experimental. A) Confeção do defeito em região tibial proximal com auxílio de furadeira manual e broca correspondente a 4,5 mm (seta); B) Cateter n° 14 (seta) utilizado para retirada do conteúdo medular; C) Conteúdo medular misturado aos blocos circulares do compósito HAP-91-L (seta); D) Compósito devidamente diluído (seta) sendo aplicado no canal medular do membro tratado; E) Colocação do pino intramedular de Schanz (seta).

No pós-operatório os animais receberam tramadol⁸ (4 mg/kg) a cada oito horas durante 24 horas e carprofeno (4,4 mg/Kg)⁹ a cada 24 horas por via oral por três dias para analgesia. Os curativos da ferida cirúrgica foram feitos apenas com spray à base de rifamicina¹⁰ por um período de 8 dias.

Na avaliação clínica, ambos os membros de cada animal foram observados diariamente do primeiro ao 15º dia após a cirurgia, exceto no G1, quando essa observação ocorreu apenas nos 8 dias após cirurgia. O grau de claudicação na marcha foi avaliado para ambos os membros, considerando os escores presentes na tabela 1.

⁸ Tramadol® - Uniao Quimica. Embu-Guaçu, Brasil.

⁹ Carproflan® - Agener União. Embu-Guaçu, Brasil.

¹⁰ Rifocina Spray. Hoechst Marion Roussel. B. Horizonte, Brasil.

A ferida cirúrgica foi avaliada para presença de reação inflamatória, sinais de deiscência (presente ou ausente) e infecção (presença de exsudato na ferida ou fístula). Para avaliar a reação inflamatória os parâmetros analisados foram: o edema, avaliado quantitativamente pela mensuração da circunferência dos membros no local da ferida cirúrgica por meio de fita métrica graduada em centímetros, e a sensibilidade dolorosa, avaliada pela reação do animal ao toque da ferida cirúrgica, atribuindo-se escores presentes na tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos escores estipulados para a avaliação clínica dos animais submetidos ao procedimento experimental. As avaliações foram realizadas tanto no membro tratado quanto no membro controle e se referem aos parâmetros de claudicação e sensibilidade dolorosa

PARÂMETRO	ESCOR	DESCRIÇÃO
CLAUDICAÇÃO	0	Apoio sem claudicação
	1	Claudicação
	2	Ausência de apoio
SENSIBILIDADE DOLOROSA	0	Ausência de manifestação dolorosa
	1	Manifestação dolorosa sem retração do membro
	2	Manifestação dolorosa associada à retração do membro

Radiografias nas projeções mediolateral e craniocaudal foram feitas imediatamente após a cirurgia e nos dias oito, 60 e 150 de pós-operatório. Foram analisadas observando a radiopacidade ao redor do pino intramedular e a radiopacidade na região do defeito ósseo provocado para a inserção do pino intramedular, comparando-se com o osso ao redor. Tais comparações foram descritas como radiopacidade menor, igual ou maior que a do osso circunvizinho.

Dos cinco animais, três de cada grupo foram eutanasiados, utilizando-se o protocolo anestésico descrito para o procedimento cirúrgico, adicionado de sobre dose de propofol⁵ e parada cardiorrespiratória induzida por cloreto de potássio a 10%¹¹.

¹¹ Cloreto de potássio 10% - Isofarma Industrial Farmacêutica. Precabura, CE, Brasil.

Tal procedimento foi realizado para posterior teste de tração e coleta de amostras para análise histológica. Em seguida, os membros pélvicos foram desarticulados na articulação femorotibiopatelar e tibiotalariana e os tecidos moles foram retirados, permanecendo as tíbias, que foram imersas em solução fisiológica 0,9% e armazenadas à temperatura de geladeira por aproximadamente 12 horas.

As tíbias correspondentes aos membros controle e tratado foram submetidas ao teste de resistência à remoção do pino intramedular por tração, com objetivo de determinar a resistência mecânica da interface do pino com o osso-compósito. Para tal análise foi utilizada máquina universal de testes de tração da marca Instron® (fig. 3A). As tíbias foram acondicionadas em tubo de PVC utilizando-se resina acrílica, objetivando a colocação de gancho e correntes de aço para melhor adequação do conjunto às garras da máquina de testes (figura 3B). No momento do teste, a epífise proximal foi retirada para exposição do pino (figura 3C), e colocação do conjunto nas garras da máquina de testes de tração (figura 3D). Cada amostra, uma vez preparada, foi ajustada à máquina Universal de Testes mecânicos e submetida a uma carga do tipo "uniaxial" (que é a força aplicada na direção longitudinal da amostra). A velocidade de deslocamento foi constante, de 1 mm/min, e a força inicial aplicada consistiu de 0.5 g, aumentando gradativamente até o desprendimento do pino.

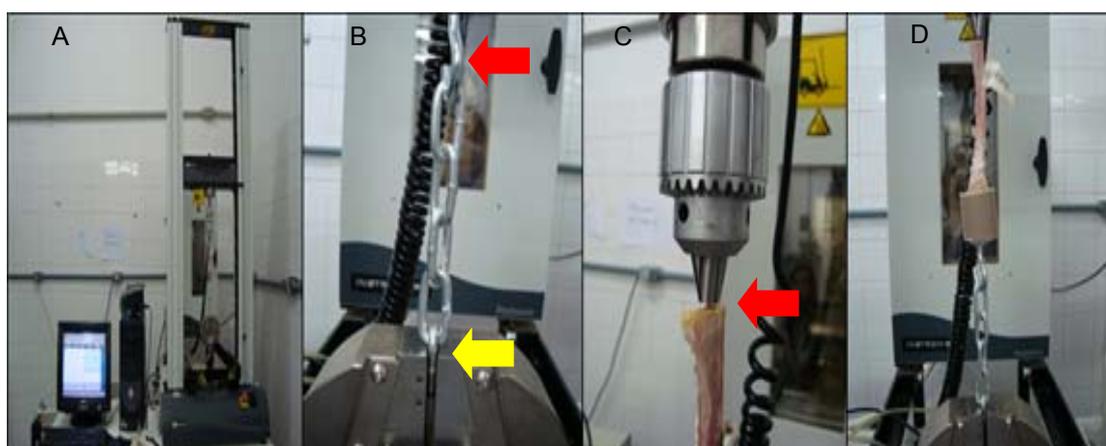


Figura 3. Tibia sendo submetida a teste de tração na máquina Instron®; A) Visão completa da máquina Instron® para teste de tração; B) Garra inferior (seta amarela), onde foi presa a corrente acoplada ao PVC por meio de gancho (seta vermelha); C) Garra superior (seta) onde foi preso pino intramedular após retirada da epífise proximal da tibia a ser testada; D) Todo o conjunto devidamente preso à máquina para início do teste.

Após o referido teste, foi realizado um corte longitudinal nas tíbias direita e esquerda, com serra manual elétrica, onde foram observadas as características macroscópicas de cada tíbia, sendo os resultados apresentados por meio de avaliação descritiva. No pino intramedular foi observada característica de superfície considerando a perda ou não de sua forma rosqueada, corrosão e presença de tecido aderido.

Das mesmas tíbias em questão, foram obtidas amostras para a avaliação histológica. Essas amostras foram retiradas da região distal da tíbia, que se localizava ao redor da rosca do pino intramedular, além de amostras da região da falha feita para inserção do pino de Schanz.

Tais amostras foram fixadas em formol 10% tamponado por um tempo médio de 15 dias. Após esse período as amostras foram descalcificadas em ácido fórmico a 10% tamponado com citrato de sódio para pH 4,5 sob vácuo moderado por aproximadamente 60 dias. Retiradas dessa solução depois de completada a descalcificação, as amostras foram lavadas em água corrente e então desidratadas em álcoois etílicos a 70, 80, 90 e 100% durante 24 horas em cada etapa e repetida a 100%. A seguir, foram diafanizadas em 2 banhos de xilol por 30 minutos cada e embebidas em parafina em estufa a 58 °C por 1 hora. Os blocos foram seccionados longitudinalmente no centro do defeito, obtendo-se cortes de 5 µm em secções não seqüenciais com aproximadamente 50 µm de distância, para coloração com hematoxilina-eosina e análise à microscopia de luz, através de microscópio Olympus BX41. As amostras selecionadas foram analisadas e fotografadas utilizando-se microscópio Olympus CX31, com câmera Olympus SC20 acoplada e programa amalySIS getIT versão 5.1.

O objetivo dessa análise foi avaliar os tipos celulares presentes e os tecidos que porventura se formaram nas áreas que sofreram intervenção cirúrgica experimental. Foi realizada a identificação do compósito nos grupos tratados e as características celulares na interface com material.

Com o objetivo de determinar a natureza (orgânica ou inorgânica) do tecido presente no canal medular das tíbias dos animais, 2 cães de cada grupo foram eutanasiados, e da mesma forma como já descrito, as tíbias foram retiradas, para serem submetidas à difração de Raios X.

Para tal, fez-se a secagem das amostras em estufa elétrica a 70°C por 72 horas, para posterior retirada por raspagem do material contido no canal medular óssea. Este material foi então reduzido a partículas menores, e colocado em uma lamina de vidro escavada, que foi colocada em um difratômetro da marca PANalytical modelo X'Pert Pro (Figura 4). Também foram submetidas ao mesmo teste a HAP-91® e o compósito testado, HAP-91-L®, antes de sua implantação no tecido ósseo, ambos como padrão para análise das amostras obtidas dos animais. Os resultados obtidos nos difratogramas foram apresentados por meio de análise descritiva.



Figura 4: Demonstração do teste de difração de RX em difratômetro; A) Difratômetro da marca PANalytical modelo X'Pert Pro; B) Região interna do difratômetro no momento da leitura do material contido na lâmina de vidro posicionada no centro do leitor (seta).

A avaliação estatística foi aplicada naqueles parâmetros que se utilizaram de escores, como claudicação e sensibilidade dolorosa e também naqueles onde foram obtidas medidas, como edema e para os valores encontrados no teste de tração. Foram realizados no programa SAS (Statistical Analysis System, version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) licenciado para a UFV, 2012. Foram utilizados os pacotes GLM, MIXED, NPARWAY1. Nas análises de inferências, adotou-se aplicar dois procedimentos paramétricos: a ANOVA e o teste t para dados pareados e o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. São apresentados os valores p (ou p valores) dos procedimentos, sendo a hipótese de nulidade rejeitada quando o $p <$ nível de significância, adotado como 5%. Para claudicação e sensibilidade dolorosa foi aplicado o teste T para dados pareados e no teste de

tração foi utilizado teste T para dados pareados para comparação entre membros e Kruskal-Wallis para comparação entre grupos. Nos dados obtidos para a variável edema foi realizada análise de variância (ANOVA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Avaliação clínica trans e pós-operatória

Observou-se que ao serem mecanicamente fragmentadas e posteriormente homogeneizadas na medula óssea, as pastilhas do compósito se tornaram levemente esponjosas e não aderentes, se mostrando de fácil manipulação e aplicação no interior do canal medular com a utilização de seringa e cateter (figura 2 D). Já no momento da aplicação do compósito acrescido de conteúdo medular na falha para inserção do pino intramedular, suas características pós-homogeneização implicaram na difícil permanência do compósito no orifício, sendo necessária compressão do conjunto pra sua fixação no local. Rigo *et al.* (2009) utilizaram de hidroxiapatita particulada e observaram problemas similares, descrevendo que o uso da hidroxiapatita na forma particulada tem como um de seus maiores problemas a sua dispersão para a zona de tecidos moles causando perdas de partículas.

Não foi observada diferença entre MT e MC na intensidade da hemorragia no local da falha após colocação do compósito. Estímulo à hemorragia relacionado à presença local da hidroxiapatita foi observado por Borges, *et al.* (2000), Rodriguez (2004), Vital (2005), Duarte *et al.* (2006) e Martinez (2008), mas não ocorreu nesse experimento provavelmente pelo fato de que tal cerâmica estava presente em menor proporção no compósito utilizado em comparação aos utilizados por aqueles autores, assim, o compósito não apresentou influência sobre a hemorragia local.

1.1 Deiscência e Infecção da ferida

Não foi observada deiscência ou infecção da ferida cirúrgica em nenhum animal até a retirada dos pontos. Segundo Braga (2008), existe uma associação

entre interferência do paciente na ferida cirúrgica e ocorrência de infecção do sítio cirúrgico, principalmente na medicina veterinária. Contudo, no presente trabalho, a analgesia, controlando a dor pós-operatória, a qualidade da antissepsia trans-cirúrgica e a aplicação tópica diária de rifamicina nos primeiros 8 dias de acompanhamento clínico, podem ter sido fatores positivos para a não interferência do animal na ferida cirúrgica, mesmo sem o uso de colar Elizabetano.

Tais resultados diferem de Carlo (2007), que trabalhou com coelhos e indicou interferência do animal como a causa de deiscência e infecção local presente em alguns de seus animais. A reação inflamatória com consequente deiscência na ferida cirúrgica é um componente importante na incompatibilidade de biomateriais, sendo assim, e como sinalizado por outros autores, como Borges, *et al.* (2000), Ziliotto *et al.* (2003), Freitas *et al.* (2008) e Dornbusch *et al.* (2010), a ausência de deiscência, também sugere biocompatibilidade dos biomateriais testados, uma vez que, é mais um indicativo de ausência de reação inflamatória exacerbada.

1.2 Avaliação da claudicação

No primeiro dia de avaliação, apenas um MC de um animal, possuía grau 0 de claudicação, todos os demais foram classificados com algum grau de claudicação. No segundo dia, 26,67% dos MC e 66,6% dos MT não apoiavam no chão.

A partir do terceiro dia de avaliação, tanto em MT quanto em MC, ocorreu um aumento no número de membros classificados com grau 0 de claudicação. Do décimo ao décimo quinto dia, em todos os MC não mais se observava claudicação, mas dois MT ainda claudicavam (tabela 2).

De acordo com o teste T para dados pareados, ocorreu diferença significativa entre MT e MC nos três grupos avaliados (G1: $p < 0,0001$; G2: $p = 0,0058$; G3: $p < 0,0001$). Acredita-se que tal diferenciação seja em decorrência de um maior trauma cirúrgico feito no MT, uma vez que, houve necessidade de retirada de medula para diluição do compósito no MT, a força empregada para deslocamento da mesma neste membro pode ter excedido a força para o mesmo procedimento no MC. Tal diferença culminou em maior dor em toda a extensão da tíbia do MT, resultando em dificuldade de apoio.

Tal resultado é similar a Borges *et al.* (2000), que observou maior tendência à claudicação no MT e sugeriu relação com a presença de hidroxiapatita, que mesmo biocompatível pode ter induzido à reação inflamatória local, além de maior tempo cirúrgico nesses membros, aumentando o trauma local. Já Ziliotto *et al.* (2003), Rodriguez (2004) e lamaguti *et al.* (2008) não observaram claudicação significativa nos primeiros dias de acompanhamento pós-cirúrgico em seus experimentos utilizando cães, sinalizando que a padronização da técnica cirúrgica experimental, e os devidos cuidados subsequentes, culminam no uso quase imediato do membro em procedimentos experimentais.

Tabela 2: Número total de animais para cada grau de claudicação de acordo com os dias de acompanhamento após o procedimento cirúrgico, em membros tratados com o compósito HAP-91-L® (MT) e nos membros controles, sem o tratamento com o compósito (MC)

DIA	GRAU 0		GRAU 1		GRAU 2		TOTAL DE ANIMAIS	
	MT	MC	MT	MC	MT	MC	MT	MC
1		1	6	9	9	5	15	15
2			6	11	9	4	15	15
3	2	5	8	8	5	2	15	15
4	7	11	6	2	2	2	15	15
5	8	13	5	1	2	1	15	15
6	7	13	7	1	1	1	15	15
7	11	13	3	1	1	1	15	15
8	12	14	2	1	1		15	15
9	7	9	3	1			10	10
10	8	10	2				10	10
11	8	10	2				10	10
12	8	10	2				10	10
13	8	10	2				10	10
14	8	10	2				10	10
15	8	10	2				10	10

1.3 Avaliação da sensibilidade dolorosa

Nos dois primeiros dias de avaliação clínica, todos os animais apresentaram algum grau de sensibilidade dolorosa no local da ferida cirúrgica, tanto em MT quanto em MC. Ocorreu decréscimo gradativo no grau de sensibilidade dolorosa até o nono dia, quando a dor passou a estar ausente ao toque manual em MT e MC em todos os animais (tabela 3). Tal fato sugere ausência de reação flogística no local e biocompatibilidade do compósito, pela ausência de citotoxicidade local, como descrito por Martinez (2008).

De acordo com o teste T para dados pareados, ocorreu diferença significativa entre MT e MC apenas no G3 (G1: $p = 0,1830$; G2: $p = 0,7081$; G3: $p < 0,0002$). Este resultado pode estar diretamente associado ao maior trauma cirúrgico no MT como discutido para claudicação. Outro fator determinante para essa diferença significativa foi o fato do G3 ter sido o primeiro grupo a ser submetido ao procedimento cirúrgico. Esse fato sinaliza para a chamada “curva de aprendizado”, como descrito e discutido amplamente para a medicina humana (BOKHARI *et al*, 2010). A curva de aprendizado consiste na aquisição de competência, por cada cirurgião, em novas técnicas cirúrgicas. Sendo assim, podem ter ocorridos maiores traumas cirúrgicos nos primeiro cinco animais pertencentes ao G3, submetidos à técnica cirúrgica.

Tabela 3: Número total de animais para cada grau de classificação de dor à palpação, de acordo com os dias de acompanhamento após o procedimento cirúrgico, nos MT e MC

DIA	GRAU 0		GRAU 1		GRAU 2		TOTAL DE ANIMAIS	
	MT	MC	MT	MC	MT	MC	MT	MC
1			4	4	11	11	15	15
2			7	9	8	6	15	15
3	2	3	9	11	4	1	15	15
4	7	8	5	6	3	1	15	15
5	10	12	4	3	1		15	15
6	11	13	4	2			15	15
7	12	15	3				15	15
8	14	15	1				15	15
9	10	10					10	10
10	10	10					10	10
11	10	10					10	10
12	10	10					10	10
13	10	10					10	10
14	10	10					10	10
15	10	10					10	10

1.4 Avaliação da circunferência tibial

Através da ANOVA, utilizando os valores das circunferências tibiais nos locais das feridas cirúrgicas, foram determinados os valores de p para duas comparações distintas: a diferença dos valores de circunferência tibial com o passar dos dias de avaliação e se ocorreu significância estatística entre MT e MC dentro de cada grupo.

Foi observado que apenas em G3 (G1: $p = 0,7619$; G2: $p = 0,6429$; G3: $p = 0,0325$) ocorreu significância estatística para as diferenças nos valores obtidos com o passar dos tempos de acompanhamento para as mensurações de circunferência no local da ferida cirúrgica, indicando a presença de edema tanto em MT quanto em MC no referido grupo. Tal achado está de acordo com os

resultados encontrados para os parâmetros claudicação e sensibilidade dolorosa, que sinaliza para um maior trauma cirúrgico local nos primeiros cinco animais submetidos ao procedimento cirúrgico experimental, ou seja, o G3.

Não ocorreu diferença significativa entre edema de MT e MC dentro de cada grupo (G1: $p = 0,9921$; G2: $p = 0,9949$; G3: $p = 0,0877$), sugerindo mais uma vez a biocompatibilidade do compósito, como descrito por Vital (2005) e Martinez (2008) que utilizaram compósito formado por hidroxiapatita (99%) e lignina (1%). Diferente de Dornbusch *et al.* (2010), que caracteriza em seu estudo uma reação adversa a um outro tipo de biomaterial, polímero de mamona, quando observou edema significativo no MT, sugerindo reações inflamatórias locais nos tecidos adjacentes ao polímero, em decorrência da sua presença em falha óssea no rádio de equinos.

2. Aspectos radiográficos

Radiografias obtidas imediatamente após o procedimento cirúrgico no MT não revelaram alteração na radiopacidade nem ao redor do pino intramedular nem na falha cortical para sua inserção, permanecendo assim com radiopacidade menor do que a do osso circunvizinho (figura 5). Aumentos de radiopacidade são esperados quando existe a presença de material radiopaco de alto peso molecular, como a hidroxiapatita, descrito por Borges *et al.* (2000), Corbi *et al.* (2010) e Tamai *et al.* (2010). Tal fato ocorreu porque a HAP-91® correspondia a apenas 20% do compósito, associada a 80% de lignina, que não possui minerais radiopacos, e, portanto, não alterou a imagem radiográfica quando comparada ao MC. Sendo assim, não foi possível detectar radiograficamente o compósito e dessa forma os locais de distribuição dele a partir do local de implantação.

No MT, na região da falha para inserção do pino, ocorreu aumento gradativo da radiopacidade óssea com o passar dos tempos de acompanhamento (figura 6), sem reações periosteais ou osteólises. Cinco dos dez animais, tanto do MT quanto do MC, avaliados aos 60 dias, e todos os cinco animais aos 150 dias possuíam radiopacidade óssea no local do defeito igual à do osso circunvizinho. Tal fato sugere biocompatibilidade e osseointegração do compósito, uma vez que ocorreu crescimento ósseo radiograficamente semelhante entre os membros.

Aos 8, 60 e 150 dias, a radiopacidade no canal medular não sofreu alteração, permanecendo menor em relação ao osso circunvizinho, tanto em MT quanto em MC (figura 6). Dessa forma a HAP-91® presente no compósito na proporção utilizada não foi suficiente para alterar a radiopacidade das regiões onde foi aplicado, em nenhum momento de acompanhamento radiográfico, o que inclui tanto a presença do compósito quanto a possível formação de tecido ósseo no interior do canal medular.

Tal resultado difere de Martinez (2008), que testando compósito HAP-91-L® (99% HAP-91® + 1% lignina) observou radiopacidade maior nas primeiras datas de acompanhamento e gradual diminuição da radiopacidade no canal medular até atingir radiopacidade levemente menor que a do osso circunvizinho aos 60 dias. Tal autor sugeriu que ocorreu inicial formação de tecido conjuntivo ao redor da hidroxiapatita, que seria responsável pela alteração em sua radiopacidade, já que não ocorre alteração do seu número atômico. Tanto Martinez (2008) quanto nesse trabalho observa-se que os tecidos que porventura se formaram na região medular, como descrito acima, não foram suficientes para promover alterações na radiopacidade. Também não ocorreram reações periosteais ou osteolíticas locais, o que novamente sugere a biocompatibilidade do compósito.

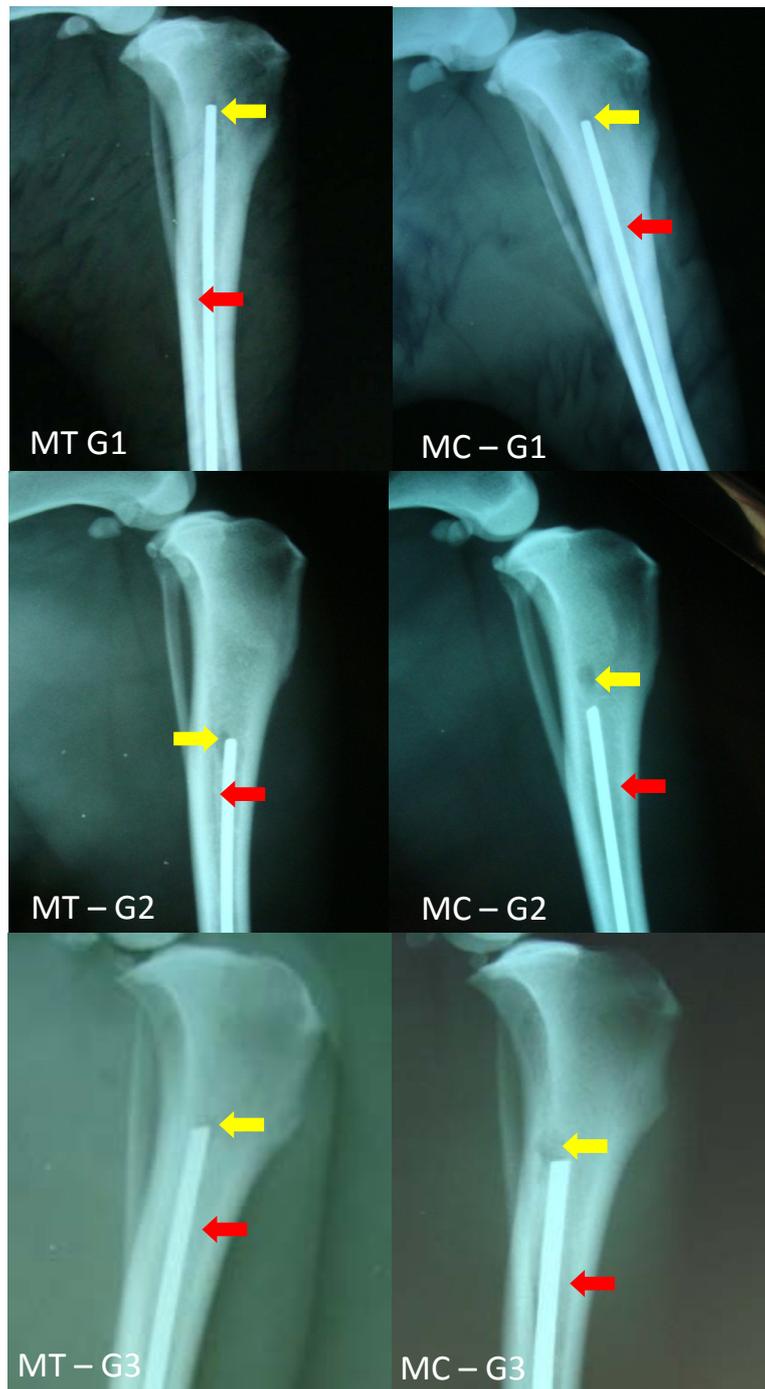


Figura 5: Projeção radiográfica médio-lateral da tíbia de cães após o procedimento cirúrgico experimental no primeiro dia de acompanhamento pós-cirúrgico. Região de radiopacidade menor (seta vermelha) ao redor do pino intramedular de Schanz em relação à radiopacidade observada no osso circunvizinho. Região circular confeccionada para inserção do pino intramedular que se apresenta com radiopacidade menor (seta amarela) em comparação com o osso circunvizinho.



Figura 6: Projeção radiográfica médio-lateral da tíbia de cães após o procedimento cirúrgico experimental no último dia de acompanhamento pós-cirúrgico respectivo de cada grupo. Região de radiopacidade menor (seta vermelha) ao redor do pino intramedular de Schanz em relação à radiopacidade observada no osso circunvizinho, e região da inserção do pino intramedular (seta amarela) mostrando-se com radiopacidade menor que a do osso circunvizinho em MT-G1 e MC-G1, e radiopacidade igual ao osso circunvizinho em MT-G2, MC-G2, MT-G3 e MC-G3

3. Teste mecânico de tração

Através de regressão linear simples foi estabelecida uma equação matemática linear que descreve o relacionamento entre as variáveis, e confeccionado um gráfico demonstrando a linha de tendência das variáveis (figura 7). Com o conhecimento da equação matemática é possível estimar os valores de uma variável com base nos valores conhecidos de outra, explicar valores de uma variável em termos da outra e prever valores futuros de uma variável.

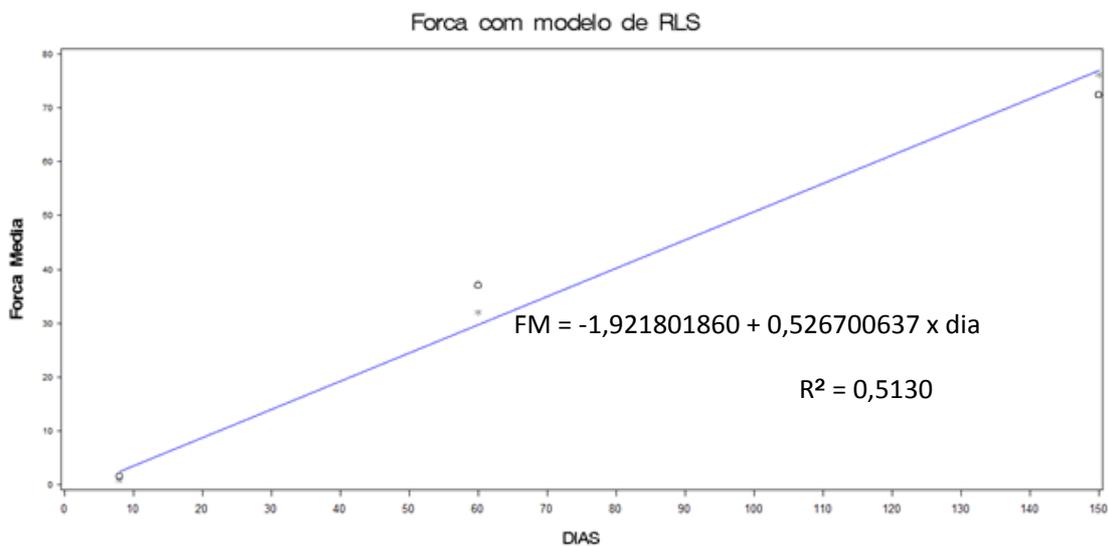


Figura 7: Gráfico demonstrando a linha de tendência através de regressão linear simples da força média necessária para deslocamento do pino intramedular, através da equação. Sendo FM: força média para deslocamento do pino intramedular, em Kgf; (*) MT: membro tratado com o compósito HAP-91-L® e (o) MC: membro sem o tratamento com o compósito.

A forma confiável para determinação das propriedades mecânicas em materiais biológicos é mediante ensaios padronizados que proporcionam resultados comparáveis e reprodutíveis, denominados ensaios mecânicos (MORAES *et al.* 2002). O teste mecânico de tração registrou os valores da força para o deslocamento do pino intramedular dentro do canal medular, correspondendo à resistência máxima fornecida pelas interfaces pino intramedular, compósito e tecidos recém-formados, e cujos resultados estão na tabela 4.

Tabela 4: Médias e desvio padrão dos valores encontrados no teste de tração, expressas em quilogramas força (Kgf), que representam a tensão de ruptura exercida no pino intramedular implantado na tíbia de cães para seu deslocamento. MT: membro tratado com o compósito HAP-91-L® e MC: membro sem o tratamento com o compósito

MEMB	TEMPO DECORRIDO APÓS CIRURGIA		
	8 DIA	60 DIAS	150 DIAS
MT	0,810 0,9710 a	32,0177 26,6841 a	76,2273 ± 45,019
MC	1,580 1,7573 a	37,1053 24,1093 a	72,5507 ± 47,906

Letras iguais sinalizam ausência de diferença estatística entre valores para mesmas linhas e mesmas colunas, para $p < 0,05$.

Pelo exposto, observa-se, que o valor absoluto da força média para deslocamento do pino se mostra maior, quanto maior o tempo de acompanhamento pós-cirúrgico. Aos 150 dias observa-se um valor superior da média do MT sobre o MC, mas de acordo com o teste T para dados pareados, não ocorreu diferença significativa ($p = 0,6553$) entre MT e MC dentro de cada dia. Dessa forma, não foi significativa a diferença entre as forças necessárias para deslocar o pino dentro do canal medular entre os membros. Também para o incremento da força com o passar do tempo de acompanhamento, não foi observada diferença estatística tanto para MT ($p = 0,0794$) quanto para MC ($p = 0,0608$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$. Tal ausência de diferença pode ter ocorrido em decorrência da grande variabilidade dos valores encontrados dentro de cada grupo de observação, e ao pequeno número de amostras submetidas ao teste.

Esperava-se que o compósito, através da lignina, conferisse fixação gradativa ao pino intramedular, até que a hidroxiapatita fornecesse tal fixação nos demais tempos avaliados através de sua osseocondução com crescimento ósseo ao redor do pino. Como já descrito, após a homogeneização do compósito em medula óssea, este passou a ter consistência esponjosa e não aderente, não fornecendo

fixação imediata como nos cimentos ósseos de PMMA rotineiramente utilizados na ATQ. Como descrito por Waanders *et al.* (2010) a viscosidade do cimento ósseo tem relação direta com a penetração do mesmo dentro do osso, sugerindo que a fixação deste material depende dessa penetração para que ocorra um entrelaçamento do cimento dentro da lacuna óssea trabecular, obtendo-se estabilidade mecânica cimento-osso para a viabilidade do implante imediata e a longo prazo. Beng *et al.* (2011) também afirmou que a interface osso cimento com sua fixação imediata ao osso é um dos fatores mais importantes que contribuem para fixação mecânica inicial e consequente melhora do resultado clínico na ATQ.

Em relação à hidroxiapatita, resultados positivos são encontrados quando são utilizadas próteses metálicas revestidas com tal cerâmica. Pereira *et al.* (2007), trabalhando com componentes acetabulares revestidos com hidroxiapatita em próteses híbridas na ATQ, concluíram que tais próteses foram consideradas fixas e estáveis em 93,2% dos casos estudados. Tanino *et al.* (2009) recuperaram próteses de ATQ de cadáveres humanos e concluíram que a fixação do implante não é perdida após reabsorção da hidroxiapatita, que foi observada após aproximadamente 8 anos. Isso se deve à remodelação de novo osso nas regiões de absorção da cerâmica, reafirmando que a presença da hidroxiapatita é um fator benéfico para a melhor fixação de implantes metálicos.

No presente trabalho, a hidroxiapatita estava presente em adição à lignina e foi depositada preenchendo o espaço existente entre pino e cortical óssea, disposição diferente das próteses revestidas, quando há um contato direto entre a superfície revestida e o tecido ósseo cortical (TANINO *et al.* 2009). Mesmo assim, a osteocondução e a fixação dos implantes por crescimento de tecido ósseo são esperadas em longo prazo. Neste trabalho, os resultados indicaram a formação de um tecido que não levou a um incremento da força necessária para a retirada do pino intramedular quando comparado ao MC. Sugere-se que a proporção de 20% de hidroxiapatita no compósito testado tenha sido insuficiente para promover a formação de tecido ósseo nos tempos avaliados.

4. Avaliação macroscópica das tíbias

Aos 8 dias de acompanhamento pós-cirúrgico, na região da falha proximal para inserção do pino intramedular e compósito, foi observado, em MT e MC, que a aparência era semelhante àquela do momento da cirurgia. Os orifícios possuíam coloração avermelhada, bem semelhante à coloração medular, e àquela do compósito após sua homogeneização na medula (figura 8 A).

Nas tíbias dos animais de G2 e G3, a superfície da região da falha possuía aparência similar à do tecido circunvizinho (figura 8 B), nem sempre sendo possível sua identificação macroscópica nas tíbias avaliadas, tanto em MT quanto em MC. Não ocorreram sinais macroscópicos de rejeição do implante, que seriam representados por reações periosteais locais, reabsorção óssea, necrose como também descrito na análise radiográfica, o que sugere a osseointegração e a biocompatibilidade do compósito. Assim como encontrado por Alves *et al.* (2011), a maioria das falhas encontravam-se recobertas por periósteo e por fina camada de tecido esbranquiçado denso. No referido trabalho, tal tecido foi caracterizado histologicamente como tecido conjuntivo fibroso, o qual sinaliza o processo de cicatrização do periósteo e dos tecidos adjacentes que porventura foram danificados pela confecção da falha óssea.

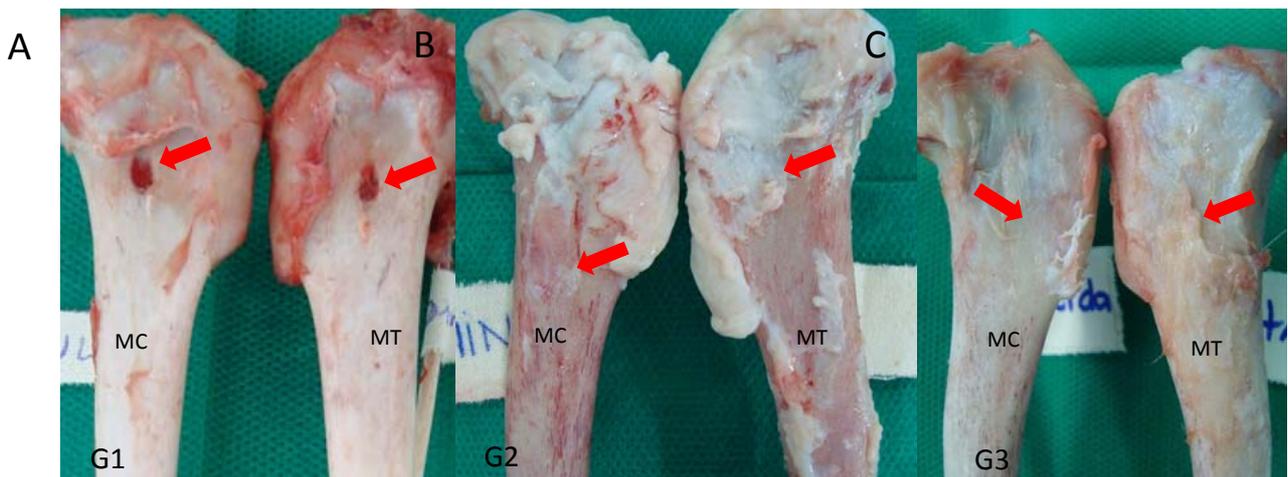


Figura 8: Epífises proximais das tíbias de cães exibindo o orifício confeccionado cirurgicamente (seta) para inserção do pino intramedular de Schanz aos 8, 60 e 150 dias após o procedimento cirúrgico nos MT e MC.

Foi utilizado nesse experimento pino intramedular de Schanz, que possui região distal rosqueada, o que aumentou a área de contato do implante metálico com o compósito, mimetizando as próteses femorais utilizadas para ATQ não cimentadas, como descrito por Canella *et al.* (2010). Esperava-se que ocorresse o crescimento ósseo a partir das corticais adjacentes, e que nessa região a fixação do implante fosse maior pela interdigitação do tecido ósseo nas roscas do pino. Na análise dos pinos intramedulares, principalmente em sua região rosqueada, em G1, não foi detectada aderência de tecido ou de compósito sobre sua superfície, permitindo total visibilidade dessa região, que se manteve com as mesmas características do momento de sua colocação, tanto em MT quanto em MC (figura 9 A-B). Martinez (2008) descreve características similares para a aparência da rosca nesse mesmo tempo, mas descreve a presença do compósito em algumas roscas do MT.

Em G2, 70% dos pinos intramedulares apresentavam material aderido após sua retirada da medula óssea (figura 9 C-D), esse material, em sua maioria, possuía coloração avermelhada e estava em volume mais abundante do que aquele encontrado nas roscas dos pinos retirados das medulas das tíbias do G3 tanto no MT quanto no MC. Nesse último grupo, o material apresentou coloração brancacenta e textura semelhante a tecido ósseo (figura 9 E-F) macroscopicamente, resultado similar ao descrito por Martinez (2008).

Diferentes tipos teciduais podem estar intimamente aderidos a implantes metálicos. É descrito que esses implantes podem estar recobertos por tecido fibroso, ou intimamente integrados ao tecido ósseo, como no caso dos implantes que sofrem tratamentos em sua superfície. Tais questões foram discutidas por Pereira *et al.* (2007), Tanino *et al.* (2009), Gustaldi e Aparecida (2010), Sisti (2011), Marin *et al.* (2011), Yamada *et al.* (2012) e diversos outros autores na literatura. Sendo assim pode-se sugerir que o tecido aderido ao implante poderia ser tanto ósseo como fibroso, mas como não foram feitas análises histológicas, de difração de raios x ou outras análises nesse material, não se pode afirmar qual a natureza desse tecido.

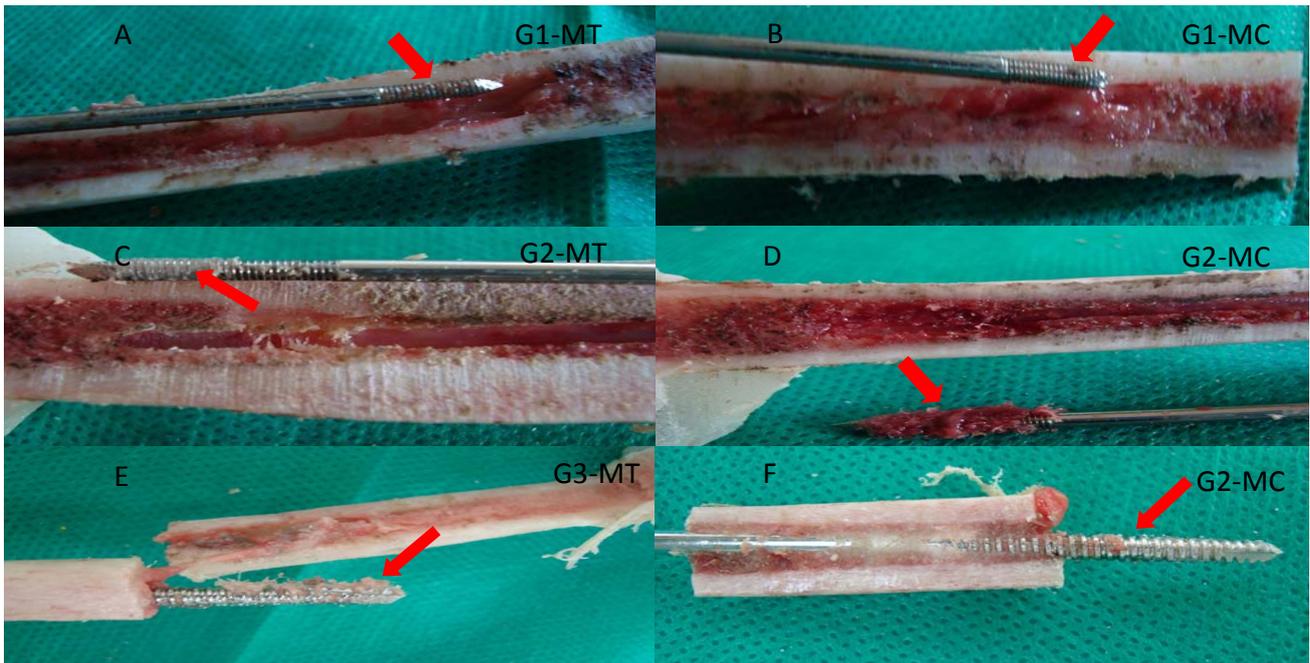


Figura 9: Fotografia da região medular das tíbias de cães submetidos à cirurgia experimental. Evidencia-se a região rosqueada do pino intramedular de Schanz (seta) quanto à presença de material aderido. Em A e B tem-se as tíbias do G1, 8 dias de pós-cirúrgico, em C e D as tíbias do G2, 60 dias, e em E e F aquelas do G3 com 150 dias de pós-cirúrgico.

5. Difração de raios X (DRx)

Foram realizados difratogramas da HAP-91® e do compósito HAP-91-L® para inicialmente fazer a caracterização de seus picos. Foram observados picos característicos altos e agudos todos de acordo com a literatura para a hidroxiapatita (figura 10), como também demonstrado por Yamada *et al.* (2012). No difratograma do compósito foram observados apenas picos característicos da hidroxiapatita, uma vez que a lignina não possui cristalinidade ou componentes minerais (figura 11).

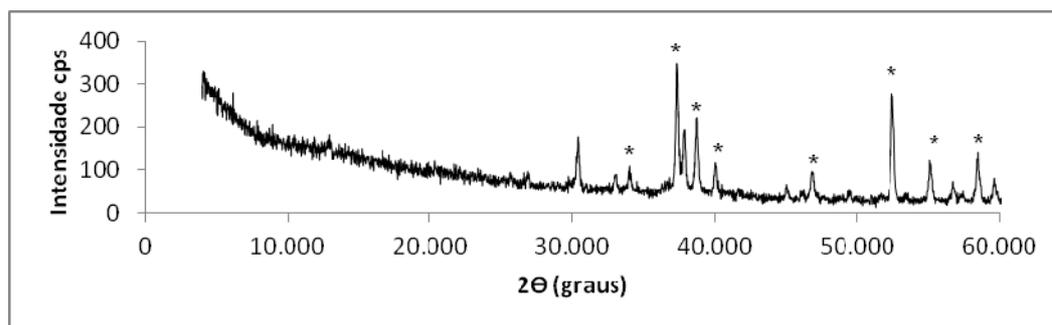


Figura 10: Difratoograma da hidroxiapatita sintética (HAP-91) *in vitro*. *Picos característicos da hidroxiapatita

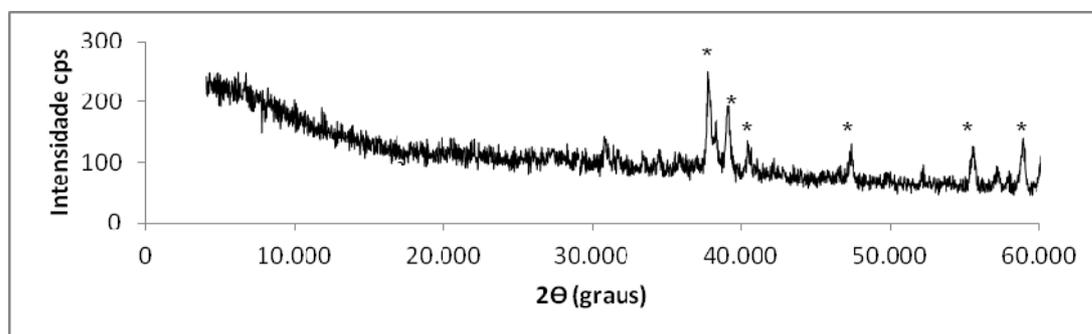


Figura 11: Difratoograma do compósito testado (HAP-91-L). *Picos de hidroxiapatita.

Nos difratogramas dos três grupos MC (figura 12), foi observada ausência de material cristalino e presença de uma onda típica de materiais orgânicos de baixa cristalinidade. Notou-se que em dois MC, um de G3 (primeira linha) e outro de G2 (terceira linha), não houve presença da onda característica descrita acima, sugerindo que nesses animais ocorreu uma formação tecidual menos intensa do que nos demais MC.

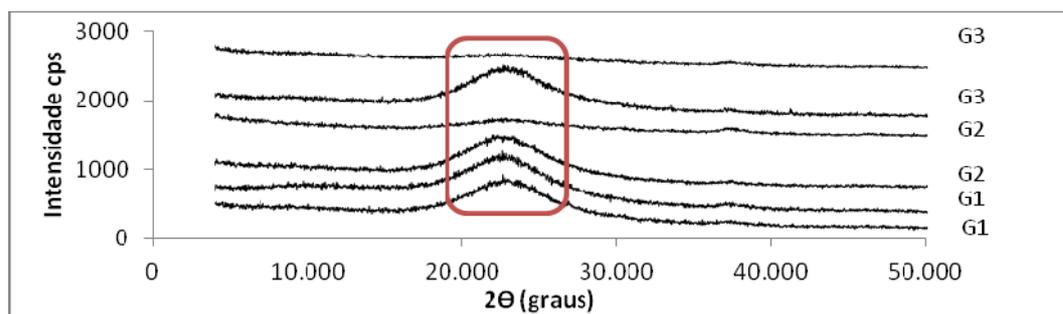


Figura 12: Difratomogramas do material obtido do canal medular das tíbias de cães do MC, ou seja, das tíbias que não receberam o compósito testado. Circulado em vermelho estão as ondas características de materiais orgânicos de baixa cristalinidade.

A avaliação dos membros tratados foi realizada separadamente, de acordo com seu grupo de avaliação. Na figura 13 podem ser observadas as duas tíbias que compuseram o G1, onde se observou uma primeira onda, que como dito anteriormente, representa materiais orgânicos de baixa cristalinidade, similar aos difratogramas dos MC. Também demonstram-se picos pouco amplos, mas típicos de hidroxiapatita, como já observados nas figuras 10 e 11. Tal fato indica a presença de hidroxiapatita nesse tempo de acompanhamento.

Na figura 14 nos difratogramas do G2, pode-se observar um padrão similar ao do difratograma de G1. O primeiro grupo de ondas é mais uniforme entre si, mas com menor amplitude, se comparado à primeira linha de G1 (figura 13). São observados picos característicos de HAP-91, mas esses não estão bem definidos quando comparados a G1. Tal fato sinaliza diminuição da quantidade de hidroxiapatita presente no canal medular desses animais, o que pode nos indicar perda desse material durante a raspagem do canal, levando em consideração que a sua concentração no compósito era pequena, como já discutido. Pode-se sugerir também a osseointegração desse material, estando de acordo com Martinez (2008) quando da observação dos difratogramas desse autor, uma vez que a completa absorção da hidroxiapatita demoraria alguns anos para ser concluída, como descrito por Tanino *et al.* (2009).

No difratograma de G3 (figura 15), o primeiro grupo de ondas que representa tecido orgânico de baixa cristalinidade, se mostra heterogêneo, o que pode sugerir

menor formação tecidual em um dos membros tratados. Essa baixa amplitude também foi observada no difratograma do mesmo animal, no membro controle (segunda linha) representado na figura 12, o que pode sinalizar uma reação particular de menor formação tecidual do cão em questão, uma vez que respostas individuais são esperadas nos experimentos realizados *in vivo*.

Também na figura 15, estão presentes discretos picos característicos da HAP-91, o que pode indicar novamente sua integração ao tecido ósseo. Isto se baseia no fato de que os pequenos picos observáveis têm características compatíveis com a parte inorgânica que constitui o tecido ósseo, o que também foi observado por Martinez (2008), em um tempo de acompanhamento de 120 dias pós-operatório.

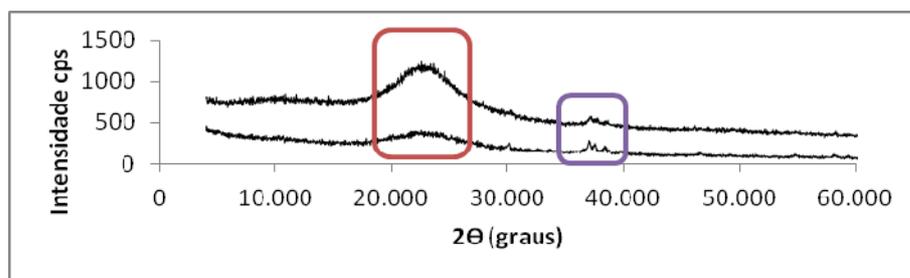


Figura 13: Difratogramas de G1 (8 dias de acompanhamento pós-cirúrgico) do MT: membro tratado com o compósito HAP-91-L®. Circulado em vermelho estão ondas características de materiais orgânicos de baixa cristalinidade, e circulado em roxo estão picos característicos da HAP-91.

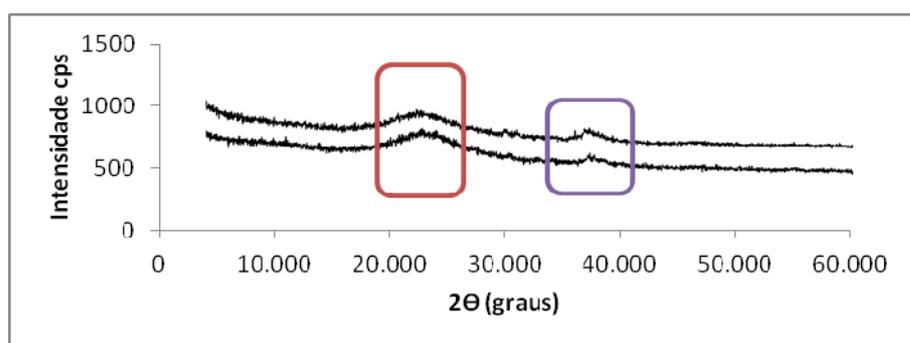


Figura 14: Difratogramas de G2 (60 dias de acompanhamento pós-cirúrgico) do MT: membro tratado com o compósito HAP-91-L®. Circulado em vermelho estão ombreiras, características de materiais orgânicos de baixa cristalinidade, e circulado em roxo estão picos característicos da HAP-91.

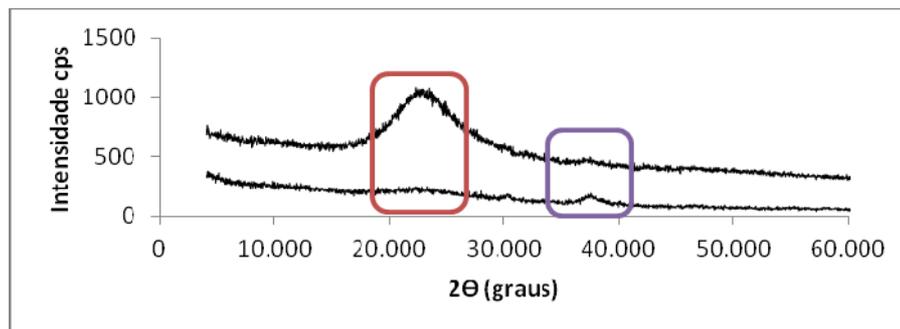


Figura 15: Difratogramas de G3 (150 dias de acompanhamento pós-cirúrgico) do MT: membro tratado com o compósito HAP-91-L®. Circulado em vermelho estão ombreiras, características de materiais orgânicos de baixa cristalinidade, e circulado em roxo estão picos característicos da HAP-91.

Com os resultados obtidos pela análise de DRx é possível presumir que ocorreu gradativa osseointegração do compósito. Tais afirmações são inferidas pelo fato das ondas característica dessa cerâmica terem se tornado menos intensas com o passar do período de acompanhamento, sugerindo que o composto foi gradativamente incorporado ao tecido ósseo recém-formado.

6. Aspectos histológicos

Nas regiões da falha óssea para inserção do pino intramedular em G1, foi observada, no MT (figura 16 A) a presença de áreas com formação de matriz provisória, tecido trabecular com áreas de grande celularidade, com a presença de osteoblastos, típicos de formação recente de tecido ósseo. Já no MC (figura 16 B), havia a presença de coágulo e qualitativamente a formação de menor número de delgadas trabéculas assim como menor celularidade do que no MT, sugerindo menor formação de tecido ósseo. Tais achados estão de acordo com Damien *et al.* (2003) que afirmam que o tratamento com hidroxiapatita acelera o crescimento ósseo observado na primeira semana de acompanhamento quando comparado ao grupo controle.

Em G2 e G3, nas regiões da falha tanto em MT quanto em MC, foi observada maior concentração de osteoblastos na matriz, o que sugere formação óssea mais recente. Tal fato também foi observado por Ribeiro *et al.* (1996) que analisou a

regeneração óssea espontânea em falha de tíbias de cães, em tempo similar ao avaliado.

Em nenhum dos grupos foi observada histologicamente a presença de cápsula fibrosa ou infiltrado inflamatório mononuclear, de leve ou moderada intensidade, que seria caracterizado pela presença de macrófagos, linfócitos e células gigantes multinucleadas ao redor do implante. Tais achados foram descritos por Alves *et al.* (2011) que testou um compósito formado por polihidroxibutirato (70%) e hidroxiapatita (30%) e concluiu que tal compósito estimulou a resposta inflamatória crônica, produzindo encapsulamento e absorção gradual do implante. Tal fato poderia gerar falha mecânica do implante, empecilho na consolidação de fraturas levando a diversos consequências como a não-união óssea. Assim, aliando-se a semelhança da regeneração óssea normal em MT, a ausência das reações adversas e sua incorporação em meio ao tecido ósseo, demonstra-se a biocompatibilidade e osseointegração do compósito HAP-91-L® também descritas por Vital (2005) e Martinez (2008).

Não foram observados macrófagos contendo grânulos de HAP-91® no seu interior como descrito por Borges *et al.* (2000), ou células gigantes que sugerissem degradação do material, como descrito por Carlo (2007) e Alves (2011). Tal fato denota que, dentro dos períodos avaliados e das amostras coletadas, não foram encontrados sinais de degradação do compósito HAP-91-L®.

Em algumas amostras do MT, havia a presença de material acidófilo, acelular e amorfo, entremeadas por regiões de vazio, que podem representar áreas onde havia cristais de hidroxiapatita que se perderam com a descalcificação, como descrito por Tamai *et al.* (2001) como “fantasmas” da descalcificação da hidroxiapatita. Borges *et al.* (2000) descreveu histologicamente a hidroxiapatita como material amorfo, acelular e bem delimitado sem afinidade pelo corante de H.E. Sendo assim, sugere-se que tal material acidófilo encontrado no MT seja a lignina. O compósito se encontrava circundado por matriz óssea, em contato direto com a mesma, sem interposição por tecido fibroso, como já discutido anteriormente (figura 17). Isso indica formação óssea ocorrendo ao redor do mesmo, sem reação adversa local que pudesse interferir no processo natural de regeneração do tecido, se mostrando assim biocompatível e osteocondutor.

Na região óssea que estava imediatamente ao redor da rosca do pino não foi observada reação adversa no tecido ósseo cortical adjacente. Também não foi observada a presença do compósito em nenhuma das amostras do MT. Tal fato pode estar associado ao processamento das lâminas, com perda do material da região medular, e também a aderência de material na rosca do pino intramedular, como observado na figura 10. O pino foi retirado antes da fixação do material em formol 10%, o que favoreceu a ausência de material aderido na rosca do pino nessa análise. Sendo assim, através da análise histológica, não podem ser feitas inferências acerca do comportamento do compósito e do tecido neoformado no canal medular adjacente ao pino intramedular.

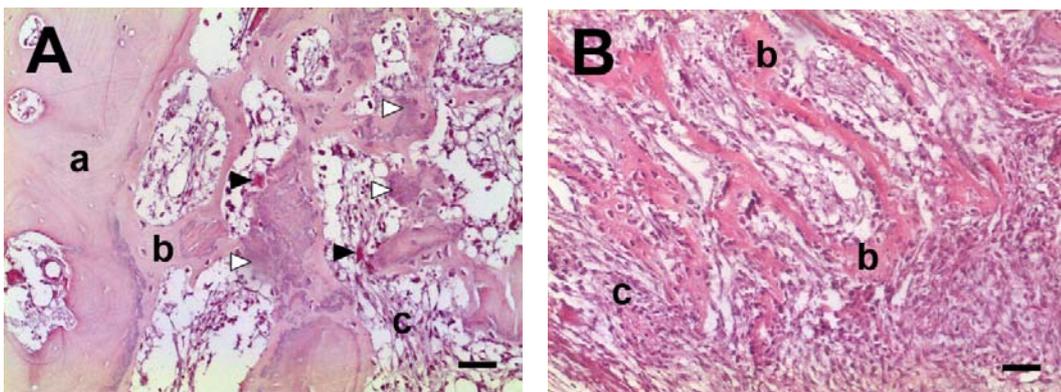


Figura 16: Fotomicrografia da região do defeito para inserção do pino intramedular após 8 dias da realização do procedimento cirúrgico no MT (A) e MC (B) de um mesmo animal. Tecido ósseo original (a), tecido ósseo neoformado (b), proliferação de matriz provisória (c), osteoclastos (cabeça de seta preta), biomaterial (cabeça de seta branca). A barra preta corresponde a 50 μ m, aumento original de 100x, H&E.

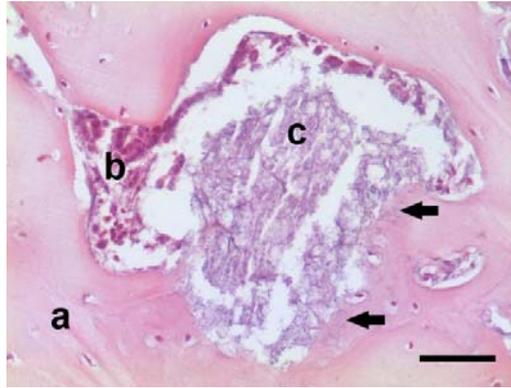


Figura 17: Fotomicrografia da região do defeito para inserção do pino intramedular após 60 dias da realização do procedimento cirúrgico no MT. Trabécula óssea com osteócitos maduros (a), células da medula óssea (b), resquícios do biomaterial (c). Setas pretas indicam interface de interação entre o tecido ósseo e o biomaterial. A barra preta corresponde a 50 μ m, aumento original de 200x, H&E.

7. Conclusão

Com base nos resultados obtidos e nas condições em que o presente estudo foi realizado, foi possível concluir que o compósito de HAP-91-L® (20% HAP-91® e 80% Lignina) é biocompatível, osteocondutor, e possuiu capacidade de osseointegração. Em relação ao incremento na resistência inicial do conjunto pino/compósito, apesar de não ter tido diferença estatística significativa entre os membros, ocorreu um aumento no valor das médias da força necessária para a retirada do pino intramedular aos 150 dias no MT quando comparado ao MC.

REFERÊNCIAS

- ABUKAWA, H. et al. *The Engineering of Craniofacial Tissues in the Laboratory: A Review of Biomaterials for Scaffolds and Implant Coatings*. Dent. Clin. N. Am., v.50, p.205-216, 2006.
- ALVES, E.G.L. et al. *Orthopedic implant of a polyhydroxybutyrate (PHB) and hydroxyapatite composite em cats*. Journal of Feline Medicine and Surgery, v.13, p.546-552, 2011.
- AMARAL, M. B. do. *Citotoxicidade in vitro e biocompatibilidade in vivo de compósitos a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana*. 2006. Disponível em: < <http://lakh.unm.edu/handle/10229/32179>>. Acesso em 27 out. 2011.
- AULAKH, T.S. et al. *Long-term clinical outcomes following the ues of synthetic hydroxyapatite and boné graft in impaction in revisions hip arthroplasty*. Biomaterials, v. 30, p. 1732-1738, 2009.
- BENG, S.H. et al. *Timing of femoral prosthesis insertion during cemented arthroplasty: cement curing and static mechanical strength in na in vivo model*. Journal list, Can. J. Surg. V.54, n.1, p. 33-38, 2011.
- BILLOTTE, W.G. *Ceramic Biomaterials*, The Biomedical Engineering Handbook: 2. ed., Boca Raton: CRC Press LLC, 2006.
- BOKHARI, M.B. et al. *Learning curve for robotic-assisted laparoscopic colorectal surgery*. Surgery Endosc. v.23, n.3, p. 855-860, 2010.
- 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*. 1998. 112p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1998.

BORGES, A.P.B. et al. *Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado na 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.

BOROJEVIC, R. *Terapias Celulares e Bioengenharia*. Gaz. Med. Bahia, v.78, supl.1, p.42-46, 2008.

BRAGA, D.P. *Incidência e fatores de risco associados à infecção do sítio cirúrgico na clínica de cães e gatos do hospital veterinário da Universidade Federal de Viçosa*. 2008. 104p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. *Biomaterial developments for bone tissue engineering*. Biomaterials, v.21, p.2347-2359, 2000.

CAMARINI, E. T. *Expansão vestibulo-lingual no corpo da mandíbula com e sem utilização de hidroxiapatita natural ou vidro bioativo: avaliação clínica e microscópica em cães*. 2001. 136p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Araçatuba, SP, 2001.

CAMARINI, E. T. et al. *Utilização de Biomateriais Associados ou não ao Plasma Rico em Plaquetas em Cavidades Ósseas Cranianas. Estudo Microscópico em Cães*. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, v. 6, n.002, p. 199-206, 2006.

CANELLA, R.P. et al. *Revisão de artroplastia total do quadril com prótese modular não-cimentada de fixação distal tipo ZMR®. Análise clínica e radiográfica de 30 casos*. Rev. Bras. Ortop. v.45, n.3, p. 279-285, 2010.

CARLO, E.C. et al. *Resposta tecidual ao compósito 50% hidroxiapatita: 50% poli-hidroxi-butilato para substituição óssea em coelhos*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec; v.61, n.4, p.844-852, 2009.

- CARLO, E.C. *Compósitos de hidroxiapatita e polihidroxibutirato em defeitos ósseos experimentais na ulna de coelhos*. 2007. 59 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.
- CIANI, R.B. et al. *Mistura de proteínas morfogenéticas ósseas, hidroxiapatita, osso inorgânico e colágeno envolta por membrana de pericárdio no preenchimento de defeito ósseo segmentar em coelhos*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v.58, n.1, p. 59-67. 2006.
- CORBI, S.C.T. et al. *Avaliação física radiográfica de biomateriais usados para a regeneração óssea*. Ver. Odontol. UNESP, v.39, n.2, p.101-107, 2010.
- COSTA, C. A. S. *Testes de citotoxicidade em culturas de células*. In: ESTRELA, C. Metodologia Científica. Ensino e Pesquisa em Odontologia. São Paulo: Artes Médicas, p. 145-160, 2001.
- DAMIEN, E. et al. *A preliminary study on the enhancement of the osteointegration of a novel synthetic hydroxyapatite scaffold in vivo*. Journal of Biomedical Mat. Research, part A, v. 66^a, issue 2, p.241-246, 2003.
- DORNBUSCH, P.T. et al. *Avaliação radiográfica da aplicação do polímero de mamona em falhas ósseas induzidas em equinos*. Archives of veterinary Science, v.15, n.1, p.1-8, 2010.
- DUARTE, T.S. et al. *Osseointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar de mandíbula de cães: aspectos histológicos*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.48, n.5, p.848-853, 2006.
- E'GUES, M. A. M.; PAULA, M. DE; GOISSIS, G. *Compósito de colágeno com silicato e hidroxiapatita como material para endodontia: preparação e caracterização*. Rev. Odonto Ciênc., v.23, n.2, p.134-140, 2008.
- FERNANDES, R. G.; FAIG-LEITE, H.; CARVALHO, Y. *Estudo da Reparação Óssea na Mandíbula de Coelhos Sob a Ação do Alendronato Sódico e da sua*

Associação com a Hidroxiapatita. Revista de Odontologia da UNESP, v.33, n.3, p. 123-30, 2004.

FRANCO, K.L. *et al.* *Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita sintética associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tíbia de cães: aspectos da osseointegração à microscopia de luz transmitida*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v.53, n.4, 2001.

FREEMAN, M.A.R. *et al.* *Observation upon the interface between bone and polymethylmethacrylate cement*. J. Bone J. Surg. 64B, p. 489-493, 1982

FREITAS, S.H. *et al.* *Aspecto radiológico de heteroenxerto ósseo cortical fragmentado na reparação de falhas ósseas em coelhos*. Ver. Bras. Ci. Vet., v.15, n.3, p. 107-110, 2008.

FUJIBAYASHI, S. *et al.* *Comparative study between in vivo bone ingrowth and in vitro apatite formation on Na₂O–CaO–SiO₂ glasses*. Biomaterials, v.24, p. 1349-1356, 2003.

GARRIDO, C. A.; SAMPAIO, T. C. F. V. S. *Uso da biocerâmica no preenchimento de falhas ósseas*. Rev. bras. ortop. v.45, n.4, 2010.

GUASTALDI, A.C. e APARECIDA, A.H. *Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos*. Quim. Nova, v.33, n.6, p. 1352-1358, 2010.

HARPER, E.J. *Bioactive bone cements*. Proc. Instn. Mech. Engrs. 212, p. 113-118, 1998.

HENCH, L.L. *The challenge of orthopaedic materials*. Current orthopaedics, v.14, p.7-15, 2000.

HENCH, L. L.; WILSON, J. *An introduction to bioceramics*. Singapore: World Scientific, p. 1-25, 1993.

IAMAGUTI, L.S. *et al.* *Análise histológica e morfométrica do uso de membrana biossintética de celulose em trocleoplastia experimental em cães.* Pesq. Vet. Bras., v.28, n.4, p.195-200, 2008.

IORIO R. *et al.* *Orthopaedic surgeon workforce and volume assessment for total hip and knee replacement in the United States: preparing for an epidemic.* J Bone Joint Surg Am. n.90, v.7, p.1598-605, 2008.

JASTY, M. *et al.* *Histomorphological studies of the long-term skeletal responses to well fixed cemented femoral componente.* J. Bone J. Surg. 72A, p. 1220-1225, 1990

JONES LC, HUNGERFORD DS. *Cement disease.* Clin Orthop Relat Res. v.225, p.192, 206, 1987.

JUDAS, F., FIGUEIREDO, H., DIAS, R. *Biomateriais em cirurgia ortopédica reconstrutiva.* 2009. Disponível em

<<http://rihuc.huc.minsaude.pt/bitstream/10400.4/1203/1/biomaterias.pdf>> Acesso em: 28 out. 2011.

KABAYASHI, S. *Biopolymers: Lignin, proteins, bioactive nanocomposites.* 1 ed. Editora Springes, p. 1-64, 2009.

KAWACHI, E.Y; *et al.* *Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar.* Quim. Nova, v. 23, n.4, p.518-522, 2000.

KIM, H.M. *Ceramic bioactivity and related biomimetic strategy.* Current Opinion in Solid State and Materials Science, v.7, p.289-299, 2003.

KIRKPATRICK, C.J. *et al., In vitro methodologies to evaluate biocompatibility: status quo perspective.* ITBM-RBM, v. 26, p. 192-199, 2005.

KOKUBO, T.; KIM, H.M.; KAWASHITA, M. *Novel bioactive materials with diferente mechanical properties.* Biomaterials, v.24, p. 2161-2175, 2003.

MACHADO, C. P. G. *Avaliação da hidroxiapatita contendo estrôncio como substituto ósseo em tíbias de ovelhas*. Innov. Implant. J. Biomater. Esthet. v.5, n.1, 2010.

MACNEILL, S.R. et al. *In vivo comparison of synthetic osseous graft materials*. A preliminar study. Journal of Clinical Periodontology, v.26, p.239-245, 1999.

MAGALHÃES, A. H. M. et al. *Estudo da osteocondução e osteoindução através da associação de biocerâmica e colágeno para fixação interna da órbita*. 2004. Disponível em: < <http://www.jhs.med.br>>. Acesso em: 02 nov. 2011.

MARIN, C. et al. *Avaliação biomecânica e histológica de implantes com diferentes macrogeomateriais no período inicial de osseointegração. Estudo experimental em cães*. Ver. Implantnews, v.8, n.2, p.247-251, 2011.

MARTINEZ, M.M. *Osseointegração clínica-radiológica do compósito hidroxiapatita-lignina entre implante metálico e tecido ósseo em coelho*. 2008. 64 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

MINTO, W.B. et al. *Artroplastia total coxofemoral em cães. Estudo experimental com prótese nacional*. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.1, p. 136-142, 2008.

MOBASHERI R, GIDWANI S, ROSSON J.W. *The effect of total hip replacement on the employment status of patients under the age of 60 years*. Ann R Coll Surg Engl. n.88, v.2, p.131-133, 2006.

MONTANHA, V.C.; JURI, M. *Modificação da superfície do titânio por recobrimento com TiO_2 e hidroxiapatita visando a utilização como biomaterial*. In: Workshop Bone as Engineering Material, 1., Proceedings of the bone as engineering material workshop, São Carlos, 2011. Anais. v.1 p. 41-44, 2011.

MORAES, J.R.E et al. *Propriedades mecânicas de três padrões de sutura no reparo de tendão do músculo flexor profundo do dedo em equinos*. Braz. J. Res. Anim. Sci., v.39, n.2, p.97-102, 2002.

NAVARRO, M. et al. *Biomaterials in orthopaedics*. J. R. Soc. Interface, v.5, p.1137-1158, 2008.

Ni, G.X. et al., *Effect of strontium-containing hydroxyapatite bone cement on bone remodeling following hip replacement*. J Mater Sci Mater Med, 21, p.377-384, 2010.

OH, S. et al. *Bioceramics for Tissue Engineering Applications: A Review*. Am. J. Biochem. & Biotechnol., v.2, n.2, p.49-56, 2006.

OLIVEIRA, S.M. et al. *Engineering Endochondral Bone: In Vivo Studies*. Tissue Eng. Part A, v.15, n.3, p.635-643, 2009.

PEREIRA, G.A. et al. *Acetábulo rosqueado CO-10 revestido com hidroxiapatita: segmento de sete a 13 anos em pacientes com idade superior a 64 anos*. Ver. Bras. Ortop. V.42, p. 24-32, 2007.

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L.; DECAMPO, C.E. *Handbook os small animal orthopedics and fracture repair*, 4 ed. Missouri: Saunders Elsevier, p.139-140, 2006.

REA, S.M. et al. *Osteoblast-like cell response to bioactive composites-surfasse topography and composition effects*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. n.70, v.2, p.250-61, 2004.

REZENDE, C.M.F. et al. *Aspectos clínicos-cirúrgicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães*. Arq. Bras. Med. Vet. E Zotec. N.50, v.5, p.537-545, 1998.

RIBEIRO, R.F. et al. *Modelo experimental de regeneração óssea espontânea*. Ver. Bras. Ortop., v. 31, n.11, 1996.

RIGO, E.C.S. et al. *Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação*. Ver. Dental Press. Periodontal Implantol., v.1, n.3, p.39-50, 2007.

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

ROHANIZADEH, R.; TRECANT-VIANA, M.; DACULSI, G. *Ultrastructural study of apatite precipitation in implanted calcium phosphate ceramic: influence of the implantation site*. *Calcified Tissue International*, v.64, p.430-436, 1999.

ROLIM, A. E. H. *Avaliação de microsferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito ósseo crítico, em calvária de rato*. 2010. 91p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Odontologia, Salvador, BA, 2010.

ROSSI, A.M., et al., *A ciência e tecnologia das biocerâmicas*. Revista do CBPF, Disponível em:

<<http://portal.cbpf.br/protected/Pages/divulgacao/pdfs/BioMat.pdf>>. Acesso em: nov. 2011.

SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, J.T. *Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds*. *Eur. Cell. Mater.*, v.5, p. 29-40, 2003.

SANTOS JUNIOR, J.C.M. *Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave*. *Ver. Bras. Coloproct.* v.23, n.3, p.206-210, 2003.

SANTOS, L.A. et al., *Melhoramento microestrutural de cimento ósseo de fosfato de cálcio de dupla pega*. In: Congresso Brasileiro de Cerâmica em Florianópolis, 45., 2001, Florianópolis, SC. Anais p. 2100501-2100515, 2001.

SANTOS, M. H. et al. *Avaliação da citocompatibilidade dos compósitos hidroxiapatita/colágeno dopados com Zn⁺²*. *Matéria (Rio J.)* v.12 n.2, 2007.

SILVA, M. H. P.; *Apostila de Biomateriais*. Disponível em:

<http://mesonpi.cat.cbpf.br/e2006/posgraduacao/pdf_p3/ApostilaBiomateriaias.pdf

> Acesso: 27 ago. 2011.

SILVA, S. B. DA. et al. *Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães*. *Cienc. Rural* v.37 n.4, 2007.

SILVEIRA, V.A. et al. *Aspecto interdisciplinar na pesquisa da biocompatibilidade dos materiais dentários*. *Ver. Biociênc. Taubaté*, v.10, n.4, p.209-213, 2004.

SISTI, K.E. *Estudo da topografia e da osseointegração de implant de titânio sob ação do laser, com ou sem deposição de hidroxiapatita em coelhos*. 2011. 95p. Tese (Doutorado) Programa de pós-graduação em saúde e desenvolvimento na Região Centro Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – MS, 2011.

SORATTO, A. L.; GROMATZKY, A.; SENDYK, W. R. *Análise da aplicação de uma membrana de colágeno bovino entre o periósteo e o enxerto ósseo, na cirurgia de levantamento de seio maxilar*. *Periodontia*, v.16(02), p.35-41, 2006.

TABATA, Y. *Biomaterial technology for tissue engineering applications*. *J. R. Soc. Interface*, v.6, p.311-324, 2009.

TAMAI, N. et al. *Novel fully interconnected porous hydroxyapatite ceramic in surgical treatment of benign bone tumor*. *J. Orthop. Sci.*, v.15, n.4, p.560-568, 2010.

TAMPIERE, A. et al. *Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone*. *Biomaterials*, v.22, n.11, p.1365-1370, 2001.

TANINO, A.J. et al. *Bone remodeling and hydroxyapatite resorption in coated primary hip prostheses*. *Clin. Orthop. Relat. Res.* v.467, n.2, p. 478-484, 2009.

TEIXEIRA, C. R. *Defeitos ósseos segmentares induzidos em tíbia de ovinos, tratados com placa metálica associada a um cage preenchido com enxerto de biomateriais ou osso cortical autólogo*. 2006. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Botucatu, SP, 2006.

TRONCHET, M. *et al. Cinnamyl alcohol dehydrogenases C and D, key enzymes in lignina biosynthesis, play an essential role in disease resistance in Arabidopsis*. Mol. Plant Pathol, v.11, p.83-92, 2010.

VANHOLME, R. *et al. Lignin biosynthesis and structure*. Plant Physiology, v.153, p. 895-905, 2010.

VAZ, G.J.O., *et al. Cerâmicas com alta porosidade para scaffolds*. In: Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 4. Agosto, 2006.

VITAL, C.C. *Hidroxiapatita associada à lignina no preenchimento de falha óssea experimental na tíbia de coelhos*. 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG, 2005.

WAANDERS, D. *et al. The mechanical effects of different levels of cement penetration at the cement-bone interface*. Journal of Biomechanics v.43, n.6, p. 1167-1175, 2010.

WAN, D.C.; NACAMULI, R.P.; LONGAKER, M.T. *Craniofacial Bone Tissue Engineering*. Dent. Clin. N. Am., v.50, n.2, p.175-190, 2006.

WANG, M. *Developing bioactive composite materials for tissue replacement*. Biomaterials. n.24, v.13, p.2133-51, 2003.

WILLIAMS, D.F. *Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, march 3-5, 1986*. Ed. Elsevier, 1987.

YAMADA, M. *et al.* *Bone integration capability of nanopolymorphic crystalline hydroxyapatite coated on titanium implants.* International Jour. of Nanomedicine, n.7, p.859-873, 2012.

ZENÓBIO, E. G. *et al.* *Avaliação do comportamento biológico de dois materiais sintéticos, à base de fosfato de cálcio (Biohapatita R e Osteogem R) após a implantação em alvéolos de cães.* Rev. odontol. UNESP; v.27(1), p.73-85, 1998.

ZILLOTTO, L. *et al.* *Utilização de implante ósseo cortical alógeno conservado em glicerina para preservação de membro torácico. Estudo experimental em cães.* Acta Cirúrgica Brasileira, v.18, n.2, p.107-115, 2003.