

VIVIANI DA SILVA SOARES TEIXEIRA

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE HASTES DE POLÍMERO DE
MAMONA DOPADO COM VIDRO BIOATIVO E HIDROXIAPATITA NO
CANAL MEDULAR DO FÊMUR DE RATOS**

CAMPO GRANDE
2012

VIVIANI DA SILVA SOARES TEIXEIRA

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE HASTES DE POLÍMERO DE
MAMONA DOPADO COM VIDRO BIOATIVO E HIDROXIAPATITA NO
CANAL MEDULAR DO FÊMUR DE RATOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Saúde e Desenvolvimento na
Região Centro-oeste da
Universidade Federal do Mato
Grosso do Sul, para obtenção do
título de Mestre.

Orientador (a): Iandara Schettert
Silva

CAMPO GRANDE
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

VIVIANI DA SILVA SOARES TEIXEIRA

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE HASTES DE POLÍMERO DE
MAMONA DOPADO COM VIDRO BIOATIVO E HIDROXIAPATITA NO
CANAL MEDULAR DO FÊMUR DE RATOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Saúde e Desenvolvimento na Região
Centro-oeste da Universidade Federal
do Mato Grosso do Sul, para
obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a **Deus**, sempre presente em minha vida iluminando meus caminhos.

A minha filhinha **Maria Clara** fonte de todo meu amor e inspiração.

Ao meu marido **Stéfano** por todo carinho, paciência e presença constante em cada etapa dessa caminhada.

Aos meus pais, **Mauro e Solange** e ao meu irmão **Leonardo**, que mesmo a distância estão sempre presentes em minha vida dando apoio e carinho.

A minha irmã **Soliany** e ao meu cunhado **Pedro** pela mão sempre estendida neste caminho.

Enfim, a toda minha amada família por acreditarem e me incentivarem sempre.

AGRADECIMENTOS

- A **Prof^a. Dr^a. Iandara S. Silva**, minha orientadora, por toda a dedicação e ensino.
- Ao **Prof. Dr. José Renato J. Delben** e ao **Prof. Dr. Petr Melnikov** pelo auxílio na obtenção dos materiais utilizados no experimento.
- A **Gilberto Gonçalves Facco** por todo trabalho prestado na análise e obtenção das imagens histológica.
- Ao **Prof. Daniel Pereira** por todo suporte estatístico prestado.
- Ao colega **Renato Nacer** pelas idéias sugeridas para a realização experimental deste trabalho.
- Ao **Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul** por toda a disposição e colaboração para a realização da parte experimental.
- Ao **Programa de pós-graduação “Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste”** na pessoa do seu Diretor **Prof. Dr. Ricardo Aydos** e dos **professores** e **funcionários** pela valiosa oportunidade de aprender e concretizar um sonho.

RESUMO

Teixeira, VSS. Estudo do comportamento de hastes de polímero de mamona dopado com vidro bioativo e hidroxiapatita no canal medular do fêmur de ratos. Campo Grande; 2012. [Dissertação – Universidade Federal do Mato grosso do Sul].

Atualmente a associação de biomateriais tem sido realizada com o intuito de minimizar suas deficiências individuais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de hastes de polímero de mamona dopado com vidro bioativo e hidroxiapatita no canal medular do fêmur de ratos para uma possível aplicação como método para fixação de fraturas e reparação óssea. Foram utilizados 28 ratos adultos machos (*Rattus Norvegicus* da linhagem Wistar *albinus* distribuídos em três grupos experimentais: grupo A – implante composto por polímero de mamona e dopado com vidro bioativo; grupo B – implante formado apenas por polímero de mamona e; grupo C – implante constituído de polímero de mamona e dopado com vidro bioativo e hidroxiapatita. Após 15 e 60 dias de avaliação as peças cirúrgicas foram removidas e encaminhadas para histologia e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise histológica mostrou inicialmente um infiltrado inflamatório leve a moderado que diminuiu com a progressão do tempo. Foi observada a presença de cápsula de tecido conjuntivo ao redor do implante em todos os grupos avaliados. Em relação à reabsorção dos biomateriais, pouco foi observado nesta pesquisa. E, apesar das características morfológicas (porosidade e rugosidade) demonstrada pela MEV, as hastes implantadas não favoreceram o processo de osteocondução no canal medular que foi observado somente no Grupo C15. Concluiu-se neste estudo que a associação do polímero de mamona, do vidro bioativo e da hidroxiapatita foram biocompatíveis e osteointegráveis nas condições propostas. A osteocondução somente ocorreu na presença de hidroxiapatita e vidro bioativo (Grupo C15) e a biodegradação pouco foi observado mesmo após 60 dias de avaliação.

Palavras chaves: Poliuretana de mamona, vidros bioativos, hidroxiapatita, implantes intramedulares, biomateriais.

ABSTRACT

Teixeira, VSS. Study the behavior of castor oil polymer rods associated with bioactive glass and hydroxyapatite in the medullary canal of the femur of rats. Campo Grande, 2012. [Dissertation - Federal University of Mato Grosso do Sul].

Nowadays the association of biomaterials has been performed in order to minimize their individual deficiencies. The objective of this study was to evaluate the behavior of castor oil polymer rods doped with bioactive glass and hydroxyapatite in the medullary canal of the femur of rats, for possible application as a method for fixation of fractures and bones repairs. It was selected 28 adult male rats of the Wistar Albinus lineage, divided into three experimental groups: Group A - implant consisting of castor oil polymer doped with bioactive glass; Group B - formed only by castor oil polymer; Group C - implant consisting of castor oil polymer doped with bioactive glass and hydroxyapatite. After 15 and 60 days of evaluation, the specimens were removed and sent for histology and scanning electron microscopy (SEM). Histological analysis showed initially a mild to moderate inflammatory infiltrate that decreased with the progression of time. It was observed the presence of connective tissue capsule around the implant in all groups evaluated. Regarding resorption of biomaterials, little has been observed in this study. And, despite the morphological characteristics (porosity and roughness) demonstrated by SEM, the rods implanted did not favor the process of osteoconduction in the spinal canal that was observed only in Group C15. It was concluded from this study that the association of the castor oil polymer, the bioactive glass and hydroxyapatite are biocompatible and osseointegrated as proposed. The osteoconduction only occurred in the presence of hydroxyapatite and bioactive glass (Group C15) and little biodegradation was observed even after 60 days of evaluation.

Keywords: castor oil polyurethane; bioactive glass; hydroxyapatite; intramedullary implants; biomaterials.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Intensidade de Infiltrado Inflamatório para os grupos A, B e C no tempo 15 dias. Escala de intensidade variando de 0 a 3 pontos expressa em média e desvio padrão e também em proporção. 38

Tabela 2 - Intensidade de Infiltrado Inflamatório para os grupos A, B e C no tempo 60 dias. Escala de intensidade variando de 0 a 3 pontos expressa em média e desvio padrão e também em proporção. 39

Tabela 3 - Infiltrado Inflamatório entre os tempos 15 e 60 dias para os Grupos A, B e C. Escala de intensidade variando de 0 a 3 pontos expressa em média e desvio padrão..... 39

Tabela 4 - Distribuição de frequência segundo a ausência ou presença de trabécula óssea neoformada para os grupos A, B e C nos tempos 15 e 60 dias. Análise histológica..... 42

Tabela 5 - Intensidade de Degradação do Material para os grupos A, B e C no tempo 15 dias. Escala de intensidade variando de 0 a 3 pontos expressa em média e desvio padrão e também em proporção. 46

Tabela 6 - Intensidade de Degradação do Material para os grupos A, B e C no tempo 60 dias. Escala de intensidade variando de 0 a 3 pontos expressa em média e desvio padrão e também em proporção. 46

Tabela 7 - Degradação do Material entre os tempos 15 e 60 dias para os Grupos A, B e C. Escala de intensidade variando de 0 a 3 pontos expressa em média e desvio padrão. 47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Divisão e subdivisão dos grupos experimentais.	30
Figura 2 - Balança eletrônica de precisão Scientech.	31
Figura 3 - Hastes de polímero de mamona	32
Figura 4 - Evaporadora (Sputter) Denton Vacuum - Desk IIIR.	35
Figura 5 - Equipamento utilizado para deposição metálica sobre as amostras.	35
Figura 6 - Vista geral do microscópio eletrônico de varredura (MEV).	35
Figura 7 - Coluna ótico-eletrônica, detector e câmara de amostras.	35
Figura 8 - Montagem das fotomicrografias das lesões histológicas do tecido ósseo revelando: infiltrado inflamatório (I), cápsula de tecido conjuntivo (C) material amorfo (MA) e trabéculas ósseas neoformadas (TON). A refere-se ao grupo A15, B ao grupo A60, C ao grupo B15, D ao grupo B60, E ao grupo C15 e F ao grupo C60.	37
Figura 9 - Montagem de fotomicrografia realizada através da MEV obtida das hastes de polímero de mamona não implantado. A e B– Polímero de mamona dopado com vidro bioativo. C e D – Polímero de mamona sem dopante. E e F – Polímero de mamona dopado com vidro bioativo e hidroxiapatita.	44

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CaO	Óxido de cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
EDTA	Etileno Diamino Tetra Acetato
FDA	Federal Drug Administration
HA	Hidroxiapatita
HATiO ₂	Hidroxiapatita titânia
HE	Hematoxilina e Eosina
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Na ₂ O	Óxido de sódio
NCO	Isocianato
OH	Hidroxila
P ₂ O ₅	Pentóxido de fósforo
PU	Polímero de Mamona
SiO ₂	Dióxido de Silício
UFMS	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
VB	Vidro Bioativo
µm	Micrometro (s)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	Hastes intramedulares	15
2.2	Biomateriais	15
2.2.1	Polímero de mamona.....	19
2.2.2	Vidro Bioativo.....	23
2.2.3	Hidroxiapatita	25
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos Específicos.....	28
4	METODOLOGIA	29
4.1	Animais de experimentação.....	29
4.2	Grupos experimentais	29
4.3	Preparo dos implantes	30
4.4	Procedimento Cirúrgico.....	32
4.5	Eutanásia	33
4.6	Procedimento histológico	33
4.7	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	34
5.1	Análise microscópica do implante por grupo.....	36
5.2	Análise do comportamento do implante	37
5.2.1	Estudo da biocompatibilidade e da osteointegração.....	38
5.2.2	Estudo da osteocondução	42
5.2.3	Estudo da biodegradabilidade	45
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	ANEXO A – Protocolo do CEUA	62
	ANEXO B – Tabela dos Resultados.....	63

1 INTRODUÇÃO

O osso é um material dinâmico exposto a ambientes mecânicos que desafiam sua integridade estrutural. Em condições adequadas, o osso fraturado pode ser reconstituído, quase que identicamente, à sua forma original, pois diferente de outros tecidos que se reparam pela formação de tecido fibroso, ele tem um alto poder de regeneração (BETTI 2004; LEITE, 2005). Porém, falhas ósseas de grandes dimensões provocadas especialmente por processos infecciosos, fraturas, ressecções neoplásicas ou decorrentes de malformações congênitas, são problemas de difícil solução para a Medicina e Odontologia (BOLSON, 2005; CALIXTO; TEÓFILO; BRENTGANI *et al.*, 2001).

Com o decorrer do tempo, foram surgindo estudos sobre métodos auxiliares que pudessem ser usados para realçar a resposta inerente ao organismo vivo no que diz respeito ao processo da neoformação óssea. Desta forma, placas, fios e parafusos para osteossíntese e materiais para preenchimento dos defeitos ósseos passaram a ser empregados para restabelecer a continuidade entre as extremidades ósseas, garantindo a união e a fixação das mesmas e fornecendo estímulo à osteogênese (LEONEL; MANGILLI; RAMALHO *et al.*, 2003).

Dos métodos utilizados no tratamento das afecções ortopédicas, os enxertos tem se destacado como um dos mais importantes, sendo amplamente empregados quando se necessita promover a reparação em áreas com grande perda óssea evitando que esses locais sejam rapidamente preenchidos por tecido conjuntivo circunjacente impossibilitando a reparação dessas áreas. (BETTI, 2004; BOLSON, 2005)

Inicialmente os enxertos ósseos eram autógenos ou autólogos (material orgânico obtido do mesmo indivíduo), e com o decorrer do tempo surgiram os alógenos ou homógenos (material orgânico obtido de indivíduos da mesma espécie), xenógenos ou heterógenos (material orgânico proveniente de espécies diferentes) e, por fim, os materiais aloplásticos (materiais sintéticos ou orgânicos modificados em laboratórios) que eram obtidos com mais facilidade e na quantidade desejada (CONZ; CAMPOS; SERRÃO *et al.*, 2010; GARCIA,

2007). Porém o enxerto ósseo autógeno tem sido considerado “padrão ouro” por possuir propriedade osteogênica, osteocondutora, osteoindutora e pela falta de resposta imunológica adversa (STEIN; SILVA J.B.; SILVA V.D., 2009; TEIXEIRA, 2009; YOSHIKAWA; MYOUI, 2005). Porém, apresentam algumas desvantagens como trauma para o paciente, morbidade no leito doador, além de complicações como infecções, hematomas e parestesias (CONZ; CAMPOS; SERRÃO *et al.*, 2010; GARCIA, 2007).

Na tentativa de evitar essas desvantagens inerentes aos enxertos ósseos autógenos, os implantes de biomateriais, têm despertado grande interesse dos pesquisadores, procurando criar ou extrair da natureza materiais que promovam o incremento da reparação e neoformação óssea, sendo biocompatíveis, osteoindutores e osteocondutores (LAUREANO FILHO; BRANCO; ANDRADE *et al.*, 2007). Algumas vantagens para a utilização dos biomateriais em relação ao enxerto autógeno incluem o baixo custo em relação aos bancos de ossos, redução dos riscos de contaminação e da transmissão de doenças, facilidade de armazenagem, aquisição e manipulação permitindo que se possa “fabricar” e “moldar” peças de qualquer dimensão, dispensando a procura por enxerto de tamanho compatível (BOLSON, 2005; CALIXTO; TEÓFILO; BRENTGANI *et al.*, 2001).

Quando é necessária a estabilização de fraturas ósseas, a fixação metálica tem sido um procedimento largamente aplicado e com resultados satisfatórios, porém o osso cortical e o metal possuem propriedades mecânicas bem diferentes. A elasticidade e a força de tensão no osso diferem do implante metálico, levando a uma relativa osteoporose causada pela ausência funcional normal. Ocorrem também reações alérgicas contra os diferentes componentes metálicos ou o desenvolvimento de malignomas no local do implante. Além disso, a remoção do implante metálico pode resultar no enfraquecimento do osso com risco de nova fratura (PAULO; OLIVEIRA; NETTO *et al.*, 2008).

Nos casos de fraturas diafisárias do fêmur, a haste intramedular tem sido uma técnica comumente utilizada promovendo ótimos resultados no que se refere à formação do calo-ósseo e por consequência a consolidação da fratura. Esse tipo de fixação é altamente eficiente e se baseia no princípio de um tubo inteiro dentro de outro quebrado (TAVARES, 2009). Tradicionalmente, essas hastes têm sido confeccionadas com aço inoxidável ou titânio, sendo muitos os

registros de complicações relacionadas ao seu emprego, tais como: não união ou união retardada, quebra da haste ou dos parafusos, erros de bloqueio dos parafusos, infecções, neuropraxias, formações de pseudoartroses e contraturas musculares (SPADETO JUNIOR; RODRIGUES; CARVALHO *et al.*, 2011).

Assim, a necessidade de substitutos ósseos com propriedades semelhantes ao osso, atendendo tanto aos aspectos biológicos quanto às necessidades mecânicas, desencadeou o desenvolvimento comercial e experimental de uma variedade de materiais para reparo, substituição ou aumento do tecido ósseo (PEREIRA, 2006). O principal desafio existente no estudo dos biomateriais é o de encontrar um material que seja o mais parecido possível com o tecido vivo de modo que o organismo possa reconhecê-lo como parte de sua estrutura e não como um agente agressor ao seu meio (LEONEL; MANGILLI; RAMALHO *et al.*, 2003).

Atualmente busca-se um biomaterial reabsorvível, que apresente resistência mecânica às demandas de estabilização óssea e, ao mesmo tempo, seja osteocondutor, com propriedades osteogênicas (FERREIRA; STEFFEN; CARDOSO *et al.*, 2008; SARAN, 2006) e, que estimulem a integração do implante com os tecidos adjacentes, provocando a mobilização e ativação celular, bem como a subsequente produção da matriz intimamente associada com o material implantado. (CANDELORIO, 2011).

Entre estes materiais, a poliuretana derivada do óleo da mamona tem se destacado devido seu desenvolvimento totalmente no âmbito nacional, por ser de origem vegetal e, por estas razões ser de baixo custo. Apresenta comprovação científica de biocompatibilidade e potencial de osteocondução (LEONEL; PORCIÚNCULA; ANDRADE SOBRINHO *et al.*, 2004). Além disso, possui poros com interconexões e estrutura química semelhante à do tecido ósseo, fatores estes, importantes para permitir a osteocondução e posterior osteointegração (IGNÁCIO; MAZZER; BARBIERI *et al.*, 2002).

O polímero de mamona associado ao vidro bioativo e a hidroxiapatita pode apresentar, além de sua propriedade osteocondutora, a osteoindução, permitindo uma neoformação óssea mais rápida. Já a associação do carbonato de cálcio neste estudo e assim como Saran (2006) tem como objetivo melhorar o padrão de resistência e elasticidade em relação ao tecido ósseo, aumentar o volume da mistura, permitir a formação de poros e acelerar o processo de

osteointegração.

A associação destes biomateriais tem sido realizada recentemente com o intuito de minimizar as deficiências individuais dos mesmos. Tem se utilizado materiais osteocondutores associados aos osteoindutores na busca de melhores resultados na regeneração tecidual (PRETEL, 2005). A união de polímeros com matrizes cerâmicas permite a produção de novos materiais com propriedades superiores, podendo combinar a bioatividade dos materiais cerâmicos com a flexibilidade dos compostos e polímeros orgânicos (OLIVEIRA A.A.R.; OLIVEIRA J.E.; ORÉFICE *et al.*, 2007).

Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a associação de biomateriais analisando o comportamento de hastes de polímero de mamona dopado com vidro bioativo e hidroxiapatita no canal medular do fêmur de ratos para uma possível aplicação como método para fixação de fraturas e reparação óssea.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Hastes intramedulares

Hastes intramedulares têm sido amplamente utilizadas na imobilização de fraturas de ossos longos. É uma técnica comumente utilizada nos casos de fraturas diafisárias do fêmur promovendo ótimos resultados no que se refere à formação do calo-ósseo e por consequência a consolidação da fratura. (SPADETO JUNIOR; RODRIGUES; CARVALHO *et al.*, 2011; TAVARES, 2009)

Esse tipo de fixação é altamente eficiente e se baseia no princípio de um tubo inteiro dentro de outro quebrado. Essa técnica possui a vantagem de, ao mesmo tempo, atuar ao longo do eixo mecânico central do osso e impedir movimentos de rotação que impedem a adequada cicatrização, além de preservar os conceitos de padrões biológicos de osteossíntese. Apresentam diversas vantagens na fixação das extremidades que sustentam o peso, pois é um dispositivo que compartilha a carga e, a sustentação do peso pode ser reassumida muito mais cedo do que com outros meios de fixação. (SPADETO JUNIOR; RODRIGUES; CARVALHO *et al.*, 2011; TAVARES, 2009).

Tradicionalmente, essas hastes têm sido confeccionadas com aço inoxidável ou titânio, sendo muitos os registros de complicações relacionadas ao seu emprego, tais como: não união ou união retardada, quebra da haste ou dos parafusos, erros de bloqueio dos parafusos, infecções, neuropraxias, formações de pseudoartroses e contraturas musculares (SPADETO JUNIOR; RODRIGUES; CARVALHO *et al.*, 2011).

Assim, a utilização de materiais poliméricos tem sido utilizada na medicina na busca de soluções mais biológicas, substituindo os artefatos como fios, hastes e placas metálicas por polímeros bioreabsorvíveis no tratamento de fraturas. (FERREIRA; STEFFEN; CARDOSO *et al.*, 2008).

2.2 Biomateriais

O aprimoramento técnico-científico na área médica faz-se necessário devido à busca incansável do ser humano pela longevidade e por padrões de

vida superiores, o que gera a necessidade de alternativas para reparo e substituição de tecidos vivos vitimados por traumas, patologias e fraturas, dentre outros. Ocorrências dessa natureza são resolvidas através de técnicas de enxertiação óssea ou mais recentemente com a utilização de implantes derivados de biomateriais aloplásticos (ANDRADE, DOMINGUES, 2006; BOLSON, 2005; CALIXTO; TEÓFILO; BRENTGANI *et al.*, 2001).

Biomateriais são materiais artificiais desenvolvidos para o uso em áreas da saúde com a finalidade de substituir a matéria viva cuja função foi perdida, neste caso, o tecido ósseo (PRETEL, 2005). Pode ser definido como todo material natural ou não, farmacologicamente inerte utilizado em aplicações biomédicas que impliquem a interação com sistemas biológicos e, que não induza reações adversas no sítio de implantação ou mesmo sistematicamente (BUGARIN JUNIOR; GARRAFA, 2007).

Vários fatores têm incentivado o desenvolvimento de novos biomateriais entre eles o fraco desempenho de materiais utilizados que são projetados para executarem suas funções por um período máximo de 10 anos; redução do número de cirurgias de revisão destinadas a substituir implantes danificados e; falta de doadores para transplante (SILVA JUNIOR; ORÉFICE, 2001). Outras vantagens para a utilização de biomateriais aloplásticos em relação ao enxerto incluem baixo custo em relação aos bancos de ossos, redução dos riscos de contaminação e da transmissão de doenças, facilidade de armazenagem, aquisição e manipulação permitindo que se possa “fabricar” e “moldar” peças de qualquer dimensão, dispensando a procura por enxerto de tamanho compatível (BOLSON, 2005; CALIXTO; TEÓFILO; BRENTGANI *et al.*, 2001).

Os materiais chamados substitutos ósseos constituem biomateriais que tem o objetivo de, ao ser utilizado, diminuir a morbidade que a obtenção do osso autógeno proporciona ao paciente (MENDES; FONSECA; BASSI *et al.*, 2006). O princípio de neoformação óssea utilizando-se da bioengenharia tecidual está baseado na utilização de arcabouços (osteocondutores), moléculas sinalizadoras (osteoindutores) e células troncos (osteogênicas) (PRETEL, 2005).

Os materiais aloplásticos ou biomateriais mais comumente utilizados nas cirurgias médicas e odontológicas são os metálicos, poliméricos, cerâmicos e os compósitos. No grupo de materiais metálicos encontram-se o titânio e a

platina, entre os poliméricos estão os polímeros de mamona, polietileno e o silicone, entre os materiais cerâmicos incluem a hidroxiapatita, o carbonato de cálcio e entre os compósitos há as cerâmicas de vidro, e, mais recentemente, o vidro bioativo. (CAMARINI; IAMASHITA; FARAH *et al.*, 2006; CORSETTI, 2005; LEONEL; MANGILLI; RAMALHO *et al.*, 2003). Os materiais cerâmicos e poliméricos podem substituir o tecido vivo sem função, além de estimular o crescimento de um novo tecido (PRETEL, 2005).

O principal desafio existente no estudo dos biomateriais é o de encontrar um material que seja o mais parecido possível com o tecido vivo, de modo que o organismo possa reconhecê-lo como parte de sua estrutura e não como um agente agressor ao seu meio (LEONEL; MANGILLI; RAMALHO *et al.*, 2003). Baseado nessas informações intensificou-se as pesquisas visando o desenvolvimento de materiais aloplásticos ideais como substituto ósseo. Estes deverão ser biocompatíveis, não antigênicos, não carcinogênicos, apresentar baixo custo, ser gradualmente substituído por tecido da área receptora, ter propriedades osteocondutoras e/ou osteoindutoras. (BOLSON, 2005; CALIXTO; TEÓFILO; BRENTGANI *et al.*, 2001; CAMARINI; IAMASHITA; FARAH *et al.*, 2006; LEITE; RAMALHO, 2008).

Qualquer material estranho colocado deliberada ou acidentalmente no interior de tecidos vivos provoca uma resposta que, dependendo da sua extensão, intensidade e duração definem a biofuncionalidade do implante, e, portanto sua biocompatibilidade. Assim, biofuncionalidade refere-se a propriedades mecânicas e físicas que habilitam um implante a desempenhar as funções esperadas, enquanto biocompatibilidade indica que a presença do material não causará efeitos nocivos no local do implante ou no sistema biológico. (BOLSON, 2005; CORSETTI, 2005; NACER, 2009).

Quanto ao mecanismo de ação, os materiais implantares e enxertos ósseos, podem atuar através de três diferentes mecanismos que levam a regeneração do tecido ósseo:

- a) Osteogênese se refere a materiais orgânicos capazes de formar osso diretamente a partir de osteoblastos (CORSETTI, 2005; GARCIA, 2007; LAUREANO FILHO, 2001);
- b) Osteoindução é o processo pelo qual as células mesenquimais, presentes no tecido circunjacente ao local do enxerto, são induzidas à

diferenciação em osteoblastos ou condroblastos, proporcionando a formação óssea (CAVASSANI; MORAES; PADILHA FILHO, 2001; GARCIA, 2007) e;

- c) Osteocondução capacidade de conduzir ou direcionar a neoformação óssea sobre e entre o material de preenchimento favorecido pela penetração dos capilares sanguíneos através dos poros do biomaterial (ALMEIDA, SANTOS, FERNANDES *et al.*, 2010). O processo de osteocondução, para ocorrer, necessita de osso ou células mesenquimais diferenciadas. A reparação em torno de implantes osseointegrados é um processo osteocondutivo. A poliuretana de mamona, a hidroxiapatita natural e as biocerâmicas são conhecidas como materiais osteocondutores. A osteocondução de um material está relacionada à sua porosidade (quantidade de poros, tamanho de poros). Para que um biomaterial seja considerado macroporoso, ele deve apresentar poros da ordem do diâmetro Harvesiano (50 a 250 μm), (CANDELORIO, 2011), assim poros com diâmetros de 100 μm são necessários para a migração e o transporte celular, entretanto poros maiores que 300 μm permitem o desenvolvimento de um sistema de capilares favorecendo a neoformação óssea (TEIXEIRA, 2009).

Outro ponto importante para o uso dos substitutos ósseos é a osteointegração que é definida como uma ancoragem direta de um implante pela formação de tecido ósseo ao redor deste, sem o crescimento de tecido fibroso na interface osso-implante (PEREIRA JUNIOR; RAHAL; IAMAGUTI *et al.*, 2007).

Os biomateriais também podem ser classificados de acordo com seu comportamento biológico em biotoleráveis, bioinertes, bioativos e biodegradáveis.

Biotoleráveis são materiais, que quando implantados, são tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos circunvizinhos pela formação de cápsula de tecido fibroso. (CORSETTI, 2005; NACER, 2009)

Bioinerte também são materiais tolerados pelo organismo onde a formação de cápsula fibrosa é mínima ou praticamente inexistente, permitem a aposição óssea sobre suas superfícies, favorecendo a osteogênese de contato

que é a migração direta das células formadoras de osso através da matriz do coágulo para superfície do implante. (CANDELORIO, 2011; CORSETTI, 2005).

O uso de materiais bioativos e biodegradáveis visa, além de substituir tecidos lesionados, promover a recuperação do tecido danificado através da atuação em metabolismos intra e extracelulares responsáveis pela reprodução celular e propagação dos tecidos em crescimento (CORSETTI, 2005; NACER, 2009). Os materiais biodegradáveis, após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo (SILVA; PINTO; LOURO *et al.*, 2011).

Os materiais bioinertes e bioativos, também chamados de osteocondutores, podem atuar como arcabouços permitindo a atividade osteoblástica durante a formação gradual do novo osso (CANDELORIO, 2011).

As propriedades físico-químicas de cada biomaterial, somadas ao ambiente fisiológico, influenciam diretamente na neoformação óssea e como e quando ocorrerá de forma equilibrada a sua biodegradação. As propriedades físicas dos biomateriais são específicas à área de superfície ou formato (bloco, partícula), à porosidade (denso, macro ou microporoso) e à cristalinidade (cristalino ou amorfo). A porosidade melhora a conexão mecânica entre o biomaterial e o osso. Dimensões adequadas de poros favorecem o entrelaçamento do tecido com o biomaterial promovendo melhor estabilidade mecânica na interface. (TEIXEIRA, 2009).

Assim, tem se estimulado o desenvolvimento comercial e experimental de diversos materiais para reparo, substituição ou aumento do tecido ósseo buscando substitutos com propriedades semelhantes ao osso atendendo tanto os aspectos biológicos quanto às necessidades mecânicas (PEREIRA, 2006). Porém, existe um longo caminho entre o desenvolvimento de um novo biomaterial ou técnica até a utilização em seres humanos.

2.2.1 Polímero de mamona

Nos últimos anos os biopolímeros têm apresentado uma grande evolução científica. Dentre estes, a poliuretana derivada do óleo da mamona ou polímero de mamona (PU) tem se destacado devido seu desenvolvimento totalmente no âmbito nacional, por ser de origem vegetal e, por estas razões

ser de baixo custo. Ainda, por apresentar comprovação científica de biocompatibilidade e potencial de osteocondução (ANDRADE; DOMINGUES, 2006; LAUREANO FILHO; BRANCO; ANDRADE *et al.*, 2007; LEONEL; PORCIÚNCULA; ANDRADE SOBRINHO *et al.*, 2004). Assim, suas propriedades na reparação de defeitos decorrentes de perdas ósseas e na produção de próteses têm sido objetivo de estudos com vários resultados satisfatórios (LEONEL; PORCIÚNCULA; ANDRADE SOBRINHO *et al.*, 2004; SILVESTRE FILHO, 2001).

As reações de formação dos uretanos foram propostas por Wurtz em 1849, mas seu uso comercial foi encontrado somente nas décadas de 30 e 40 por Bayer e colaboradores. Desde então a quantidade de materiais desenvolvidos a partir deste tipo de polimerização aumentou consideravelmente, a ponto de abranger diferentes segmentos de aplicação (SILVESTRE FILHO, 2001).

Em 1984, o Prof. Dr. Gilberto Chierice, do Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros da Escola de Engenharia de São Carlos, desenvolveu uma resina poliuretana de origem vegetal extraída do óleo de mamona (*Ricinus communis* – divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, sub-classe Rosidae, ordem Euforbiales e família Euforbiaceae), com módulo e elasticidade similar ao osso humano (BOLSON, 2005; IGNÁCIO; MAZZER; BARBIERI *et al.*, 2002; LAUREANO FILHO; BRANCO; ANDRADE *et al.*, 2007; LEONEL; MANGILLI; RAMALHO *et al.*, 2003; LEONEL; PORCIÚNCULA; ANDRADE SOBRINHO *et al.*, 2004; LIMA; RAHAL; MULLER *et al.*, 2008; MARIA; PADILHA FILHO; CASTRO, 2003). Desde então, inúmeras experiências com a poliuretana tem sido realizadas, mas somente em 1999 o produto foi aprovado pelo Ministério da Saúde do Brasil, com registro nº 10171110079, e no ano de 2003 foi aprovado pela FDA (Federal Drug Administration), agência do governo Norte-americano (PEREIRA JUNIOR; RAHAL; IAMAGUTI *et al.*, 2007).

O polímero de mamona origina-se da reação uretana de seus dois componentes básicos, o polioliol do tipo poliéster e o pré-polímero. O óleo de mamona é formado por três moléculas do ácido ricinoléico, cada uma delas com um grupo hidroxila no carbono 12, propício para a polimerização por meio de ligações uretanais. Os grupos hidroxila (-OH) do ácido ricinoléico reagem com os grupos isocianatos (-NCO) do pré-polímero para formar as poliuretanas

(ALMEIDA; SANTOS; FERNANDES *et al.*, 2010; BOLSON, 2005; NACER, 2009; LEONEL; MANGILLI; RAMALHO *et al.*, 2003) e o carbonato de cálcio, como material de preenchimento não ativo (BOLSON 2005; CALIXTO; TEÓFILO; BRENTGANI *et al.*, 2001). No produto final do polímero de mamona não há sítios ativos livres (OH e/ou NCO), para futura interação no corpo humano, mas somente cadeias uretana que atraem o cálcio orgânico (BIOOSTEO, 2011).

A função do carbonato de cálcio é fornecer íons para facilitar a troca iônica na interface osso-resina, aumentar a deposição de cálcio na matriz colagenosa, e aumentar o nível de dissolução do material, mantendo a superfície em constante troca iônica e, assim melhorando sua capacidade de integração com o tecido ósseo. (BOLSON 2005; CALIXTO; TEÓFILO; BRENTGANI *et al.*, 2001; FRAZÍLIO; ROSSI; NEGRINI NETO *et al.*, 2006). O carbonato de cálcio também tem a finalidade de aumentar o volume da mistura, permitir a formação de poros (SARAN, 2006) e acelerar a osteointegração sem interferir na reação principal de polimerização (BIOOSTEO, 2011).

O polímero de mamona é um produto versátil que pode ser preparado previamente com diferentes consistências e formas ou utilizado no momento da intervenção cirúrgica. Tem como vantagens a processabilidade e flexibilidade de formulação, excelentes propriedades estruturais e um bom poder de adesão, ausência de emissão de irritantes ou vapores tóxicos, além da biocompatibilidade (IGNÁCIO; MAZZER; BARBIERI *et al.*, 2002; LAUREANO FILHO; BRANCO; ANDRADE *et al.*, 2007; LEONEL; MANGILLI; RAMALHO *et al.*, 2003; LEONEL; PORCIÚNCULA; ANDRADE SOBRINHO *et al.*, 2004; LIMA; RAHAL; MULLER *et al.*, 2008; SILVESTRE FILHO, 2001). Implantes da resina poliuretana de mamona, de diferentes tamanhos e formas, têm mostrado ser biocompatíveis em condições experimentais diversas em coelhos (LAUREANO FILHO; BRANCO; ANDRADE *et al.*, 2007), em cães (FRAZILIO; ROSSI; NEGRINI NETO *et al.*, 2006), em codornas (BOLSON, 2005) e em ratos (CALIXTO; TEÓFILO; BRENTGANI *et al.*, 2001; LEONEL; PORCIÚNCULA; ANDRADE SOBRINHO *et al.*, 2004).

Outra característica favorável apresentada pelo polímero de mamona é a sua arquitetura interna porosa. Essa arquitetura facilita a realização de recortes e correções da forma do material se necessário, além de promover o processo

de osteocondução que é favorecido pela penetração de capilares em seus poros (IGNÁCIO; MAZZER; BARBIERI *et al.*, 2002). Assim, a presença de poros nos implantes, seu diâmetro, conformação e a presença de intercomunicação, são características importantes que regulam a migração vascular e celular para o interior destes implantes, permitindo ou não a neoformação óssea (NACER, 2012).

Leonel; Mangilli; Ramalho *et al.* (2003) concluiu que a presença de porosidade na arquitetura interna de um biomaterial é condição fundamental para a estabilização e neoformação tecidual junto ao mesmo. Verificou que o polímero de mamona possui, além de outras propriedades, a presença de poros irregulares, permitindo assim sua incorporação aos tecidos vivos e favorecendo a regeneração dos defeitos ósseos.

Vários trabalhos experimentais foram desenvolvidos para verificar as propriedades do polímero de mamona implantado intra e extra-ósseo, com ênfase especial a sua biocompatibilidade, poder de osteocondução e osteointegração (IGNÁCIO; MAZZER; BARBIERI *et al.*, 2002; DIAS; GRANATO; RAMALHO *et al.*, 2009).

Leonel; Porciúncula; Andrade Sobrinho *et al.* (2004) observaram a ação do polímero de mamona na neoformação óssea através do preenchimento de um defeito ósseo realizado no arco zigomático de 45 ratos no período de 15, 30, 60, 90 e 120 dias. Este biomaterial mostrou-se como um material de preenchimento adequado, uma vez que foi substituído por osso neoformado na medida em que foi sendo reabsorvido. Essa substituição e conseqüente neoformação óssea foi mais evidente no período de análise de 120 dias, porém esta capacidade de osteocondução foi também observada, precocemente, nas peças cirúrgicas removidas dos animais sacrificados após períodos de 15 dias, onde verificou-se que os poros do polímero encontravam-se preenchido por tecido conjuntivo rico em células e capilares sanguíneos neoformados fundamental para a posterior deposição de tecido ósseo maduro.

Laureano Filho; Branco; Andrade *et al.* (2007) compararam a ação do osso desmineralizado de origem humana e o polímero de mamona na reparação óssea em cavidades realizadas na calvária de 24 coelhos durante 4, 7 e 15 semanas. No intervalo de 4 semanas, período inicial de avaliação, foi possível identificar a presença de partículas do material rodeadas por tecido

conjuntivo fibroso no interior da cavidade óssea cirúrgica nos 2 grupos, significando pouco tempo hábil para a reparação óssea completa. Em 7 semanas, observou-se neoformação óssea a partir das margens do defeito ósseo, porém ainda com grande quantidade de tecido conjuntivo no grupo osso desmineralizado enquanto que no grupo polímero de mamona houve o fechamento quase que total do defeito por tecido ósseo em torno do material implantado. Após 15 semanas, uma formação óssea quase que completa foi observada em todos os grupos, porém no grupo polímero manteve uma maior espessura de reparação. Assim, melhores resultados foram observados no grupo polímero de mamona e, a neoformação óssea notada ocorreu por osteocondução.

Nacer (2009) avaliou o comportamento biológico do polímero de mamona como substituto ósseo em defeito ósseo diáfisário associado ou não a presença de nanopartículas de Sílica e Zircônia em diferentes tempos de evolução. A avaliação histológica mostrou que houve crescimento ósseo em todos os grupos estudados, com maior tendência de crescimento no grupo contendo polímero de mamona acrescido apenas com carbonato de cálcio.

2.2.2 Vidro Bioativo

Os vidros bioativos (VB) foram desenvolvidos pelo Prof. Larry L. Hench e são compostos de 45% de dióxido de silício (SiO_2), também conhecido como sílica, 24,5% óxido de cálcio (CaO), 24,5% de óxido de sódio (Na_2O) e 6% de pentóxido de fósforo (P_2O_5). Esses materiais foram desenvolvidos para utilização como implantes e como recobrimento. (BASSI; CARVALHO, 2011; MACEDO; MATUDA; MACEDO *et al.*, 2004; ROBERTO; PEREIRA; CAMPOS, 2003; SILVEIRA; MACHADO; SILVEIRA *et al.*, 2008 ; VILLAÇA; NOVAES; SOUZA *et al.*, 2005) e podem ser usados para a reparação e regeneração óssea de defeitos decorrentes de tumor, trauma e osteoporose (BRUNNER; GRASS; STARK, 2006).

Por ser biocompatível, a principal característica do vidro bioativo é uma reação controlada e bem conhecida no ambiente fisiológico, levando a formação de uma interface permanente entre o tecido e o material implantado (OLIVEIRA A.A.R.; OLIVEIRA J.E.; ORÉFICE *et al.*, 2007; ROBERTO,

PEREIRA, CAMPOS, 2003; SILVEIRA, RL; MACHADO; SILVEIRA, CRS *et al.*, 2008).

Pesquisas *in vitro* e *in vivo* identificaram propriedades específicas do vidro bioativo na interação com os meios biológicos que atestam seu grande potencial como agente ativador do crescimento ósseo. Demonstraram a não toxicidade do vidro bioativo, sua influência positiva sobre culturas de osteoblastos, capacidade inibitória sobre a proliferação de fibroblastos. Já alguns estudos histológicos em animais mostraram que o vidro implantado em sítios não-periodontais é biocompatível e incorpora no tecido ósseo, produzindo assim um pH alcalino no local do implante (FOPPIANO; MARSHALL, SJ; MARSHALL, GW *et al.*, 2004; LELES, 2006; SILVA JUNIOR; ORÉFICE, 2001; VILLAÇA; NOVAES; SOUZA *et al.*, 2005).

Macedo; Matuda; Macedo *et al.* (2004) analisaram histologicamente a cicatrização de defeitos criados cirurgicamente na tíbia de ratos adultos machos após a implantação de vidro bioativo e concluiu que esse material promoveu a formação óssea ao longo de toda a extensão do defeito, confirmando assim sua propriedade osteocondutora.

Leles (2006) avaliou histologicamente o processo de reparo alveolar após implante de vidro bioativo (Biogran) em macacos. Esse implante intra-alveolar favoreceu a neoformação óssea, atuando como agente osteocondutor e osteoestimulador.

As baixas propriedades mecânicas dos vidros bioativos podem ser melhoradas através da produção de híbridos orgânicos-inorgânico combinando-os aos metais, polímeros ou fibras. A união de polímeros com matrizes cerâmicas permite a produção de novos materiais com propriedades superiores, podendo combinar a bioatividade dos materiais cerâmicos com a flexibilidade dos polímeros orgânicos (OLIVEIRA A.A.R.; OLIVEIRA J.E.; ORÉFICE *et al.*, 2007; PAULO; OLIVEIRA; NETTO *et al.*, 2008).

Biancon Filho, Tochetto Primo, Gassen *et al.* (2011) avaliaram a neoformação óssea por meio da análise de densidade óptica em cavidades em ratos preenchidas com cimento de fosfato de cálcio e vidro bioativo durante 07, 15 e 30 dias. Observou-se maior densidade óptica dos biomateriais em relação ao grupo controle, ou seja, houve maior neoformação óssea nos grupos experimentais em todos os períodos analisados.

2.2.3 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ é um sal de fosfato de cálcio com uma organização cristalina bastante complexa. Principal componente mineral do osso representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes (CONZ; CAMPOS; SERRÃO *et al.*, 2010; DUARTE; BORGES; LAVOR *et al.*, 2006; PRETEL, 2005; RIVERA; RIAÑO; ECHAVARRÍA *et al.* 2004, TEIXEIRA, 2009) tem sido estudada desde a década de 60 e cada vez mais utilizada para facilitar a reparação óssea, atuando como um substrato permitindo rápida osteogênese, osteoindução e osteocondução (COELHO, 2005; DUARTE; BORGES; LAVOR *et al.*, 2006; GARCIA, 2007). Apresenta como características textura microgranular, lenta velocidade de reabsorção pelo organismo (PRETEL, 2005) e excelente biocompatibilidade, o que a torna substituta do osso humano em implantes e próteses (DÓREA NETO; PADILHA FILHO; ORIÁ *et al.*, 2004).

As propriedades de biocompatibilidade, bioatividade e osteocondução da hidroxiapatita, permitem que possam ser implantadas em sítios ósseos, sem indução de resposta imunológica (DÓREA NETO; PADILHA FILHO; ORIÁ *et al.*, 2004). Estudos de biocompatibilidade com implantes de hidroxiapatita apresentaram mínima ou nenhuma resposta inflamatória, sem resposta tipo corpo estranho e reação de células gigantes. Não há evidências de toxicidade local ou sistêmica e, isso se deve, em parte, ao fato que os únicos metabólitos da hidroxiapatita são íons cálcio e íons fosfato (CANETTIERI, 2006).

A efetividade e a segurança da hidroxiapatita têm sido confirmadas na literatura em experimentos com animais em diversas áreas clínicas. Há relatos de sua aplicação isoladamente (DUARTE; BORGES; LAVOR *et al.*, 2006) ou associada a diversos materiais (GARCIA, 2007)

Duarte; Borges; Lavor *et al.* (2006) avaliaram a hidroxiapatita sintética como substituto ósseo através de defeitos criados na superfície vestibular do processo alveolar de 28 cães. Em um grupo, o defeito foi totalmente preenchido com hidroxiapatita sintética, o outro, sem tratamento, foi usado como controle. Aos 8, 15, 21, 42, 60, 90 e 120 dias foram coletados fragmentos ósseos para análise histológica sob microscopia óptica. Observaram crescimento ósseo e vascular no interior dos poros de hidroxiapatita, intensa

proliferação de osteoblastos e neovascularização na presença do implante. A biocompatibilidade permitiu sua integração com o processo alveolar por meio de formação direta de um osso lamelar. Ocorreu neoformação óssea à medida que a hidroxiapatita foi degradada.

Giordano; Albuquerque; Rezende *et al.* (2006) estudaram histomorfologicamente o comportamento do aloenxerto fresco e da hidroxiapatita de alta porosidade para o preenchimento de defeito ósseo femoral em ratos. Após 4 semanas observaram grande quantidade de tecido neoformado ao longo de todo o defeito. Foi possível observar inúmeros osteoblastos de superfície e aumentados de tamanho. Com 8 semanas macroscópica e microscopicamente todos os animais tiveram seus defeitos ósseos consolidados. No grupo controle, com 8 semanas, o aspecto foi de pseudoartrose, com enorme quantidade de calo cartilaginoso preenchendo a falha criada experimentalmente. Assim, afirmam que o uso da hidroxiapatita de alta porosidade é uma boa opção para a cobertura de defeitos ósseos experimentalmente produzidos em animais.

Garcia (2007) comparou os fenômenos evolutivos do processo de reparo em alvéolos de ratos preenchidos após extração dental, com biomateriais como o osso medular bovino inorgânico e a hidroxiapatita densa, sintética. Foram utilizados 48 ratos divididos em 3 grupos: grupo I – controle (coágulo de sangue), grupo II – implante de osso bovino inorgânico e grupo III – implante de hidroxiapatita. Os animais foram avaliados 7, 15 e 30 dias pós-cirurgia por meio de análises microscópica descritiva e quantitativa. Os resultados demonstraram que os dois biomateriais utilizados desempenharam, igualmente, as funções osteopreenchedoras e osteocondutoras.

Por ser um material frágil, com baixos valores de tenacidade à fratura, a hidroxiapatita tem sido utilizada como um recobrimento, impossibilitando sua utilização em regiões que apresentam elevada solicitação mecânica. Acredita-se que a resistência deste material possa ser incrementada através de sua associação com materiais osteoindutores (RIVERA; RIAÑO; ECHAVARRÍA *et al.*, 2004).

Galdino (2011) avaliou o compósito poroso de hidroxiapatita – titânia (HATiO₂), em três composições diferentes (50% HA – 50% TiO₂, 60% HA – 40% TiO₂, 70% HA – 30% TiO₂) para obtenção de *scaffolds* utilizados na

engenharia tecidual óssea. Os resultados obtidos mostraram-se bastante satisfatórios, onde foi mostrado que os corpos cerâmicos porosos obtiveram valores de resistência à compressão e dureza coerentes com os da literatura e superiores aos da hidroxiapatita pura. Os resultados indicaram que o compósito é biocompatível e, de forma geral, pode-se concluir que todas as amostras são indicadas para a utilização como matéria prima para aplicação em engenharia tecidual óssea, sendo que, a amostra com 50% HA – 50% TiO₂ apresentou melhores características para a realização dos ensaios *in vitro*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o comportamento de hastes de polímero de mamona dopado com vidro bioativo e hidroxiapatita utilizando como modelo experimental o canal medular do fêmur de ratos por meio de análise histológica.

3.2 Objetivos Específicos

1. Analisar histologicamente a biocompatibilidade e a osteointegração de hastes de polímero de mamona dopado ou não com vidro bioativo e hidroxiapatita no canal medular do fêmur de ratos;
2. Observar histologicamente as características osteocondutoras de hastes de polímero de mamona dopado ou não com vidro bioativo e hidroxiapatita no canal medular do fêmur de ratos;
3. Verificar através de análise histológica a biodegradação de hastes de polímero de mamona dopado ou não com vidro bioativo e hidroxiapatita após implante no canal medular do fêmur de ratos;

4 METODOLOGIA

4.1 Animais de experimentação

Foram utilizados 28 ratos adultos machos (*Rattus Norvegicus*, da linhagem Wistar *albina*), com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

Os animais foram confinados em gaiolas de 0,15m², com temperatura e umidade mantidas por ar condicionado, ruídos mínimos, luminosidade controlada, com alimentação e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS conforme protocolo nº 270/2010 (ANEXO A).

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais, conforme o procedimento a ser realizado:

Grupo A: constituído por 10 animais que foram submetidos a um defeito ósseo na diáfise femoral para acesso ao canal medular e receberam o implante formado por polímero de mamona com concentração de 12% de carbonato de cálcio e dopado com 12% de vidro bioativo;

Grupo B: constituído por 08 animais que foram submetidos a um defeito ósseo na diáfise femoral para acesso ao canal medular e receberam o implante de polímero de mamona, constituído por polímero de mamona com concentração de 54% de carbonato de cálcio.

Grupo C: constituído por 10 animais que foram submetidos a defeito ósseo na diáfise femoral para acesso ao canal medular e receberam o implante constituído de polímero de mamona com concentração de 8% de carbonato de cálcio e dopado com 8% de vidro bioativo e 8% de hidroxiapatita.

Todos os grupos foram subdivididos de acordo com o período de eutanásia, em 15 e 60 dias. Os subgrupos, denominados: Grupo A: A15 e A60

e Grupo C: C15 e C60 são compostos por 05 animais em cada. Já o subgrupo B: B15 e B60 são compostos por 4 animais cada.

A divisão e subdivisão dos grupos experimentais estão detalhadas na figura 1.

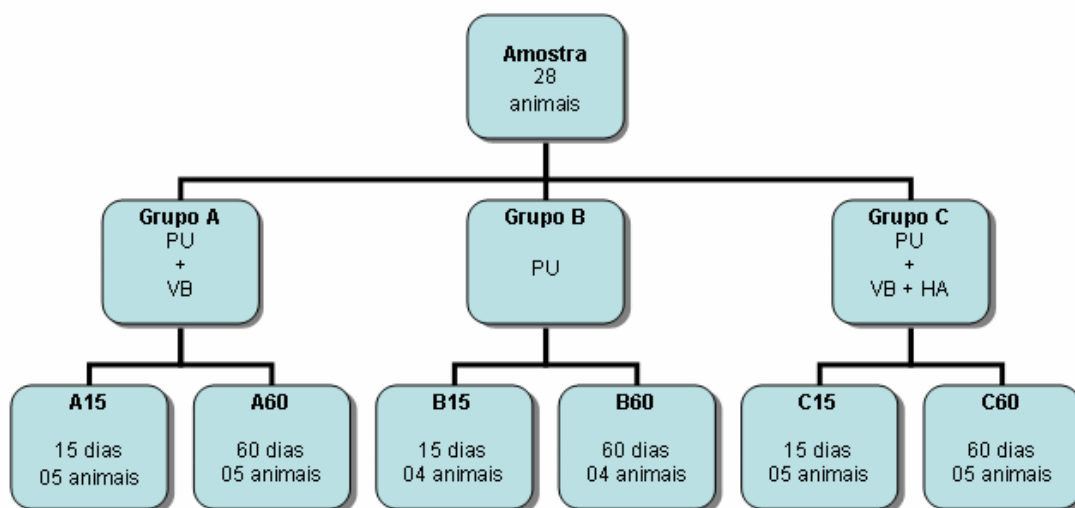


Figura 1 - Divisão e subdivisão dos grupos experimentais.

4.3 Preparo dos implantes

Os biomateriais utilizados nos implantes foram o polímero de mamona da marca BIOOSTEO[®], a hidroxiapatita sintética e o vidro bioativo produzidos na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

O polímero de mamona foi preparado conforme as instruções recomendadas pelo fabricante (BIOMECANICA Ind. e Com. de Prod. Ortopédicos Ltda). Inicialmente, os três componentes necessários para a formação do polímero de mamona foram alocados em recipientes separados para em seguida serem pesados na proporção correta e misturados.

Foi utilizada para a pesagem dos componentes uma balança eletrônica de precisão da Marca Scientech (Figura 2), com capacidade máxima de 210g, acondicionada no laboratório de preparação química da UFMS.



Figura 2 - Balança eletrônica de precisão Scientech.

A confecção do implante foi diferenciada de acordo com cada grupo:

1. Grupo A: Misturou-se 2,0g de pré-polímero (fração líquida 1) a 0,456g de carbonato de cálcio e 0,456g de vidro bioativo (fração pó – equivalente a 24% de pó) e posteriormente 1,8g de poliol (fração líquida 2);
2. Grupo B: Misturou-se 2,0g de pré-polímero (fração líquida 1) a 2,0g de carbonato de cálcio (fração pó - equivalente a 54% de pó) e posteriormente 1,8g de poliol (fração líquida 2), conforme instruções do fabricante;
3. Grupo C: Misturou-se 2,0g de pré-polímero (fração líquida 1) a 0,304g de carbonato de cálcio, 0,304g de vidro bioativo e 0,304g de hidroxiapatita (fração pó – equivalente a 24% de pó) e posteriormente 1,8g de poliol (fração líquida 2).

Após a realização de vários ensaios pilotos, a fração pó utilizada no grupo A e no grupo C foi determinada em 24%. Essa quantidade foi a máxima possível a ser empregada utilizando-se a hidroxiapatita e o vidro bioativo para que o material atingisse o estado manipulável e pudesse ser trabalhado de forma artesanal.

Após a mistura, entre cinco a dez minutos, o produto atingiu o estado manipulável, com alta adesividade. Em seguida, implantes com aproximadamente 0,7mm de diâmetro foram confeccionados por extrusão utilizando-se para isto seringas de 3 ml e agulhas 40X1,2. Estes implantes permaneceram em repouso por aproximadamente 48 horas sobre uma placa de polietileno para a completa polimerização. Após esse período as hastes obtidas foram esterilizadas individualmente por oxido de etileno para serem utilizados no procedimento operatório.

No momento do procedimento cirúrgico as hastes foram cortadas mantendo-se 2 cm de comprimento para introdução no canal medular do fêmur (figura 3).

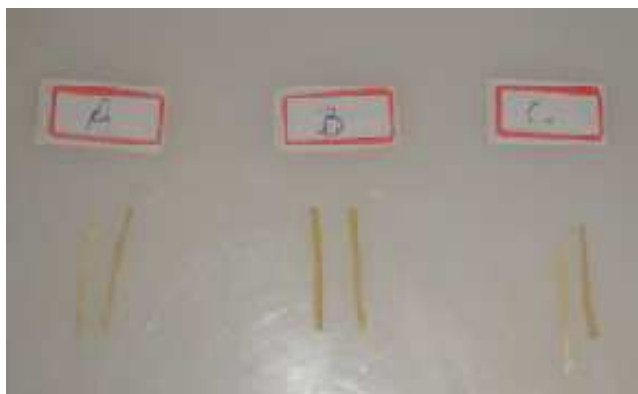


Figura 3 - Hastes de polímero de mamona com aproximadamente 2cm de comprimento

4.4 Procedimento Cirúrgico

O experimento foi realizado no Biotério da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul em Campo Grande – MS, no período compreendido entre os meses de outubro e dezembro de 2010.

Inicialmente os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Zoletil em doses de 0,1 ml/100g de peso corporal.

Após o procedimento anestésico, o animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo para ser realizada a tricotomia da face lateral da coxa direita e o local da incisão preparado com antissepsia (álcool-iodado). Foi realizada uma

incisão na fáscia lata, localizada a diáfise femoral e na face crânio-lateral a ± 50 mm da epífise proximal realizou-se a perfuração da cortical óssea até o canal medular utilizando-se uma broca de 0,7 mm de diâmetro acoplada a um contra-ângulo odontológico acionado por motor de implante de baixa rotação sob irrigação constante de soro fisiológico. A partir deste defeito ósseo realizado na cortical óssea foi introduzida a haste intramedular.

No grupo A o defeito ósseo foi preenchido por implante de polímero de mamona dopado com o vidro bioativo. No grupo B o defeito foi preenchido por implante apenas constituído de polímero de mamona. E no grupo C o defeito ósseo recebeu um implante de polímero de mamona dopado com vidro bioativo e hidroxiapatita.

No pós-operatório foi aplicado por via subcutânea o analgésico Butorfanol (Turbugesic®) com dose de 0,1ml/animal e o antiinflamatório Flunixin com dose de 0,1 ml/animal.

4.5 Eutanásia

Após 15 e 60 dias de observação, os animais foram submetidos à eutanásia por injeção excessiva de anestésico pentobarbital sódico via intraperitoneal na proporção de 100mg/Kg.

Constatada a morte dos animais foi realizada uma incisão para cuidadosa dissecação dos tecidos moles suprajacentes e desarticulação dos fêmures dos animais. Estas peças foram removidas, e em seguida imersas em frascos de vidros com formol tamponado a 10% e encaminhadas para estudo histológico.

4.6 Procedimento histológico

Os segmentos destinados à histologia foram fixados em formol a 10%, descalcificados com Etileno Diamino Tetra Acetato (EDTA) e processados para coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

As imagens de cada campo foram obtidas a partir de um microscópio de luz acoplado a uma câmera fotográfica digital. A análise do comportamento do material implantado foi realizada subjetivamente com o intuito de se analisar

características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, osteointegração e osteocondução.

Para a avaliação histológica utilizou-se um método qualitativo-quantitativo (SILVA *et al*, 2000) para a análise do infiltrado inflamatório e da degradação do material, onde ficou estabelecida a seguinte classificação:

- (0) ausência;
- (1) 1/3 do campo preenchido;
- (2) 2/3 do campo preenchido e;
- (3) maior que 2/3 do campo preenchido.

Em relação às trabéculas ósseas neoformadas ao redor ou no interior do implante e ao tecido conjuntivo ao redor do implante foram analisadas apenas a presença ou ausência destes.

Os dados obtidos foram utilizados para compor a tabela que está anexada (ANEXO B).

4.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a realização da MEV, as amostras foram posicionadas em suportes metálicos (stubs), fixadas com fita dupla-face de carbono e uma camada de prata líquida foi colocada abaixo do material para auxiliar na condutividade.

Em seguida, as amostras foram inseridas em uma evaporadora (Sputter) da marca Denton Vacuum modelo Desk IIIR (Figuras 4 e 5), as superfícies foram recobertas com um filme de ouro pulverizado e, então encaminhadas para o microscópio eletrônico.

O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi um Jeol JSM-6380LV (Scanning Eletron Microscope), operando com a tensão de aceleração típica de 15 kV (Figuras 6 e 7).



Figura 4 - Evaporadora (Sputter) Denton Vacuum - Desk IIIR.



Figura 5 - Equipamento utilizado para deposição metálica sobre as amostras.



Figura 6 - Vista geral do microscópio eletrônico de varredura (MEV).



Figura 7 - Coluna ótico-eletrônica, detector e câmara de amostras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise microscópica do implante por grupo

As fotomicrografias (figura 8) realizadas para análise das lesões histológicas do tecido ósseo descalcificado de acordo com cada grupo revelaram no canal medular:

- Grupo A15 - presença de material amorfo de coloração castanho-pardocento com formação (deposição) de tecido conectivo em volta. O restante do tecido medular exibe leve infiltrado inflamatório mononuclear e ausência de trabéculas ósseas neoformadas. Os vasos sanguíneos apresentam-se hiperêmicos e em algumas áreas hemorrágicos.
- Grupo A60 - presença de material amorfo, pardo-claro com deposição de tecido conectivo organizado envolvendo este. Nota-se ausência de infiltrado inflamatório e de trabéculas ósseas neoformadas.
- Grupo B15 - presença de material amorfo, pardo-pálido com deposição de tecido conectivo em volta deste isolando-o. Exibe leve infiltrado inflamatório e ausência de trabéculas ósseas neoformadas.
- Grupo B60 - presença de material amorfo de coloração pardo-claro envolto por tecido conectivo. Nota-se também a presença de infiltrado inflamatório leve e ausência de trabéculas de tecido ósseo neoformado no interior dos poros do biomaterial implantado.
- Grupo C15 - presença de material amorfo, pardo-claro com deposição de tecido conectivo em volta deste, organizado e vascularizado. Exibe também presença de trabéculas ósseas neoformadas no interior dos poros do implante e infiltrado inflamatório moderado no canal medular.

- Grupo C60 - presença de material amorfo, pardo-claro envolto por tecido conectivo. Revela ausência de infiltrado inflamatório e de trabéculas ósseas neoformadas.

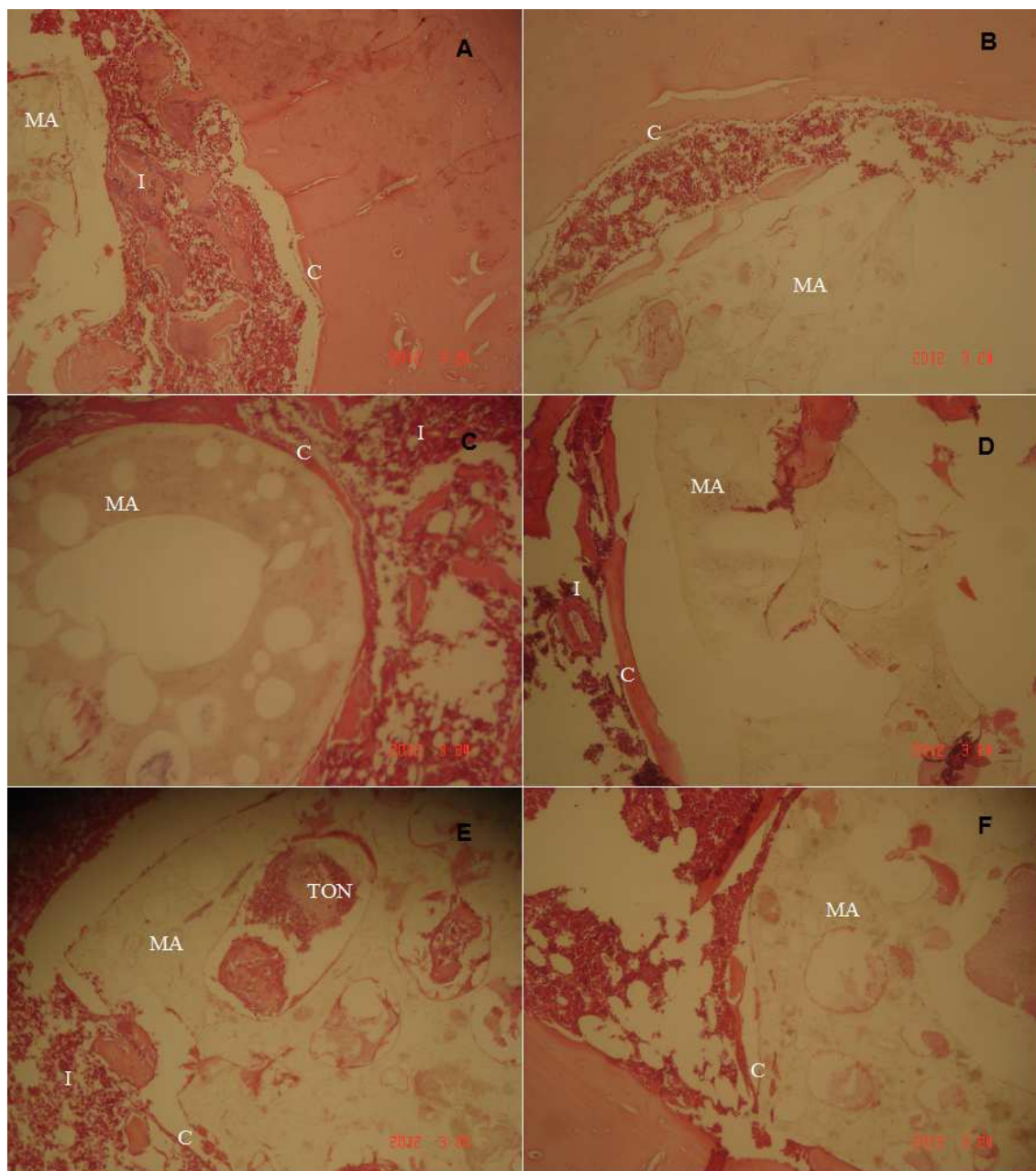


Figura 8 - Montagem das fotomicrografias das lesões histológicas do tecido ósseo revelando: infiltrado inflamatório (I), cápsula de tecido conjuntivo (C) material amorfo (MA) e trabéculas ósseas neoformadas (TON). A refere-se ao grupo A15, B ao grupo A60, C ao grupo B15, D ao grupo B60, E ao grupo C15 e F ao grupo C60.

5.2 Análise do comportamento do implante

O comportamento do implante foi avaliado através das características de biodegradabilidade, osteocondução, osteointegração e biocompatibilidade.

5.2.1 Estudo da biocompatibilidade e da osteointegração

A biocompatibilidade pode ser definida como a relação entre um material e o organismo, de tal forma que ambos não produzam efeitos indesejáveis. (SILVEIRA; MACHADO; SILVEIRA *et al.*, 2008). Já a osteointegração se refere a uma ancoragem direta de um implante pela formação de tecido ósseo ao redor deste sem o crescimento de tecido fibroso na interface osso-implante. (PEREIRA JUNIOR; RAHAL; IAMAGUTI *et al.*, 2007).

Nesta pesquisa, a biocompatibilidade e a osteointegração foi avaliada através da formação de cápsula de tecido conjuntivo ao redor do implante e da presença de infiltrado inflamatório nesta mesma área.

Para cada grupo foi calculado a média e desvio padrão dos níveis de intensidade de infiltrado inflamatório com base em uma escala de intensidade variando entre 0 e 3 pontos. Em seguida as médias dos pontos calculados foram também dispostas em proporção de presença no campo microscópico.

Foi testada a hipótese de diferença para Infiltrado Inflamatório entre os grupos A, B e C nos tempos 15 e 60 dias. Os valores foram comparados entre os grupos pelo teste Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância foi determinado em $p \leq 0,05$ (tabela 1 e 2).

Tabela 1 - Intensidade de Infiltrado Inflamatório para os grupos A, B e C no tempo 15 dias. Escala de intensidade variando de 0 a 3 pontos expressa em média e desvio padrão e também em proporção.

Grupos	Infiltrado Inflamatório	
	Pontos	Intensidade em %
A15	1,2±0,4	40,0
B15	1,3±0,5	43,3
C15	2,0±0,7	66,6
Kruskal Wallis	0,0706	
Pós-teste de Dunn	Ns	

(ns) não significativo.

Tabela 2 - Intensidade de Infiltrado Inflamatório para os grupos A, B e C no tempo 60 dias. Escala de intensidade variando de 0 a 3 pontos expressa em média e desvio padrão e também em proporção.

Grupos	Infiltrado Inflamatório	
	Pontos	Intensidade em %
A60	0,2±0,4	6,7
B60	0,8±0,5	26,7
C60	0,4±0,5	13,3
Kruskal Wallis	0,1975	
Pós-teste de Dunn	Ns	

(ns) não significativo.

A hipótese de diferença entre os tempos 15 e 60 dias foi testada aplicando-se o teste de Mann Whitney, mantido também o nível de significância de $p \leq 0,05$. Os dados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Infiltrado Inflamatório entre os tempos 15 e 60 dias para os Grupos A, B e C. Escala de intensidade variando de 0 a 3 pontos expressa em média e desvio padrão.

Grupos	Infiltrado Inflamatório
A15	1,2±0,4
A60	0,2±0,4
Mann Whitney	0,0283*
B15	1,3±0,5
B60	0,8±0,5
Mann Whitney	0,1415ns
C15	2,0±0,7
C60	0,4±0,5
Mann Whitney	0,0163*

(ns) não significativo; (*) valores estatisticamente significativos.

A biocompatibilidade do polímero de mamona, ou seja, a aceitação do organismo ao material implantado sem sinais de foco inflamatório importante e nenhuma reação granulomatosa tipo corpo estranho foi observada neste

trabalho em todos os grupos analisados e tem sido evidenciada por diversos autores após implante em defeitos ósseos (CALIXTO; TEÓFILO; BRENTGANI *et al.*, 2001; FRAZÍLIO; ROSSI; NEGRINI NETO *et al.*, 2006; LAUREANO FILHO; BRANCO; ANDRADE *et al.*, 2007; MENDONÇA; ROSSI; INOUE *et al.*, 2006).

Nesta pesquisa notou-se inicialmente a presença de infiltrado inflamatório moderado que diminuiu com a progressão do tempo, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa no Grupo B. Resultados semelhantes foram encontrados por Almeida, Santos, Fernandes *et al.* (2010) e Bolson (2005) que demonstraram que o polímero de mamona em defeitos ósseos é histologicamente biocompatível com presença de infiltrado inflamatório leve disperso pelo defeito.

Os resultados deste trabalho evidenciaram a formação de cápsula de tecido conjuntivo ao redor do material implantado em 100% dos animais avaliados em todos os períodos estudados, portanto, não houve diminuição da presença de cápsula de tecido conjuntivo com a progressão do tempo. Em contrapartida, Celeste; Rahal; Pereira Junior *et al.* (2010) avaliaram a resposta tecidual à implantação de discos de poliuretana derivada do óleo de mamona em ratos da linhagem Wistar e observaram que, inicialmente, houve uma reação inflamatória moderada que diminuiu de intensidade à medida que se intensificou a formação de tecido conjuntivo fibroso ao redor dos implantes.

A associação da hidroxiapatita e do vidro bioativo ao polímero de mamona não causou diferença nos resultados em relação à biocompatibilidade e a presença de infiltrado inflamatório inicial com diminuição no decorrer do tempo em comparação ao grupo em que foi implantado apenas o polímero de mamona.

A reação inflamatória encontrada nesta pesquisa pode ser justificada pelo fato de que qualquer material introduzido desencadeia uma resposta do hospedeiro que pode ser representada pela formação de cápsula de tecido conjuntivo ao redor do implante reconsiderando o conceito de que todo e qualquer material para ser biocompatível deveria ser totalmente inerte ao organismo. (PAULO; OLIVEIRA; NETTO *et al.*, 2008). Além disso, a implantação de qualquer substância na intimidade de um tecido conjuntivo, mesmo biocompatível, gera, inicialmente, uma reação inflamatória na área

implantada, como um mecanismo natural de defesa do organismo (GARCIA, 2007).

Fato este também observado por Hamerschmidt; Santo; Araújo *et al.* (2011) que analisaram a ação da hidroxiapatita na regeneração óssea em defeitos criados na mastóide de ratos e concluíram que a hidroxiapatita atuou como um aloenxerto biocompatível, sem a formação de granuloma de corpo estranho e com presença de infiltrado inflamatório moderado, porém isso também ocorreu no grupo controle, sendo, portanto uma reação normal que ocorre no início do reparo do tecido ósseo.

Já em relação ao tecido conjuntivo denso encontrado ao redor do polímero de mamona nos períodos iniciais, em todos os grupos avaliados neste estudo, não deve ser confundido com aquele tecido fibroso responsável por isolar corpos não biocompatíveis. A principal diferença entre estes dois é que a cápsula fibrosa é constituída exclusivamente por fibras colágenas, enquanto o tecido conjuntivo denso possui em sua composição tanto fibras colágenas como uma grande população celular que posteriormente poderão se diferenciar em células osteoprogenitoras (LEONEL; PORCIÚNCULA; ANDRADE SOBRINHO *et al.*, 2004; NACER, 2012).

Diversas pesquisas também vêm evidenciando a biocompatibilidade do vidro bioativo e da hidroxiapatita.

Shirane; Oda; Pinheiro *et al.* (2010) avaliaram a importância do colágeno e da hidroxiapatita na regeneração de fraturas provocadas experimentalmente na fíbula. Submeteram 15 ratos à cirurgia para retirada de um fragmento da fíbula e o local foi enxertado com tubos de silicone preenchidos com hidroxiapatita e colágeno. Os resultados demonstraram que os biomateriais usados apresentaram biocompatibilidade e capacidade osteocondutora capaz de estimular a osteogênese mesmo nos ossos com funções mecânicas e morfológicas secundárias como a fíbula de ratos.

Tiomis; Borges; Daibert *et al.* (2010) avaliaram histologicamente o biovidro particulado como substituto ósseo na regeneração de defeitos no osso alveolar da mandíbula de 28 cães adultos e conclui que além de biocompatível o vidro bioativo é osteocondutor e diminui o tempo de reparação do osso alveolar.

Canettieri (2006) avaliou a ação do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação desses dois materiais na reparação de defeitos ósseos em fêmures de ratas ovariectomizadas durante 21 dias e concluiu que o alendronato sódico isolado ou associado à hidroxiapatita prejudicou a reparação óssea neste modelo experimental, no entanto, a hidroxiapatita mostrou-se biocompatível e osteocondutora.

Villaça; Novaes; Souza *et al.* (2005) avaliaram histologicamente a eficácia de partículas de vidro bioativo (Biogran) na cicatrização de defeitos periodontais em macacos e observaram que o uso deste material foi biocompatível tanto nos tecidos conjuntivos como nos tecidos ósseos.

5.2.2 Estudo da osteocondução

Caracterizou-se a osteocondução como a capacidade de conduzir ou direcionar a neoformação óssea sobre e entre a estrutura do material de preenchimento. Assim, quanto maior o número de trabéculas ósseas neoformada em menor tempo, melhor é a propriedade osteocondutora do material.

Através de estudo histológico, a hipótese de dependência entre a presença e ausência de trabécula óssea neoformada para os grupos e períodos estudados foi testada utilizando-se o teste G e mantendo-se o nível de significância de $p \leq 0,05$. Os resultados estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição de freqüência segundo a ausência ou presença de trabécula óssea neoformada para os grupos A, B e C nos tempos 15 e 60 dias. Análise histológica.

	TON						Total
	A15	B15	C15	A60	B60	C60	
Ausente	4	4	1	4	3	3	16
Presente	1	0	4	1	1	2	12
Total	5	4	5	5	4	5	28

Os valores apresentaram dependência significativa em relação à presença ou ausência de trabéculas ósseas neoformadas ($p=0,0288$), indicando tendência de presença somente para o grupo C15 (Tabela 4), não sendo observada a osteocondução nos demais grupos.

A ausência de osteocondução na maioria dos grupos e, em especial, no grupo em que a haste é formada apenas por polímero de mamona, difere dos resultados encontrados na literatura, como por exemplo, Saran (2006) que analisou a interface entre o implante de hastes derivadas do polímero de mamona com o canal medular ósseo por meio de diagnósticos por imagem (radiografias simples e tomografias computadorizadas) e análise histológica na tíbia de 44 coelhos no período de 90, 120 e 150 dias. A análise histológica demonstrou que o polímero de mamona é biocompatível, osteocondutor e osteoindutor. A análise radiográfica permitiu documentar a posição intramedular do polímero e as imagens tomográficas demonstram limites mal definidos entre o implante e o canal medular, evidenciando, assim, a boa interação entre ambos.

Na Microscopia Eletrônica de Varredura foram obtidas fotomicrografias com magnificações de 100 e 250 aumentos (figuras 9) para a caracterização da morfologia e estrutura do polímero de mamona (distribuição dos poros e da rugosidade).

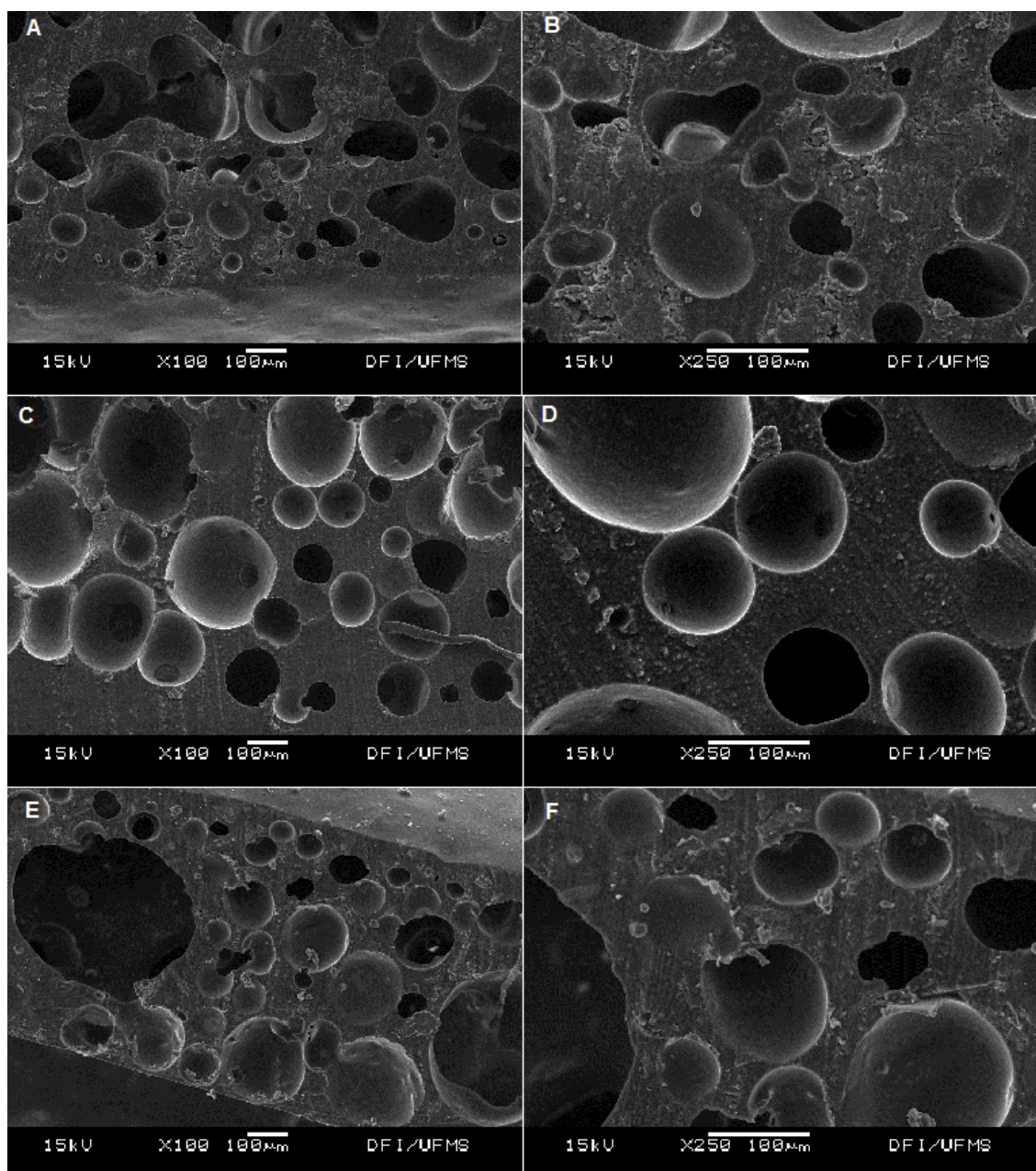


Figura 9 - Montagem de fotomicrografia realizada através da MEV obtida das hastes de polímero de mamona não implantado. A e B – Polímero de mamona dopado com vidro bioativo. C e D – Polímero de mamona sem dopante. E e F – Polímero de mamona dopado com vidro bioativo e hidroxiapatita.

As fotomicrografias das hastes de polímero de mamona pré-implantadas revelaram diferenças morfológicas entre os diferentes grupos analisados.

No grupo A (fotos A e B) que corresponde a hastes de polímero de mamona dopado com vidro bioativo observou-se rugosidade moderada e a presença de grande quantidade de poros de tamanhos variados.

A estrutura morfológica do polímero de mamona (fotos C e D) correspondente ao grupo B apresenta pouca rugosidade e, poros com

diâmetros mais regulares e em menor quantidade em relação ao grupo anterior.

Já o grupo C em que o polímero de mamona está dopado com vidro bioativo e hidroxiapatita a superfície apresenta-se bastante rugosa com presença de poros com diâmetros menores e em grande quantidade quando comparado ao grupo A e B.

A porosidade do material favorece a osteocondução, pois permite o crescimento tecidual para seu interior (DIAS; GRANATO; RAMALHO *et al.*, 2009), além de que, a porosidade melhora a conexão mecânica entre o biomaterial e o osso, promovendo melhor estabilidade mecânica na interface (TEIXEIRA, 2009). Contudo, como o preparo do produto foi efetuado manualmente, visto não haver ainda outros tipos de sistemas de misturas, a expansão e a porosidade são altamente dependentes desta forma de manipulação. A colonização celular dos substitutos ósseos depende das características de porosidade do biomaterial, em particular ao tamanho e a distribuição dos poros (TEIXEIRA 2009; CONZ; CAMPOS; SERRÃO *et al.*, 2010).

Como sugerem os resultados de Nacer, 2012, a adesão e o crescimento do tecido ósseo dependem da regularidade da superfície. Os fibroblastos parecem evitar as superfícies rugosas, e se acumulam em regiões mais lisas. Em contrapartida, macrófagos, células epiteliais e osteoblásticas aderem com maior facilidade a superfícies rugosas.

Apesar da importância da porosidade e da rugosidade do material implantado, as características estruturais encontradas nas hastes confeccionadas não favoreceram o processo de osteocondução do implante no canal medular.

5.2.3 Estudo da biodegradabilidade

O polímero de mamona, apesar de não se corar pela Hematoxilina-Eosina, foi facilmente identificado nesta pesquisa pela microscopia óptica, fato também citado por outros autores (CELESTE; RAHAL; PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2010; PEREIRA JUNIOR; RAHAL; IAMAGUTI *et al.*, 2007). O polímero de mamona implantado em todos os grupos, mesmo quando dopado com

hidroxiapatita e o vidro bioativo, foi observado nas lâminas como um material amorfo, ou seja, com morfologia irregular e, por esta razão é mais susceptível à decomposição. (CONZ; CAMPOS; SERRÃO *et al.*, 2010; TEIXEIRA, 2009).

A biodegradabilidade do material polimérico avaliada neste trabalho foi mensurada através da diminuição deste material no local da implantação. Isto é indicativo de degradação e reabsorção do implante.

Foi testada a hipótese de diferença para Degradação do Material entre os grupos A, B e C nos tempos 15 e 60 dias. Os valores foram comparados entre os grupos pelo teste Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância foi determinado em $p \leq 0,05$. Os dados estão apresentados na tabela 5 e 6.

Tabela 5 - Intensidade de Degradação do Material para os grupos A, B e C no tempo 15 dias. Escala de intensidade variando de 0 a 3 pontos expressa em média e desvio padrão e também em proporção.

Grupos	Degradação do Material	
	Pontos	Intensidade em %
A15	2,0±1,0	66,7
B15	2,0±1,4	66,7
C15	2,2±0,8	73,3
Kruskal Wallis	0,9164	
Pós-teste de Dunn	Ns	

(ns) não significativo.

Tabela 6 - Intensidade de Degradação do Material para os grupos A, B e C no tempo 60 dias. Escala de intensidade variando de 0 a 3 pontos expressa em média e desvio padrão e também em proporção.

Grupos	Degradação do Material	
	Pontos	Intensidade em %
A60	0,8±0,4	26,7
B60	1,8±1,3	58,3
C60	1,4±1,1	46,7
Kruskal Wallis	0,1177	
Pós-teste de Dunn	Ns	

(ns) não significativo.

A hipótese de diferença entre os tempos 15 e 60 dias foi testada aplicando-se o teste de Mann Whitney, mantido também o nível de significância de $p \leq 0,05$. Os dados estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Degradação do Material entre os tempos 15 e 60 dias para os Grupos A, B e C. Escala de intensidade variando de 0 a 3 pontos expressa em média e desvio padrão.

Grupos	Degradação do Material
A15	2,0±1,0
A60	0,8±0,4
Mann Whitney	0,0758 ns
B15	2,0±1,4
B60	1,8±1,3
Mann Whitney	0,5286 ns
C15	2,2±0,8
C60	1,4±1,1
Mann Whitney	0,0963 ns

(ns) não significativo.

Após 60 dias da implantação dos biomateriais foi observada pequena degradação ou absorção do material enxertado, em todos os grupos, porém essa degradação não foi estatisticamente significativa quando comparada ao período inicial de avaliação que foi de 15 dias. Estes resultados corroboram com os resultados encontrados por Laureano Filho; Branco; Andrade *et al.* (2007) que concluíram que o polímero de mamona pouco foi reabsorvido ao final de 15 semanas de uma pesquisa comparando a ação do osso desmineralizado de origem humana e o polímero de mamona na reparação óssea em cavidades realizadas na calvária de 24 coelhos. Assim como, Pereira Junior; Rahal; Iamaguti *et al.* (2007) avaliaram, por meio de exames radiográficos e histológicos, a função do polímero de mamona em falhas ósseas realizadas na diáfise de raios de coelhos e verificou, aos 15, 30, 60 e 120 dias de pós-operatório que o polímero de mamona atuou como

preenchedor de espaço, minimizando a produção de tecido fibroso no local e não apresentou sinais de reabsorção em nenhum dos momentos de avaliação.

Ao contrário de Leonel; Mangilli; Ramalho *et al* (2003) que relataram que a quantidade de polímero de mamona que preenchia o leito ósseo experimental em uma pesquisa diminuiu progressivamente nos períodos de 15, 30, 60, 90 e 120 dias e apresentava tecido conjuntivo denso emitindo septos para o interior dos poros do polímero implantado.

A associação da hidroxiapatita e do vidro bioativo no implante não influenciou estatisticamente na degradação do implante, semelhante ao resultado obtido por Duarte; Borges; Lavor *et al.* (2006) que após 60 dias de preenchimento com hidroxiapatita em superfície vestibular, essa manteve volume constante com formação óssea e neovascularização intensa. Porém, em relação ao vidro bioativo, Tiomis; Borges; Daibert *et al.* (2010) não observou sua presença após o mesmo período de avaliação, sugerindo completa absorção, além de presença de trabéculas ósseas em toda a área da falha indicando reparação óssea completa do defeito o que difere dos resultados encontrados nesta pesquisa.

Por fim, o implante ideal para fixação deve perder sua resistência gradualmente, transferindo o esforço mecânico que lhe é inerente, para o foco fraturário sendo reabsorvido pelo organismo quando este não se faz mais necessário e, dispensando uma nova cirurgia para remoção (FERREIRA; STEFFEN; CARDOSO *et al.*, 2008). No caso do implante das hastes de polímeros no canal medular, como neste experimento, o ideal é que essa reabsorção seja lenta e gradativa, para que possa ser eficaz na fixação e estabilização de fraturas mais extensas que necessitam de um tempo maior para reparo.

6 CONCLUSÃO

Mediante os resultados obtidos é possível concluir que:

O polímero de mamona associado ao vidro bioativo e a hidroxiapatita no canal medular foi biocompatível e osteointegrável quando considerado que não houve reação inflamatória intensa e nem a formação de cápsula de tecido fibroso isolando o implante.

O polímero de mamona mostrou-se como material osteocondutor somente nos períodos iniciais com a presença de hidroxiapatita e vidro bioativo (grupo C15).

Em relação à biodegradabilidade do material polimérico mesmo quando associado ao vidro bioativo e a hidroxiapatita não foi observada nesta pesquisa, pois a presença deste material no canal medular se manteve constante em todos os grupos.

REFERÊNCIAS

Almeida JM, Santos MR, Fernandes LA, Theodoro LH, Garcia VG. Estudo histomorfométrico do processo de cicatrização óssea em defeitos cirúrgicos de tamanho crítico em calvárias de ratos preenchidos com polímero de mamona. Revista Odontológica de Araçatuba. 2010; 31(1):22-27.

Andrade, AL, Domingues, RZ. Cerâmicas bioativas: estado da arte. Quim Nova. 2006; 29(1):100-104.

Bassi, AP, Carvalho, PSP. Repair of bone cavities in dog's mandible filled with inorganic bovine bone and bioactive glass associated with platelet rich plasma. Braz Dent J. 2011; 22(1):14-20.

Betti, LV. Análise microscópica e radiográfica do reparo de defeitos confeccionados em fêmures de coelhos preenchidos com matriz óssea bovina medular em bloco ou cortical em microgrânulos [Tese]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo; 2004.

Biancon Filho, LA, Tochetto Primo, B, Gassen, HT, Fontanella, VRC, Silva Junior, NA. Evaluation of optical density of bone defects filled calcium phosphate cement and bioactive glass in rats. Acta Cir Bras. 2011; 26(1):2-6.

Bioosteo. 2011. Disponível em:
<http://www.biomecanica.com.br/2011/pdf/bulas/b001bioosteo.pdf>. Acessado em: 20 jan 2011.

Bolson, J. Comportamento do polímero de mamona (*Ricinus comunis*) em ossos de codornas domésticas (*Coturnix japonica*) [Dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2005.

Brunner, TJ, Grass, RN, Stark, WJ. Glass and bioactive glass nanopowders by flame synthesis. *Eur Cell Mater*. 2006; 11(2):18.

Bugarin Junior, JG; Garrafa, V. Bioética e biossegurança: uso de biomateriais na prática odontológica. *Rev Saude Publica*. 2007; 41(2):223-228.

Calixto, RFE, Teófilo, JM, Brentegani, LG, Carvalho, TLL. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. *Pesqui Odontol Bras*. 2001(3):257-262.

Camarini ,ET; Iamashita, HY; Farah, GJ; Iwaki Filho, L; Pavan, AJ. Utilização de Biomateriais associados ou não ao plasma rico em plaquetas em cavidades ósseas cranianas. Estudo microscópico em cães. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr*. 2006; 6(2):199-206.

Candelorio, PD. Avaliação de compósitos de poliuretana de mamona e vidros bioativos dopados, com e sem prata, como material protético [Tese]. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2011.

Canettieri, ACV. Reparação óssea em fêmures de ratas ovariectomizadas sob a ação local do alendronato sódico, da hidroxiapatita e da associação alendronato com a hidroxiapatita [Tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos da Universidade Estadual Paulista; 2006.

Cavassani, MM; Moraes, JRE; Padilha Filho, JG. Função osteoindutora de fragmentos ósseos conservados em glicerina a 98%. Estudo experimental em ratos. Cienc Rural. 2001; 31(3):445-448.

Celeste, AS; Rahal, SC; Pereira-Junior, COM; Sequeira, JL; melo, SM. Resposta tecidual a implantes de discos de poliuretano de mamona nas formas pré-moldada ou biomassa moldada. Pesqui Vet Bras. 2010; 30(12):1089-1095.

Coelho, TM. Aplicação de métodos fototérmicos para o estudo de materiais: filmes poliméricos, corantes alimentícios e hidroxiapatita natural [Tese]. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2005

Conz, MB; Campo, CN; Serrão, SD; Soares, GA; Vidigal Junior, GM. Caracterização físico-química de 12 biomateriais utilizados como enxertos ósseos na Implantodontia. Rev Implantnews [serial online] 2010; 7(4):541-546. Disponível em: www.osseocon.com.br/images/11.pdf.

Corsetti, A. Avaliação do reparo ósseo em fêmures de ratos após implante de blocos de cimento de fosfato de cálcio e enxerto ósseo autógeno [Dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.

Costa; VC; Costa, HS; Vasconcelos; WL; Pereira; MM; Oréfice, RL; Mansur, HS. Preparation of hybrid biomaterials for tissue engineering. Materials Research. 2007; 10(1):21-26.

Croci, AT; Camargo, OP; Bitar, G; Pereira, SLB; Moreira, M; Freitas Junior, S. Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de

camundongos como estimulação de formação óssea. Estudo experimental. Acta Ortop Bras. 2003; 11(4): 230-239.

Dias, PCJ; Granato, L; Ramalho, LT; Oliveira, JÁ; Pretel, H. Avaliação histológica da biocompatibilidade do polímero de mamona no dorso nasal de macacos-pregos (*Cebus apella*). Braz J Otorhinolaryngol. 2009; 75(3):350-355.

Dórea Neto, FA; Padilha Filho, JG; Oriá, AP; Furlani, JM; Santos, LA. Artrodese do carpo em gatos associada à hidroxiapatita. Cienc Rural. 2004; 34(3):931-934.

Duarte, TS; Borges, APB; Lavor, MSL; Filgueiras, R; Tsiomis, AC; Oliveira, FL; Pontes, KCS. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos histológicos. Arq Bras Med Vet Zootec. 2006; 58(5):849-853.

Dutra, E; Duarte, E; Xavier, L; Siqueira, L; Barros, T. Osteossíntese. Fisioweb; 2004 [atualizada em 15 julho 2004, acesso em 23 abril 2012]. Disponível em: <http://www.wgate.com.br/conteudo/medicinaesaude/fisioterapia/traumato/osteossintese/osteossintese.htm>.

Ferreira, BMP; Steffen, AM; Cardoso, TP; Alberto-Rincon, MC; Duek, EAR. Haste intramedular polimérica bioreabsorvível (PLLA/PHBV) para uso na recuperação de fraturas ósseas. Polímeros: Ciência e Tecnologia. 2008; 18(4):312-319.

Foppiano, S; Marshall, SJ; Marshal, GW; Saiz, E; Tomsia, AP. The influence of novel bioactive glasses on in vitro osteoblast behavior. J Biomed Mater Res A. 2004; 71:242-249.

Frazílio, FO; Rossi, R; Negrini Neto, JM; Facco, GG; Ovandos, TM; Ferreira Filho, MP. Use of castor oil polyurethane in an alternative technique for medial patella surgical correction in dogs. Acta Cir Bras. 2006; 21(4):74-79.

Galdino, AGS. Produção e caracterização de arcabouços porosos de compósitos hidroxiapatita/titânia (HÁ-TiO_2) para uso em engenharia tecidual óssea [Tese]. Campinas: Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas; 2011.

Garcia, RD. Estudo do processo evolutivo do reparo ósseo frente ao implante de osso bovino inorgânico e de hidroxiapatita BTCP. Análise microscópica em alvéolos dentários de ratos [Dissertação]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo; 2007.

Giordano, V; Albuquerque, RP; Rezende, R; Senna, LF; Pompei, A; Amaral, NP *et al.* Estudo histomorfológico da incorporação de aloenxerto fresco e da hidroxiapatita de alta porosidade em defeito ósseo produzido em fêmures de ratos. Rev Bras Ortop. 2006; 41(9):384-391.

Hamerschmidt, R; Santos, RF; Araújo, JC; Stahlke Junior, HJ; Agulham, MA; Moreira, ATR *et al.* Hidroxiapatite granules used in the obliteration of mastoid cavities in rats. Braz J Otorhinolaryngol. 2011; 77(3):315-321.

Ignácio, H; Mazzer, N; Barbieri, CH; Chierice, GO. Utilização da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea: estudo experimental em cães. Rev Bras Ortop. 2002; 37(5):187-194.

Laureano Filho, JR. Comparação entre a matriz óssea desmineralizada e a poliuretana deriva do óleo da mamona sobre o processo de regeneração óssea. Estudo histológico e histométrico em calvária de coelhos [Tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas; 2001.

Laureano Filho, JR; Branco, BLC; Andrade, ESS; Barbosa, JRA. Comparação histológica entre o osso desmineralizado e polímero de mamona sobre a regeneração óssea. Rev Bras Otorrinolaringol. 2007; 73(2):186-192.

Leite, VL. Estudo comparativo do efeito do ultra-som de 1MHz com frequência de repetição de pulso a 100Hz e 16Hz no tratamento de fratura de fíbula de rato [Dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2005.

Leite; FRM; Ramalho, LTO. Boné regeneratiom after demineralized boné matrix and castor oil (ricinus communis) polyurethane implantation. J Appl Oral Sci. 2008;16(2):122-126.

Leles, JLR. Reparo alveolar após implante de vidro bioativo: avaliação histológica em macacos [Tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista; 2006.

Leonel, ECF; Mangilli, PD; Ramalho, LTO; Andrade Sobrinho, J. A importância da porosidade interna do polímero de mamona durante a neoformação óssea. Estudo em ratos. Cienc Odontol Bras. 2003; 6(3):19-25.

Leonel, ECF; Porciúncula, HF; Andrade Sobrinho, J; Ramalho, LTO; Mangilli, PD; Rapoport, A. A ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. Acta Cir Bras [serial online]. 2004; 19(4):342-350. Disponível em: <http://www.scielo.br/acb>.

Lima, AFM; Rahal, SC; Muller, SS; Correa, MCE; Padovani, CR. Propriedades mecânicas do cimento ósseo e da poliuretana de mamona com e sem catalisador. Arq Bras Med Vet Zootec. 2008;60(5):1061-1068.

Macedo; NL; Matuda, FS; Macedo, LGS; Gonzalez, MB; Ouchi, SM;Carvalho, YR. Bone defect regeneration with bioactive glass implantation in rats. J Appl Oral Sci. 2004; 12(2):137-143.

Maria, PP; Padilha Filho, JG; Castro, MB. Análise macroscópica e histológica do emprego da poliuretana derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*) aplicada na tíbia de cães em fase de crescimento. Acta Cir Bras [serial online]. 2003; 18(4):332-336. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.

Mendes; SM; Fonseca, CE; Bassi, APF; Ponzoni, D; Carvalho, PSP. Avaliação histológica e histomorfométrica do reparo de cavidades ósseas em tíbias de ratos preenchidas por osso desmineralizado ou por osso composto com esem proteína morfogenética do osso (BMP). Revista Odontológica de Araçatuba. 2006; 27(1):34-40.

Mendonça, JCG; Rossi, R; Inouye, CM; Bazan, DRP; Monteiro, JCC; Mendonça, JP. Morphology of autogenous bone graft and castor oil polyurethane in the infraorbital rim of rabbits: a comparative study. *Acta Cir Bras*. 2006; 21(5):341-347.

Nacer, RS. Estudo do comportamento do polímero de mamona como material de substituição óssea em defeito diafisário no fêmur de ratos frente a alterações secundárias à associação com nanopartículas de sílica e zircônia [Dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2009.

Nacer RS; Poppi, RR; Carvalho, PTC; Silva, BAK; Odashiro, AN; Silva, IS *et al*. Castor oil polyurethane containing silica nanoparticles as filling material of bone defect in rats. *Acta Cir Bras* [serial online]. 2012; (27):56-62. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/pdf/acb/v27n1/a10v27n1.pdf>.

Oliveira, AAR; Oliveira, JE; Oréfice, RL; Mansur, HS; Pereira, MM. Avaliação das Propriedades Mecânicas de Espumas Híbridas de Vidro Bioativo/Álcool Polivinílico para Aplicação em Engenharia de Tecidos. *Revista Matéria* [serial online]. 2007; 12(1):140-149. Disponível em: <http://www.materia.coppe.ufrj.br/sarra/artigos/artigo10855>

Paulo, BO; Oliveira, IG; Netto, LAPG; Santana, LC; Chaves, PHL. Compatibilidade de compósitos biologicamente ativos em implantes de tecido osteotraumático. *Coletânea*. 2008; 2(2):102-111.

Pereira, CL. Influência da radiação laser de baixa intensidade sobre o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio instalados sobre osso: análise

histométrica em coelhos [Dissertação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas; 2006.

Pereira Junior, OCM; Rahal, SC; Iamaguti, P; Felisbino, SL; Pavan, PT; Vulcano, LC. Comparison between polyurethanes containing castor oil (soft segment) and cancellous bone autograft in the treatment of segmental bone defect induced in rabbits. J Biomater Appl. 2007; 21:283-297.

Pretel, H. Ação de biomateriais e laser de baixa intensidade na reparação tecidual óssea. Estudo histológico em ratos [Dissertação]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista; 2005.

Rivera, JÁ; Riaño, CH; Echavarría, A; Monsalve, PA; Alzate, GJ; Restrepo, LF *et al.* Caracterización y evaluación de Hidroxiapatita Sintética y el compuesto de Hidroxiapatita Sintética porosa. Proteínas Morfogenéticas Óseas en un modelo experimental Lapino. Rev Col Cienc Pec. 2004; 17(1):20-28.

Roberto, WS; Pereira, MM; Campos, TPR. Analysis of bioactive glasses obtained by sol-gel processing for radioactive implants. Materials Research. 2003; 6(2):123-127.

Saran, WR. Estudo experimental de implantes derivados da resina poliuretana de mamona (*ricinus communis*), inseridos no canal medular da tíbia de coelhos. Análise da interface osso e implante [Dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2006.

Sena, LA. Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações Biomédicas [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2004.

Shirane, HY; Oda, DY; Pinheiro, TC; Cunha, MR. Implantes de biomateriais em falhas ósseas produzidas na fíbula de ratos. Rev Bras Ortop. 2010; 45(5):478-482.

Silva, SI; Aydos, RD; Faloppa, F; Gomes, PO. Estudo morfológico da regeneração óssea em coelhos submetidos a complementação de cálcio na alimentação. Acta Cir Bras. 2000; 15(1):44.

Silva, CLA; Pinto, LESC; Louro, LHL; Lima, ES; Silva, MHP. Caracterização microestrutural do compósito hidroxiapatita bovina-biovidro. Rev Mil Ci Tec [serial online] 2011; 28(1):8-23. Disponível em: http://rmct.ime.eb.br/arquivos/RMCT_1_tri_2011/caracteriza_microestrut_hidrox_i.pdf.

Silva Junior, PE; Oréfice, RL. Compósitos bioativos obtidos a partir da inserção de vidro bioativo em matriz de poli (metacrilato de metila). Polímeros: Ciência e Tecnologia. 2001; 11(3):109-115.

Silveira, RL; Machado, RA; Silveira, CRS; Oliveira, RB. Bone repair process in calvarial defects using bioactive glass and calcium sulfate barrier. Acta Cir Bras. 2008; 23(4):322-328.

Silvestre Filho, GD. Comportamento mecânico do poliuretano derivado do óleo de mamona reforçado por fibra de carbono: contribuição para o projeto de

hastes de implante de quadril [Dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo; 2001.

Sousa, CDS. Estudo histomorfométrico da reparação óssea em ratos após o uso de biomaterial de origem sintética (hidroxiapatita + β -tricalciofosfato) [Monografia]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2010.

Spadeto Junior, O; Rodrigues, LB; Carvalho, WTV; Moreira, DO; Marval, CA; Costa, CG *et al.* Sistema osso-implante ex vivo utilizando haste intramedular polimérica para imobilização de fraturas femorais em bovinos jovens. Cienc Rural. 2011; 41(2):301-306.

Stein, RS; Silva, JB; Silva, VD. Estudo comparativo da neoformação óssea utilizando-se o enxerto autógeno e três substitutos: defeitos ósseos em ratos. Rev Bras Ortop. 2009; 44(4):330-335.

Tavares, P. Intervenção fisioterapêutica no pós cirúrgico da fratura diafisária de fêmur com utilização de haste intramedular [Monografia]. Rio de Janeiro: Universidade Veiga de Almeida; 2009.

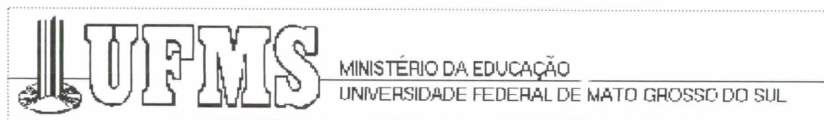
Teixeira, LJC. Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos [Dissertação]. Duque de Caxias: Universidade do Grande Rio - "Prof. José de Souza Herdy"; 2009.

Tiomis, AC; Borges, APB; Daibert, APF; Duarte, TS; Pontes, KCS; Carvalho, TB *et al.* Avaliação histológica do biovidro particulado na reparação de defeito experimental em mandíbula de cães. Arq Bras Med Vet Zootec. 2010; 62(1):80-85.

Villaça, JH; Novaes Junior, AB; Souza, SLS; Taba Junior, M; Molina, GO; Carvalho, TLL. Bioactive glass efficacy in the periodontal healing of intrabony defects in monkeys. *Braz Dent J.* 2005; 16(1):67-74.

Yoshikawa, H; Myoui, A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Organs.* 2005; 8(1):131-136.

ANEXO A – Protocolo do CEUA



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 270 da Mestranda Viviani da Silva Soares Teixeira, sob a orientação da Profª Drª Iandara Schettert Silva, referente ao projeto de pesquisa intitulado, **“Estudo do comportamento do polímero de mamona associado ao vidro bioativo e à hidroxiapatita no reparo ósseo em ratos”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 19 de agosto de 2010.

Campo Grande (MS), 23 de agosto de 2010.

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Joice Stein', is positioned above the printed name.

Drª Joice Stein

Presidente em exercício da CEUA

ANEXO B – Tabela dos Resultados

		Cápsula T. Conjuntivo	Trab. Ósseas Neoformadas	Infiltrado Inflamatório	Degradação Material
A15	1	Presente	Ausente	1	1
	2	Presente	Presente	2	3
	3	Presente	Ausente	1	2
	4	Presente	Ausente	1	1
	5	Presente	Ausente	1	3
B15	1	Presente	Ausente	1	0
	2	Presente	Ausente	2	3
	3	Presente	Ausente	1	2
	4	Presente	Ausente	1	3
C15	1	Presente	Presente	2	3
	2	Presente	Presente	2	1
	3	Presente	Presente	3	3
	4	Presente	Presente	2	2
	5	Presente	Ausente	1	2
A60	1	Presente	Presente	1	1
	2	Presente	Ausente	0	1
	3	Presente	Ausente	0	1
	4	Presente	Ausente	0	0
	5	Presente	Ausente	0	1
B60	1	Presente	Ausente	1	2
	2	Presente	Ausente	1	3
	3	Presente	Presente	1	2
	4	Presente	Ausente	0	0
C60	1	Presente	Ausente	0	2
	2	Presente	Presente	1	3
	3	Presente	Ausente	0	0
	4	Presente	Ausente	1	1
	5	Presente	Presente	0	1