

RENATO DALCIN SEGALA

**HIDROXIAPATITA NANO E MICROPARTICULADA:
INTERAÇÃO ÓSSEA**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.**

SÃO PAULO

2019

RENATO DALCIN SEGALA

**HIDROXIAPATITA NANO E MICROPARTICULADA:
INTERAÇÃO ÓSSEA**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. SILVIO EDUARDO DUAILIBI

COORIENTADOR: Prof^a. Dra. MONICA TALARICO DUAILIBI

SÃO PAULO

2019

Segala, Renato Dalcin

Hidroxiapatita nano e microparticulada: interação óssea /Renato Dalcin
Segala – São Paulo, 2019.
xvi, 99f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Nano and microparticulate hydroxyapatite: bone interaction.

1.Hidroxiapatita. 2. Engenharia Tecidual. 3.Biomateriais.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
TRANSLACIONAL**

COORDENAÇÃO: Prof^ª. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. SILVIO EDUARDO DUAILIBI

CO-ORIENTADOR: Prof^ª. Dra. MONICA TALARICO DUAILIBI

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Antonio Alberto Segala e Maria Irene Dalcin Segala, o amor e carinho sempre e por me apoiarem, incentivarem durante toda minha vida.

À minha esposa Camila Gusson, toda compreensão, parceria e incentivo durante esses 6 anos de união e principalmente durante a confecção dessa dissertação.

Ao meu filho Davi Henrrique Gusson Segala que ainda se encontra no ventre da sua mãe, e já se tornou meu maior motivo e incentivo para buscar e concretizar todos meus sonhos.

À minha irmã Mariana Dalcin Segala, sobrinhos e toda minha família, a torcida e pensamento positivo durante toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador ***SILVIO EDUARDO DUAILIBI*** e minha co-orientadora ***MONICA TALARICO DUAILIBI***, a oportunidade, apoio, incentivo, e por acreditar em meu potencial, não titubeando em momento algum dividir seus conhecimentos.

Meus mais sinceros agradecimentos

Primeiramente agradeço à **DEUS** minha existência, saúde e oportunidades em toda minha trajetória.

Aos meus pais **ANTONIO ALBERTO SEGALA** e **MARIA IRENE DALCIN SEGALA** a educação, confiança, carinho e apoio em todas minhas decisões. Certamente são a base das minhas conquistas e meus exemplos de vida.

À minha irmã **MARIANA DALCIN SEGALA**, meu cunhado **ANDRÉ BENEVENUTO**, meus sobrinhos **VITOR** e **LORENA**, o carinho e apoio sempre.

À minha esposa **CAMILA GUSSON**, que hoje carrega em seu ventre meu filho **DAVI HENRRIQUE**, o seu amor, compreensão, dedicação, carinho e muita paciência durante essa fase de confecção da minha dissertação, sempre me apoiando e dando forças para continuar em busca dos meus ideais.

Aos meus avós (*in memoriam*) **VITORINO DALCIN**, **VERGINIA LEITE MIRANDA**, **GENTIL ALBERTO SEGALA** e **MARIA LUIZA SEGALA** que em vida sempre torceram por minhas conquistas, e certamente onde estiverem encontram-se orgulhos por essa conquista.

Aos aprimorandos regressos e atuais da Clínica escola de pequenos animais da Universidade Guarulhos, a compreensão e incentivo a todo momento para que eu concluísse essa fase com sucesso, em especial meu muito obrigado à **DANIELA MORETTE**, **DENISE LOPES** e **NATHALIA RIBEIRO** que

colaboraram de forma ativa na parte prática e coleta de resultados do meu projeto.

À professora **LYDIA MASA KO FERREIRA**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional, a oportunidade de aprendizado com excelentes professores e profissionais das diversas áreas que compõe o programa.

Aos professores e alunos do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional que dividiram conhecimentos nas aulas durante esses dois últimos anos.

Aos grandes professores que me educaram desde a infância, alguns “*in memoriam*”, e de alguma forma colaboraram para minha formação. Entre eles não posso deixar de citar um professor da minha graduação **LUIS ARTUR GIUFFRIDA PEREIRA DA SILVA** que me incentivou e deu toda a base para que eu seguisse em minha profissão e ingressasse na pesquisa científica.

Aos amigos de profissão que compreenderam minha ausência em alguns momentos de dedicação à pesquisa, como também colaboraram em tudo que precisei, entre eles **FRANCO CALDERARO** que orientou da melhor forma como interpretar as lâminas de histologia dessa pesquisa.

Aos amigos do laboratório **DANIELA, ERIC PEÇANHA, LUCIANA LOPES, LEANDRO DE PAULA** e **PAULO SIMÕES**, que sempre me incentivaram e disponibilizaram seu tempo sem medir esforços em me ensinar todos os passos que eu deveria seguir para realizar essa pesquisa.

Em especial gostaria de agradecer o amigo de laboratório, **PAULO OLIVEIRA MARTINS** por ter colaborado com todo desenvolvimento inicial desse trabalho com ideias, pesquisas e muito conhecimento, também a amiga **CELMA MARTINS** que não mediu esforços para me ajudar no desenvolvimento prático dessa pesquisa.

Às amigas doutorandas **LUCIANA FERNANDES, LUCIANA APARECIDA DE SOUZA IWAMOTO, RANI DA CUNHA MORETTI** que me auxiliaram e incentivaram a todo momento, até aqueles mais difíceis onde me sentia desamparado com uma palavra amiga e de conforto, colaboram muito com a confecção desse trabalho.

Ao amigo pós doutorando **SERGIO SATOSHI KUWAJIMA** que sempre me apoiou e colaborou com seu conhecimento nas correções do meu trabalho.

Ao **ALEXANDRE ANTUNES RIBEIRO** e **MARIZE VARELLA** do Instituto Nacional de Tecnologia do Rio de Janeiro, por confiarem no meu projeto e cederem os biomateriais para serem utilizados, além de colaborarem com indicações de profissionais para realização da análise de Micro Tomografia.

Ao professor **RICARDO TADEU LOPES** e a pós doutoranda **ALINE SADDOCK** do laboratório de Instrumentação Nuclear – COPPE/UFRJ pela dedicação e parceria na análise de Micro CT.

À secretária do programa de pós graduação **SANDRA DA SILVA** e do programa de aprimoramento **MARTA REIS** por toda atenção e dedicação

durante todo programa, que sempre me orientaram da melhor forma como resolver a parte burocrática dos cursos.

Ao ***PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL***, a oportunidade e contribuição em meu aprendizado, permitindo a criação de um senso crítico e por possibilitar a ampliação do conhecimento por meio das diversas linhas de pesquisa.

E por fim, não menos importantes, agradeço todos que convivem comigo diariamente e torcem pelo meu sucesso.

“A força do pensamento positivo é o que nos permite subir os maiores degraus na escada da vida”

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS.....	V
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	6
3. LITERATURA.....	8
4. MÉTODO	19
5. RESULTADOS	46
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO.....	67
8. REFERÊNCIAS.....	69
FONTES CONSULTADAS	75
NORMAS ADOTADAS	77
APÊNDICES.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dimensões dos implantes	23
Figura 2 - Implantes.....	26
Figura 3 - Implantes agrupados.....	27
Figura 4 - Identificação dos coelhos	28
Figura 5 - Acesso arterial	29
Figura 6 - Área de tricotomia pré-cirúrgica	30
Figura 7 - Procedimento cirúrgico.....	31
Figura 8 - Implantação do biomaterial	32
Figura 9 - Exame radiográfico	33
Figura 10 - Remoção dos espécimes	34
Figura 11 - Mensuração dos espécimes	35
Figura 12 - Amostras coletadas.....	36
Figura 13 - Corte do material	38
Figura 14 - Material cortado.....	38
Figura 15 - Material sendo lixado.....	39
Figura 16 - Colagem do material na lâmina	39
Figura 17 - Lâminas de histologia do coelho 10	40
Figura 18 - Lâminas de histologia do coelho 11	40
Figura 19 - Lâminas de histologia do coelho 16	41
Figura 20 - Lâminas de histologia do coelho 20	41
Figura 21 - Lâminas de histologia do coelho 21	42
Figura 22 - Análise histológica.....	43
Figura 23 - Equipamento <i>Skyscan</i>	44
Figura 24 - Análise I Micro CT.....	45
Figura 25 - Análise II Micro CT	45
Figura 26 - Radiografias coelho 13, projeção ML.....	47
Figura 27 - Radiografias coelho 13, projeção VD	48
Figura 28 - Radiografias coelho, 14 projeção ML.....	48
Figura 29 - Radiografias coelho 14, projeção VD	49
Figura 30 - Radiografias coelho 23, projeção ML.....	49
Figura 31 - Radiografias coelho 23, projeção VD	50
Figura 32 - Radiografias coelho 24, projeção ML.....	50
Figura 33 - Radiografias coelho 24, projeção VD	51
Figura 34 - Radiografias 27, projeção ML.....	51
Figura 35 - Radiografias coelho 27, projeção VD.	52
Figura 36 - Análise estatística da histologia.....	57
Figura 37 - Análise estatística do volume de osso neo formado.....	60
Figura 38 - Análise estatística do volume de poros no osso neo formado	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AM	Agitação Magnética
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CEDEME	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais em Medicina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CRMV-SP	Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo
ET	Engenharia Tecidual
<i>et al.</i>	e colaboradores
INT	Instituto Nacional de Tecnologia
ITRI	Instituto Internacional de Pesquisa em Tecnologia
HA	Hidroxiapatita
MicroCT	Microtomografia Computadorizada
ML	Médio lateral
NSF	<i>National Science Foundation</i>
PLA	ácido polilactídico
PMMA	polimetacrilato de metila
SFF	<i>solid freeform</i>
TD	Tíbia direita
TDA	Tíbia direita amostra experimental
TDC+	Tíbia direita controle positivo
TDC-	Tíbia direita controle negativo
TE	Tíbia esquerda
TEA	Tíbia esquerda amostra experimental
TEC+	Tíbia esquerda controle positivo
TEC-	Tíbia esquerda controle negativo
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
US	Sonda Ultrassônica
VD	Ventro Dorsal

RESUMO

Introdução: A Engenharia Tecidual (ET) é a ciência que associa conhecimentos biológicos com fundamentos da Engenharia. A ET baseia-se na utilização de materiais biocompatíveis (*scaffolds*) semeados com células (*construct*) que possuem a capacidade de se diferenciar em tecidos. Entre esses biomateriais, a hidroxiapatita (HA) é o mais estudado para a ET dos tecidos mineralizados. A avaliação do biomaterial de HA é fundamental para colaborar com a regeneração óssea. **Objetivo:** Avaliar a interação dos implantes de HA nano e micro particulada em tibia de coelhos. **Método:** Foram implantados cirurgicamente 56 implantes de HA em tíbias de 28 coelhos, 28 implantes eram de HA nano particulada e 28 de HA micro particulada, sendo 14 nano e micro particuladas sinterizados por ultrassom (US) e 14 sinterizados por agitação magnética (AM). Três orifícios foram realizados nas tíbias dos coelhos, nos orifícios proximais foram implantados os biomateriais nano particulados (controle positivo), nos orifícios centrais micro particulados (amostra experimental), e o orifício distal ficou vazio (controle negativo). Três controles radiográficos foram realizados com intervalo de 14 dias. Após 28 dias a morte indolor induzida foi realizada e os espécimes foram colhidos e submetidos à análise histológica e MicroCT. **Resultados:** Os controles positivos AM e US apresentaram menor crescimento ósseo e maior porosidade em relação às amostras experimentais, já os controles negativos maior crescimento ósseo e menor porosidade. **Conclusões:** A utilização de um biomaterial de HA nano particulada promove maior crescimento ósseo com menor porosidade, colaborando com a ET de tecidos mineralizados.

Palavras Chave: Hidroxiapatita. Engenharia Tecidual. Biomateriais.

ABSTRACT

Introduction: Tissue Engineering (ET) is the science that associates biological knowledge with Engineering fundamentals. ET is based on the use of cell-seeded biocompatible materials (scaffolds) that have the ability to differentiate into tissues. Among these biomaterial, hydroxyapatite (HA) is the most studied for ET of mineralized tissues. The evaluation of the biomaterial of HA is fundamental to collaborate with the bone regeneration.

Aim: To evaluate the interaction of hydroxyapatite implants nano and micro particulate in rabbit tibia. **Methods:** Fifty-six hydroxyapatite implants was implanted on twenty- eighth rabbit tibia. 28 implants was nano particulate hydroxyapatite and 28 micro particulate hydroxyapatite, 14 nano and micro particulate implants was sintered by ultrasound (US) and 14 sintered by magnetic stirring (MS). Three holes were made in the tibia of the rabbits, in the proximal holes were implanted the nano particulate biomaterials (positive control), in the central holes were implanted the micro particulate (experimental sample) and, the distal orifice was empty (negative control). Three radiographic controls were performed with a 14-day interval. After 28 days the painless induced death was performed and the specimens were harvested and submitted to histological analysis and MicroCT. **Results:** The positive controls MS and US presented lower bone growth and greater porosity in relation to the experimental samples, whereas the negative controls had higher bone growth and lower porosity. **Conclusions:** The use of a nano particulate hydroxyapatite biomaterial promotes greater bone growth with lower porosity, collaborating with ET of mineralized tissues.

Key words: Hydroxyapatite. Tissue Engineering. Biomaterials.

1. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A Medicina Regenerativa se propõe ao desafio de encontrar soluções para pacientes com perdas teciduais decorrentes de traumas, doenças ou alterações congênitas. As técnicas convencionais possuem limitações devido à complexidade dos tratamentos. As mais comuns são: as próteses e os transplantes de órgãos e tecidos. As próteses necessitam de tecnologia avançada para sua confecção e habilidade do cirurgião para uma implantação com sucesso. Quanto aos transplantes, os pacientes necessitam do uso crônico de imunossuppressores e dependem de doadores de órgãos ou tecidos viáveis e compatíveis, fato que aumenta a complexidade do procedimento.

A partir da necessidade de avanço das técnicas tradicionais e do surgimento de novos estudos, as ciências médicas passam a vislumbrar, na Engenharia Tecidual (ET), respostas para seus questionamentos. A ET foi definida em 1988 por Skalak como "A aplicação de princípios e métodos de Engenharia e Ciências da Vida para obter a compreensão fundamental das relações estrutura-função em tecidos novos e patológico de mamíferos e do desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar o tecido e a função". Corroborada mais tarde pelo relatório ITRI (*International Technology Research Institute*) e NSF (*National Science Foundation*). Segundo Langer e Vacanti (1993), ET é a ciência que reúne os princípios da Biologia com os conhecimentos de Engenharia. Nesse sentido, é necessário que profissionais de outras áreas do conhecimento científico estejam relacionados, o que a classifica como área multi inter e trans-profissional.

Enquanto o desenvolvimento de técnicas terapêuticas com o objetivo da reparação de órgãos ou tecidos apresentam considerável desenvolvimento

tecnológico, as estratégias que priorizam a regeneração ainda necessitam alcançar o sucesso nos desafios impostos a este novo paradigma científico. Os estudos baseados na utilização de células-tronco com capacidade de diferenciação em tecidos demonstraram a possibilidade do desenvolvimento de técnicas de regeneração tecidual (DUAILIBI et al., 2004), visando a Medicina Regenerativa. Atualmente, o tecido ósseo é ainda motivo de grande investigação científica, nesse contexto, diversas técnicas foram realizadas até o final do século XIX, sem grande sucesso. Em 1926, JONG WF por meio de um estudo de difração e análise química de dentes e ossos revelou que as fases inorgânicas dessas estruturas eram basicamente compostas por hidroxiapatita (HA). Atualmente, inúmeros substitutos ósseos são utilizados, podendo ser derivados de produtos biológicos, como matriz óssea desmineralizada, plasma rico em plaquetas (PRP), adjuvantes de fatores de crescimento, hidroxiapatita ou sintéticos como cerâmica de fosfato tricálcico, vidros bioativos, sulfato de cálcio e polímeros. A ET utiliza esses materiais supracitados, considerando-os como biomateriais, com intuito de regenerar e substituir grandes perdas teciduais. Entretanto, não são todos que possuem indicação de uso clínico (DE GRADO et al., 2018).

Estudos envolvendo biomateriais e novos métodos de síntese apresentaram ascensão nos últimos tempos. Dentre eles, as biocerâmicas se destacaram principalmente por apresentarem bons resultados no corpo humano (RATNER & BRYANT, 2004), sendo a hidroxiapatita (HA), o biomaterial cerâmico mais estudado com objetivo de aplicação clínica com a finalidade de corrigir defeitos ósseos. Os ossos e estruturas dentais, são tecidos mineralizados com estrutura físico-químico-mecânica complexa. Ambos possuem uma fase inorgânica semelhante a HA em estrutura e composição química (TANG *et al.*, 2009). O componente mineral do osso

possui diferentes apatitas e representa de 30 a 70% da massa desse tecido. A HA é composta por Fosfato de Cálcio cristalino, representando 99% do Cálcio corporal e 80% do Fósforo total, sua estrutura química é representada por $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Suas características estão em possuir excelente biocompatibilidade e bioatividade, serem consideradas não tóxicas, não alergênicas, não carcinogênicas, e osteocondutoras (CARVALHO *et al.*, 2004) aumentando assim, o interesse do estudo deste biomaterial na ET.

As HAs biológicas são encontradas em tecidos vivos e consideradas não estequiométricas, devido ao fato de possuírem íons em sua estrutura que podem ser substituídos, resultando em modificações importantes em sua morfologia e conseqüentemente na sua propriedade cristalina. A apatita não estequiométrica é o principal componente inorgânico do tecido ósseo, fator este que aumenta o interesse dos pesquisadores em desenvolver apatitas modificadas como substitutos ósseos, com objetivo de implantar esse biomaterial para participar ativamente do processo de regeneração óssea, o que nem sempre se consegue com a utilização da HA estequiométrica (LANDI *et al.*, 2008).

A estrutura da HA pode ser alterada por substituições catiônicas e aniônicas, resultando em modificações em suas propriedades estruturais (WEBSTER, 2004). As substituições catiônicas podem ocorrer entre o Ca^{2+} com cátions bivalentes como Mg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} e trivalentes La^{3+} , Y^{3+} , In^{3+} e Bi^{3+} ; o $(\text{PO}_4)^{-3}$ pode ser substituído por carbonatos e vanadatos e a OH^- por carbonatos, flúor e cloro. Essas alterações modificam diretamente a cristalinidade, dimensões, textura de superfície, estabilidade e solubilidade do biomaterial (WEBSTER *et al.*, 2002; WEBSTER, 2004). Tanto a estrutura química, como as dimensões estruturais da partícula de HA, tem sido apontada como um dos fatores que

mais influenciam na formação do tecido ósseo e nas características intrínsecas desses biomateriais como: solubilidade e biocompatibilidade. Nesse contexto, as nanopartículas acabam favorecendo mais essas características, quando comparadas à uma escala micrométrica desses biomateriais (BALASUNDARAM; SATO; WEBSTER, 2006).

Baseado nesses dados foi possível compreender a importância de realizar o estudo da integração óssea com biomaterial de HA, com foco na aplicação e uso na ET para regeneração e biofabricação de substitutos ósseos.

2. OBJETIVO

OBJETIVO

Avaliar a interação dos implantes de HA nano e micro particulada em tíbia de coelhos.

3. LITERATURA

LITERATURA

De modo didático este capítulo de literatura foi descrito e subdividido nos seguintes tópicos:

- Engenharia Tecidual (ET);
- Biomateriais
- Hidroxiapatita;

3.1 ENGENHARIA TECIDUAL (ET):

BISCEGLIE (1933) realizou um experimento utilizando células tumorais de ratos, usando um polímero como arcabouço (*scaffolds*) e implantando na cavidade abdominal de porcos da índia. Após 12 dias, o conjunto constituído pelo arcabouço (*scaffolds*) e células, mantiveram suas características estruturais preservadas, demonstrando que não houve reação adversa com a presença de fatores inflamatórios locais, o que permitiu constatar ausência de reação imunológica. Com esse experimento foi demonstrado que as técnicas de Engenharia Tecidual eram possíveis de serem aplicadas.

A Engenharia Tecidual foi definida por SKALAK (1988) como “a ciência que reúne os princípios e métodos de Engenharia, com a biologia para obter uma estrutura funcional que represente a anatomia dos tecidos de mamíferos desenvolvendo substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar o tecido e a sua função”. Corroborada mais tarde pelo relatório ITRI (*International Technology Research Institute*) e NSF (*National Science*

Foundation), Skalak ainda ressaltou que a ET é uma ciência interdisciplinar que aplica os princípios da Engenharia com as técnicas da biologia, para o desenvolver substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função do tecido ou órgão.

Na década de 90, devido a problemática dificuldade de doadores de órgãos e conseqüentemente aumento de óbitos relacionados com perda de órgãos, falência dos mesmos, assim como a rejeição de transplantes, LANGER & VACANTI (1993) publicaram artigo mencionando a importância da utilização das técnicas da ET com o objetivo de desenvolver substitutos biológicos a fim de restaurar, melhorar ou manter a função do órgão ou tecido. Segundo os autores a ET, é a área inter, multi e trans disciplinar que proporcionará no futuro, o desenvolvimento de tecidos substitutos funcionais.

LANGER (2000) descreveu que as vantagens da ET em relação às outras terapias convencionais estavam na possibilidade de fornecer uma solução definitiva para a falta de doadores, e solucionar as complicações como perda por falência, ausência e disfunção de órgãos e tecidos.

SACHLOS & CZARNUSZKA (2003) relataram no estudo em que utilizaram um sistema de fabricação de arcabouço (*solid freeform SFF*) com cultivo *in vitro* de células humanas na qual avaliaram a adesão, proliferação, migração celular e a posterior diferenciação no tecido específico relacionando a secreção da matriz extracelular necessária para a formação tecidual. Neste estudo, os autores apontaram o quanto era importante considerar as características do suporte quanto ao tamanho, material

utilizado, quantidade e distribuição dos poros assim como, sua resistência para que determine o resultado terapêutico desejado da ET.

DUAILIBI et al. (2004) concluíram que apesar da limitação nas abordagens técnicas em terapias regenerativas, muitos estudos nesse segmento utilizando células e biomateriais mostraram a possibilidade de diferenciação em tecidos organizados que promovem a regeneração de órgãos ou tecidos complexos.

De acordo com CHAN & LEONG (2008) a ET tinha como objetivo desenvolver substitutos biológicos funcionais de tecidos e órgãos danificados, mimetizando sua forma e função, por meio de um arcabouço também denominado de *scaffold*, uma estrutura de material biocompatível que mimetizava a morfologia dos tecidos e servia de suporte para carrear células para um tecido receptor. Os *scaffolds* podiam ser produzidos por materiais sintéticos ou biológicos. O uso combinado de biomateriais (*scaffold*), fatores de crescimento e células-tronco eram estudos básicos da ET.

NICHOL & KHADEMHOSEINI (2009) afirmaram em seus estudos, que para melhorar a função dos tecidos modificados, se fazia necessário gerar estruturas que imitassem a arquitetura e a complexidade dos tecidos receptores e/ou lesionados, favorecendo a microvascularização, ligações celulares e morfologia específicas desses tecidos.

De acordo com BUTLER *et al.*, (2009) outro fator importante a ser levado em consideração para um bom desenvolvimento da ET, era entender a biomecânica dos tecidos e células, que influenciam profundamente no

processo de crescimento, desenvolvimento, manutenção, degeneração e reparo dos tecidos.

DEMIRBAG *et al.* (2011) afirmaram que existem três componentes básicos que deviam ser respeitados e levados em consideração para a elaboração da estratégia em ET: células, agentes bioreativos e *scaffold*. As células deviam expressar os genes apropriados mantendo seu fenótipo adequadamente preservando a função específica do tecido ou órgão. Os agentes bioreativos eram sinais que induziam a célula à sua função e os *scaffolds* abrigariam as células e atuavam como substitutos dos tecidos lesionados.

Segundo FONT TELLADO *et al.* (2015), a ET era a área que procurava mimetizar estruturalmente os tecidos ou órgãos, considerando suas propriedades intrínsecas e suas interfaces, até sua regeneração completa.

VIEIRAS *et al.* (2017) relataram que a regeneração óssea para a ET apresentava grande desafio, principalmente em relação a macro e microestrutura que deveriam mimetizar as propriedades do tecido original. Segundo os autores, a nanotecnologia surgiu para solucionar a aquisição de nanoestruturas que adquiriam as características do tecido natural, além de favorecer a inclusão de fatores indutores e células que facilitariam a distribuição destes, na estrutura interna do arcabouço quando implantadas.

DE GRADO *et al.* (2018) relataram que a ET utilizava matriz óssea desmineralizada, plasma rico em plaquetas, adjuvantes de fatores de crescimento, hidroxiapatita ou materiais sintéticos como cerâmica de fosfato

tri-cálcico, vidros bioativos, sulfato de cálcio e polímeros, transformando estes, em biomateriais, substituindo grandes perdas teciduais pela regeneração tecidual.

3.2 BIOMATERIAIS

Segundo estudos de ZIUPOS (1998), a presença dos biomateriais estava diretamente relacionada com os resultados biológicos, causando reação na proliferação celular e remodelamento tecidual. Esta observação tem levado cada vez mais pesquisadores a aprimorar os estudos de interface entre os biomateriais e a resposta biológica específica.

ALBREKTSSON & JOHANSSON (2001) concluíram que os termos osteoindução, osteocondução e osseointegração eram processos que participavam da cicatrização óssea. Estes processos se inter-relacionavam e a osteoindução ocorria quando a osteogênese era induzida por meio do recrutamento de células imaturas estimulando-as a desenvolver os pré osteoblastos. A osteocondução era o processo que proporcionava as células crescerem na superfície e que na presença de um biomaterial conduziria através deste biomaterial, o crescimento ósseo e a osteointegração, permitindo a ancoragem no osso. Os autores concluíram que os processos de cicatrização óssea não dependiam somente de fatores biológicos, mas também de uma resposta do biomaterial.

De acordo com WANG (2003), os biomateriais podiam ser classificados de acordo com sua estrutura química ou comportamento biológico. Os autores ainda classificaram os biomateriais de acordo com sua

composição química e poderiam ser metálicos, cerâmicos, poliméricos ou compostos. Os metálicos apresentavam boa resistência mecânica, destacando entre eles o titânio, liga cromo-cobalto e titânio-alumínio-vanádio. Os autores relataram que os biomateriais cerâmicos possuíam biocompatibilidade como a maior vantagem, e eram formados por íons encontrados em nosso organismo como Ca^+ , K^+ , Mg^+ , Na^+ , destacando as apatitas. Os polímeros em destaque utilizados como biomateriais eram polietilenos, poliuretano, polipropileno, ácidos polilactídico (PLA) e o polimetacrilato de metila (PMMA), e os biomateriais compostos eram formados pela associação dos materiais supracitados.

WAN *et al.* (2006) comparando duas abordagens em que utilizaram autoenxerto (enxertos de doador e receptor em mesmo indivíduo), e biomaterial sintético. Os autores apontaram a vantagem da utilização do biomaterial em relação ao autoenxerto, devido ao fato deste apresentar possibilidade de contaminação por vírus ou bactéria além de, expor o paciente a outra intervenção cirúrgica.

PRECHEUR (2007) relatou a limitação do uso de aloenxertos (enxertos de doador e receptor mesma espécie) e xenoenxertos (enxertos de doador e receptor em diferentes espécies) causando risco de rejeição ou de transmissão de doenças e concluíram que o uso de biomateriais apresentava maior segurança biológica.

CHIM & GOSAIN (2009) ressaltaram em seu estudo, que o termo biomaterial poderia ser utilizado para qualquer material natural ou sintético que podia executar, acrescentar ou substituir a função de um tecido onde seria implantado.

PRYOR *et al.* (2009) concluíram que o biomaterial ideal quando utilizado como substituto ósseo deveria conter algumas propriedades importantes, tais como: biocompatível, não gerar resposta inflamatória adversa, ser facilmente moldado ao tecido ósseo, manter forma e volume ao longo do tempo, possuir radioluscência para boa avaliação radiográfica após implantado, como também ser termicamente não condutor, bioativo, capaz de ser esterilizado, e prontamente disponível a um custo razoável.

De acordo com os estudos realizados por ABDEEN & SAHA (2017), na última década, os estudos com os biomateriais com a finalidade de interagir com material biológico tiveram grande expansão. Aplicações *in vitro* ou *in vivo* colaboraram em diferentes oportunidades para terapias baseadas em células, promovendo uma forma inteligente dos biomateriais se comportarem frente ao tecido pela capacidade de interagir com tipos de células específicas, promovendo sinalizações celulares especificamente projetadas e capacidade de resposta biológica.

3.3. HIDROXIAPATITA (HA)

JONG (1926) no seu estudo sobre difração e análise química de dentes e ossos revelou que as fases inorgânicas dessas estruturas eram basicamente compostas por hidroxapatita de cálcio, sendo que a parte mineral do osso era composta por HA, mas com uma variedade de impurezas de íons na rede de HA, como íons de carbono, sódio e magnésio.

SUCHANECK *et al.* (1998) demonstraram em seus estudos, que a HA promovia osteointegração e diminuía processo inflamatório. Os autores

afirmaram também, que para ocorrer a osteointegração, um dos fatores que devesse ser considerado era o tamanho do poro do biomaterial (mínimo 100 - 135 μ m), além da utilização de partículas esféricas de HA.

De acordo com estudos realizados por GOSAIN *et al.* (2002), o biomaterial de HA apresentava lenta degradação, permitindo que o mesmo ficasse no local implantado por um longo período, garantindo o volume ósseo, ainda correlacionaram o tempo de degradação do biomaterial com a área de superfície, cristalinidade e carga mecânica que o biomaterial pudesse receber.

LeGEROS (2002) relatou que os biomateriais de HA podiam ser de origem natural ou sintética, mostrando que as formas naturais encontradas para uso clínico eram derivadas de corais ou ossos bovinos. O autor ainda relatou que esses biomateriais estavam disponíveis e eram fabricados em diversas formas, incluindo grânulos e blocos porosos. O autor concluiu que os biomateriais de HA com geometria tridimensional apropriada poderiam se tornar osteoindutores com capacidade de promover a osteogênese, quando se ligavam a proteínas morfogenéticas ósseas da circulação.

CARVALHO *et al.* (2004) relataram que a HA era composta por Fosfato de Cálcio cristalino, representando 99% do Cálcio corporal e 80% do Fósforo total, sua estrutura química era representada por $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Os autores descreveram que as características da HA apresentavam excelente biocompatibilidade e bioatividade, que a mesma não era tóxica, nem alergênica, nem carcinogênica e era osteocondutora.

PATEL (2005) concluiu que a HA era biocompatível e possuía boa resistência mecânica, era bioativa, não tóxica, radiopaca, permitindo o acompanhamento periódico por meio de exames de imagem e ainda, apresentava pouca reação tecidual, não sendo antigênica e nem carcinogênica.

GOPI *et al.* (2008) relataram que as moléculas de HA presentes nos tecidos duros do corpo humano eram muito pequenas, consideradas nanoestruturas que possuíam forma de bastão com poucos nanômetros de espessura e dezenas de nanômetros de comprimento. Os autores concluíram que a HA nanoparticulada era o material mais adequado para ser utilizado na regeneração e substituição óssea, por possuir dimensões próxima do mineral natural.

REY *et al.* (2009) relataram a importância de mais pesquisas para entender melhor a estrutura química e cristalina das apatitas sintéticas e geológicas e que as pesquisas foram inicialmente desenvolvidas por geólogos, cristalógrafos e químicos e mais tarde por fisiologistas e bioquímicos com a intenção de melhorar as funções fisiológicas e biológicas desse mineral ósseo. Os autores ainda relataram que essas estruturas sintéticas, geológicas e do mineral encontrado no osso, se mostravam diferentes quanto ao tamanho das partículas, sendo as dos ossos bem menores.

Segundo TAN *et al.* (2013), a HA era considerada o melhor substituto ósseo, por conseguir uma ligação sólida e firme com o tecido ósseo, além de demonstrar comportamento osteocondutor e não gerar efeitos indesejáveis ao corpo humano e possuir uma relação Ca/P de 1,67.

FIHRI *et al.* (2017) afirmaram que o termo hidroxiapatita estava relacionado a presença de duas hidroxilas (OH), enquanto apatita tem origem da palavra grega “apatos” com o significado de enganar, pois as apatitas eram confundidas com pedras preciosas como o topázio.

YAZIDANI *et al.* (2018) relataram que ainda era crescente as perspectivas do preparo de hidroxiapatita a baixo custo, principalmente nas formas micro e nanoparticulada. Os autores deram ênfase em seus estudos que a hidroxiapatita nanoparticulada apresentava maior área de superfície e maior reatividade. Quando testaram nanoestruturas de HA em revestimentos de implantes dentários notaram maior ligação química com o osso e consequentemente melhor osseointegração e fixação biológica.

4. MÉTODO

MÉTODO

Neste capítulo de Método serão descritos os seguintes itens:

- Caracterização do Estudo;
- Critérios de Inclusão;
- Critérios de não Inclusão;
- Critérios de Exclusão
- Caracterização dos Animais;
- Caracterização dos Implantes;
- Delineamento da Pesquisa;
- Técnica Operatória;
- Morte Indolor Induzida e Remoção das Espécimes;

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo apresenta caráter primário, intervencional, experimental, longitudinal, prospectivo, analítico, controlado, randomizado e realizado em centro único.

4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo coelhos machos, da cor branca, linhagem Nova Zelândia, com idade e peso aproximado de quatro meses e 2,8 Kg respectivamente.

4.3. CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

Não foram inclusos no estudo coelhos com deformidades ósseas congênitas ou traumáticas e coelhos com doenças pré-existentes.

4.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do experimento, os animais que por qualquer motivo venham a ter óbito durante do período de experimento.

4.5. CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS

No presente estudo foram utilizados 28 coelhos brancos da linhagem Nova Zelândia, macho, com idade e peso de aproximadamente 16 semanas e 2,81 kg respectivamente, aprovados sob o N° 3570230115 da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Apêndice 1), na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Os animais foram adquiridos na Coelho Real – Granja dos Ipês. Os mesmos ficaram alocados e foram manejados durante o período experimental em gaiolas tradicionais, individuais de 80cm³ suspensas a 0,9m do chão, empilhadas três gaiolas uma sobre a outra, totalizando 15 gaiolas em uma sala, no biotério do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais em Medicina (CEDEME) da UNIFESP. A dieta foi mantida por ração balanceada, peletizada (Nuvital R[®]) na quantidade de 150 gramas aproximadamente, fornecidas diariamente. A água foi mantida *ad libitum* durante todo o período do experimento por meio de bebedouro em garrafa de vidro com bico pet de alumínio e presilhas para fixá-las nas gaiolas. A

temperatura e umidade do ambiente foram controladas e turnos de claro e escuro de doze em doze horas realizados. Todo o manejo foi realizado por técnicos do CEDEME, a avaliação dos animais durante a permanência no biotério foi realizada pelo Médico Veterinário Renato Dalcin Segala CRMV-SP 16.293, para controle, preservação e garantia da sanidade.

4.6. CARACTERIZAÇÃO DOS IMPLANTES

Foram disponibilizadas pelo Instituto Nacional de Tecnologia do Rio de Janeiro (INT), 112 implantes de hidroxiapatita em formato de cilindros com dimensões aproximadas de 2,8 x 2,5 mm de altura e diâmetro (Figura 1) respectivamente, identificadas quanto a sua estrutura e quantidade da seguinte forma:

- Implantes de controle positivo, desenvolvidas pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF):

14 implantes processados com pó micrométrico HAP_CBPF_A1

14 implantes processados com pó micrométrico HAP_CBPF_A3

14 implantes processados com pó micrométrico HAP_CBPF_LD10

14 implantes processados com pó micrométrico HAP_CBPF_LD12

- Implantes experimentais, desenvolvidas pelo INT:

14 implantes A1 – obtidas por meio de síntese de Cloreto de Cálcio Dihidratado e Fosfato de Sódio Dodecahidratado, e sinterizadas por agitação magnética 2°C/minutos, mantidas a 1150°C por 2 horas.

14 implantes A3 – obtidas por meio de síntese de Ácido Fosfórico e hidróxido de Cálcio e sinterizadas por agitação magnética 2°C/minuto, mantidas a 1150°C por 2 horas.

14 implantes LD10 – obtidas por meio de síntese de Cloreto de Cálcio Dihidratado e Fosfato de Sódio Dodecahidratado e sinterizadas por sonda ultrassônica 5°C/minuto, mantidas a 1000°C por 2 horas.

14 implantes LD12 – obtidas por meio de síntese de Cloreto de Cálcio Dihidratado e Fosfato de Sódio Dodecahidratado e sinterizadas por sonda ultrassônica 5°C/minuto, mantidas a 1100°C por 2 horas.

Os implantes receberam as identificações supracitadas e uma numeração de 1 a 14 aleatoriamente pelo INT.

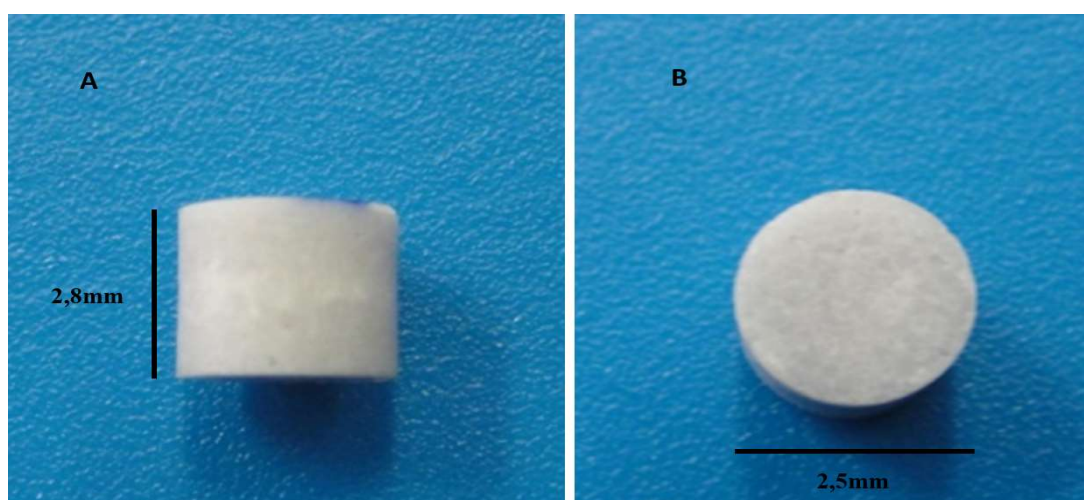


Figura 1 - Dimensões dos implantes

As imagens representam as dimensões dos implantes com altura de 2,8mm x 2,5mm de diâmetro.

4.7. DELINEAMENTO DA PESQUISA

Os 28 coelhos foram enumerados aleatoriamente de 1 a 28, todos os animais passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico nas tíbias direita e esquerda, as quais receberam três perfurações na sua face medial, somente em uma das corticais, com distância de 10 mm entre elas, foram implantados os implantes correspondendo a controle positivo no orifício proximal, amostra experimental no orifício central e o orifício distal permaneceu sem implante caracterizando o controle negativo.

Um processo de randomização foi realizado com auxílio do site www.randomization.com para definir as amostras que foram implantadas em cada coelho da seguinte forma: Randomização entre os coelhos e a rota de sinterização, as amostras sinterizadas por agitação magnética receberam a identificação (AM) ou as amostras sinterizadas por sonda ultrassônica (US) (Apêndice 2), uma segunda randomização foi realizada para definir em qual tibia seria iniciado o procedimento cirúrgico em cada animal, tibia direita (TD) ou tibia esquerda (TE) (Apêndice 3), e a terceira randomização foi realizada entre os coelhos que receberam as amostras AM (Apêndice 4) ou US (Apêndice 5), identificando quais amostras iriam receber de acordo com suas numerações. A randomização está representada na Tabela 1.

Tabela 1 - Randomização

COELHO	INÍCIO TD	INÍCIO TE	AM	US
01		*		*
02	*		*	
03		*		*
04	*			*
05		*	*	
06		*	*	
07	*			*
08		*		*
09		*	*	
10		*		*
11	*			*
12	*		*	
13	*		*	
14	*			*
15		*	*	
16	*		*	
17		*	*	
18		*	*	
19	*		*	
20	*		*	
21		*	*	
22	*			*
23	*			*
24		*	*	
25	*			*
26	*			*
27		*		*
28		*		*

TE - tibia esquerda; TD - tibia direita; AM - agitação magnética; US – ultrassom;
 * - marcação do coelho em relação ao implante recebido (AM ou US) e início do procedimento (TD ou TE).

Os implantes foram embalados individualmente em papel grau cirúrgico Sispack[®], disponível em rolo de 100m de comprimento por 50mm de largura. O papel grau cirúrgico foi cortado com 60mm de comprimento (Figura 2), mantendo sua largura, conseqüentemente realizado a selagem de uma das extremidades com a seladora para papel Selapack[®] 35 cm bivolt. Os implantes e sua respectiva identificação impressa em um papel foram colocados dentro do envelope de papel grau cirúrgico. Após a embalagem e identificação individual dos implantes, os mesmos foram separados em grupos de acordo com sua implantação nos coelhos e os grupos foram colocados em outro envelope de papel grau cirúrgico de 80mm de largura por 100mm de comprimento e identificados com o número do coelho a ser implantado e qual grupo pertencia e qual tibia seria iniciada a implantação (Figura 3), em seguida suas extremidades foram seladas.

Os envelopes com os implantes foram armazenados em um armário livre de luz solar e umidade, em temperatura ambiente e submetidos à esterilização por calor úmido por autoclave Cristófoli[®] digital 12L em um ciclo de 16 minutos à 129-132°C, pressão de 1,7-1,9 kgf/cm² e 30 minutos de secagem, por dois dias antes da sua implantação.



Figura 2 - Implantes

A imagem representa os implantes embalados e identificados individualmente em papel grau cirúrgico.

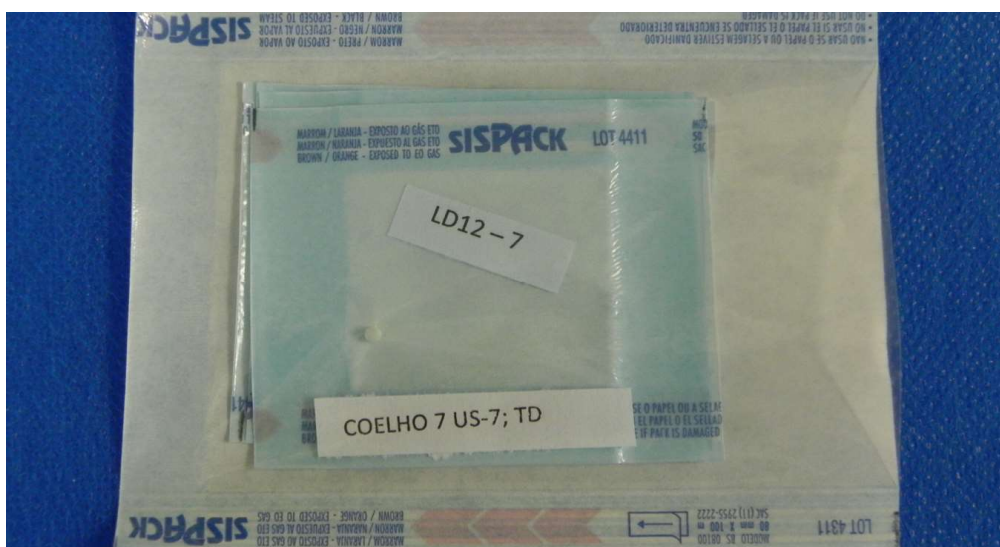


Figura 3 - Implantes agrupados

A imagem os representa os implantes agrupados de acordo com a implantação no coelho correspondente.

4.8. TÉCNICA OPERATÓRIA

Os coelhos foram privados de ração e não de água, 6 horas que antecederam o início do ato cirúrgico, foram pesados em balança de precisão, a seguir receberam uma medicação pré-anestésica na dose de 0,75mg/kg de Acepromazina (Acepran[®] - Vetnil receita de campeões) associado à 1mg/kg de Morfina por via intramuscular (IM), com a função de tranquilização e analgesia pré-operatória. Após 10 minutos foi realizado a indução anestésica por via intramuscular com associação dos fármacos e doses respectivamente, Cloridrato de Cetamina 35mg/kg (Ketamina[®] - Agener União Saúde Animal) e Cloridrato de Xilazina 5mg/kg (Calmiun[®] - Agener União Saúde Animal).

Em seguida foi realizado tricotomia, seguida de antissepsia com Clorexidine alcoólico 0,5% para acesso venoso, com cateter 24 na veia cefálica, os coelhos receberam um brinco de plástico (Anilhas Capri[®]) para identificação, na cor amarela, colocados por pressão com o aplicador para

brincos plástico (Total Tagger[®]) com a numeração da sua identificação voltada para face interna do pavilhão auditivo correspondente ao lado que iniciou o procedimento cirúrgico (Figura 4). A artéria auricular do pavilhão auditivo foi acessada com cateter N^o24 (Nipro[®]) para monitoração da pressão invasiva durante o procedimento cirúrgico com um esfigmomanômetro (Premium[®]) acoplado à um kit Pan e torneira de 3 vias (Nipro[®]) (Figura 5), associado à esse parâmetro. A frequência cardíaca, respiratória e temperatura também foram monitoradas e discriminadas em uma ficha anestésica durante todo ato cirúrgico.



Figura 4 - Identificação dos coelhos

A imagem representa o brinco de identificação na cor amarela, colocado no pavilhão auditivo do coelho.



Figura 5 - Acesso arterial

A imagem representa o acesso arterial na artéria auricular e monitoramento da pressão arterial.

Toda superfície das tíbias foram tricotomizadas com uma lâmina de tricotomia N°40, acoplada a uma máquina de tosa (Andis®), a antisepsia com Clorexidine alcoólico 0,5% foi realizada em ambas as tíbias e o animal foi posicionado em decúbito dorsal (Figuras 6) e mantido rotação cervical lateral para uma melhor ventilação do paciente durante o procedimento.

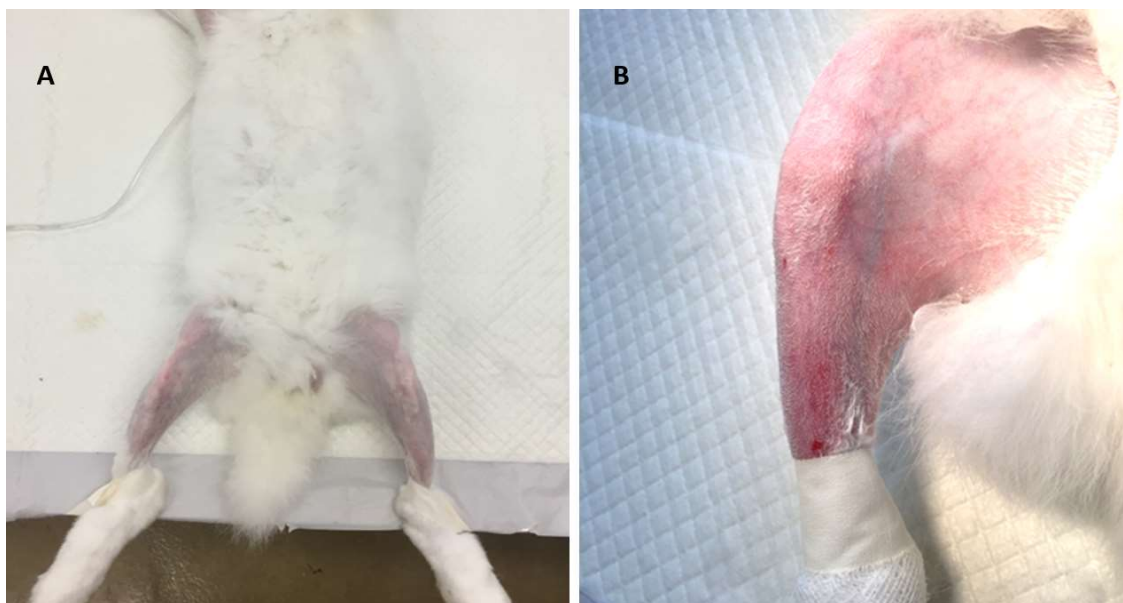


Figura 6 - Área de tricotomia pré-cirúrgica

A imagem representa a tricotomia da região das tíbias e o posicionamento em decúbito dorsal do coelho para o procedimento cirúrgico.

Um pano de campo estéril foi apoiado sobre as tíbias e um orifício realizado delimitando e isolando o campo operatório. Uma incisão cutânea de 40 mm foi realizada na face medial da tíbia com um auxílio de uma lâmina de bisturi N°15 (Solidor®) acoplada a cabo de bisturi N°3 (Brasmed®), em ato contínuo foi realizado divulsão de tecido subcutâneo e musculatura na face medial, terço proximal da tíbia, obtendo a exposição óssea (Figura 7A). Um gabarito de aço inox 316L com três orifícios com distância de 10 mm entre eles e diâmetro de 2,5 mm foi apoiado na face medial da tíbia (Figura 7B) para direcionar as perfurações na cortical óssea, que foram realizadas com uma broca ortopédica helicoidal de 2,5 mm de diâmetro acoplada a um perfurador ósseo, a irrigação foi constante com solução fisiológica 0,9% durante a perfuração (Figura 7C).

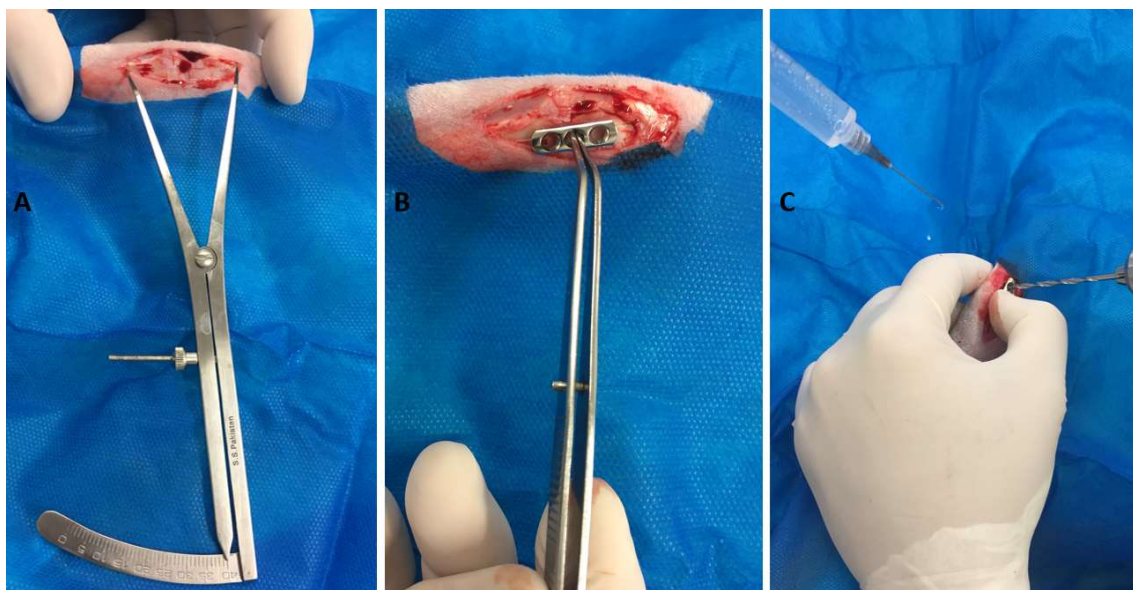


Figura 7 - Procedimento cirúrgico

As imagens 7A, B e C representam a incisão cutânea de 40 mm com divulsão do tecido subcutâneo e consequente exposição óssea (A), apoio do gabarito para perfuração óssea nos 3 pontos (B) e perfuração óssea com broca helicoidal 2,5 mm sob irrigação constante (C).

Após as três perfurações realizadas, os implantes de hidroxiapatita foram colocados sob pressão manual nos orifícios correspondentes, controle positivo no orifício proximal, amostra experimental no orifício central e o controle negativo no orifício distal foi mantido sem implante (Figura 8), em seguida foi realizado aproximação dos planos cirúrgicos com sutura no padrão Sultan com fio de nylon monofilamentado, preto 5-0 agulhado (Technofio®). Os animais foram medicados no pós-operatório com Cloridrato de Tramadol (Cronidor 2%® - Agener União Saúde Animal) 3mg/kg/bid/IM/3dias; Dipirona sódica (D-500® - Fort dodge) 25mg/kg/bid/IM/3dias; Meloxicam (Maxican® - Ouro fino) 0,1mg/kg/sid/IM/3dias e Enrofloxacin (Flobiotic 5%® - Syntec) 5mg/kg/bid/IM/5dias, após 7 dias do procedimento cirúrgico foram retirados os pontos, não houve intercorrências com a fase de cicatrização das feridas cirúrgicas.

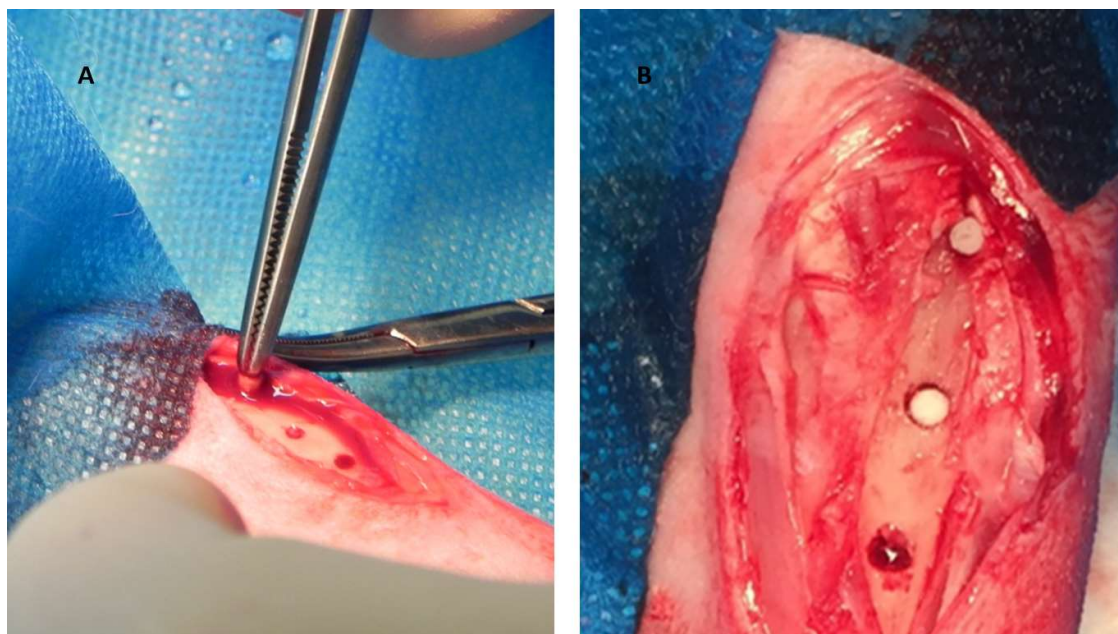


Figura 8 - Implantação do biomaterial

As imagens 8A e B representam respectivamente a colocação dos implantes sob pressão nos orifícios da tíbia do coelho e os implantes controle positivo e amostra experimental já implantados na tíbia do coelho e o terceiro orifício vazio do controle negativo.

4.9. REALIZAÇÃO DAS RADIOGRAFIAS

Após o procedimento cirúrgico, com os animais ainda sedados foram realizadas as radiografias das tíbias direita e esquerda em duas projeções: crânio caudal e médio lateral (Figura 9), com um aparelho de Raios-X digital portátil (Atal-9 DR[®]). A ampola dos Raios-X foi mantida a uma distância de 63 cm da superfície radiografada com incidência radiográfica de 67 Kv e 1,6 mAs, esse dia foi considerado o dia zero (D0) da análise radiográfica. O acompanhamento radiográfico foi feito após 14 (D14) e 28 (D28) dias, no D14 os animais não estavam sob efeito de sedativo. No D28 foi realizada a radiografia, após a sedação para a realização da Morte Indolor Induzida (MII).



Figura 9 - Exame radiográfico

As figuras 9A e 9B representam respectivamente os coelhos sendo radiografados nas projeções médio lateral e crânio caudal no pós-operatório imediato. Os pontos de *laser* presentes nas imagens determinam a distância da ampola dos Raios-X até a superfície da tíbia do coelho.

4.10. MORTE INDOLOR INDUZIDA (MII) E REMOÇÃO DOS ESPÉCIMES

Os animais foram submetidos ao procedimento de MII após 28 dias da implantação dos implantes, seguindo o protocolo de sedação pré-anestésica com 0,75mg/kg/IM de Acepromazina (Acepran® - Vetnil receita de campeões). Após 10 minutos foi realizado o acesso venoso na veia cefálica e administrado 150mg/kg/intravenoso (IV) de Tiopental, seguido de Kcl.

Para remoção das amostras experimentais e controles, foi realizado novamente a incisão cutânea com lâmina de bisturi N°15 acoplada ao cabo de bisturi, seguida de divulsão dos tecidos subcutâneo e muscular na face medial da tíbia, com o objetivo de expor o tecido ósseo e os respectivos implantes na região operada (Figura 10). Com um disco flexível de aço

diamantado (Discoflex[®] - KG Sorensen) com 22 mm de diâmetro, montado em mandril para peça reta de micromotor elétrico (Beltec[®]) e irrigação constante com solução fisiológica 0,9%, seccionando as tíbias com uma margem de segurança de aproximadamente 3 mm de distância dos orifícios submetidos as implantações.

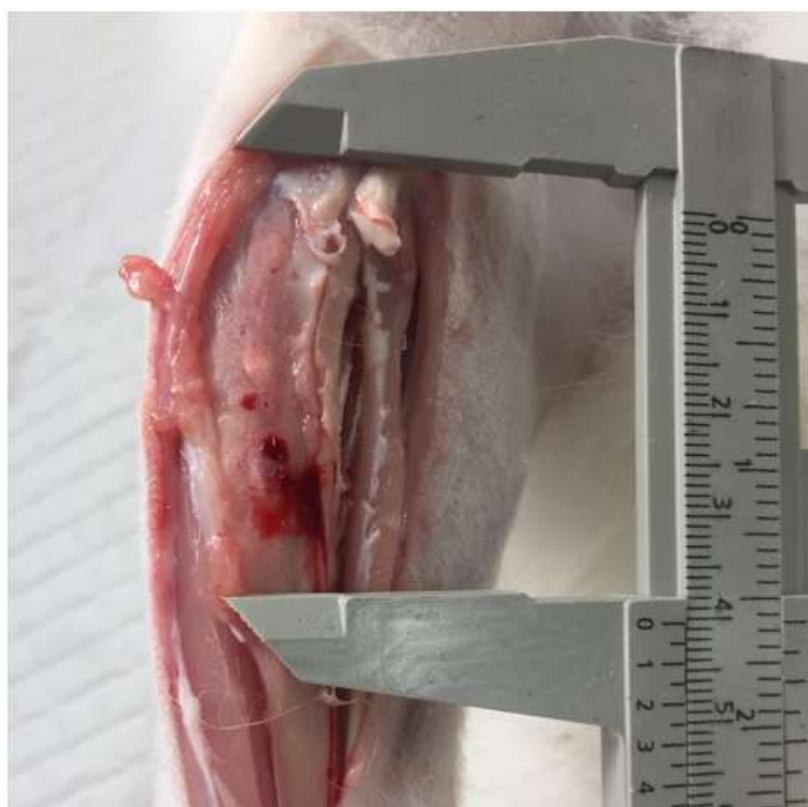


Figura 10 - Remoção dos espécimes

A imagem representa a exposição cirúrgica da área de interesse para remoção dos implantes após MII.

Para realização das marcações na tíbia que delimitaram os 3 mm de distância do corte em relação as paredes dos controles, foi utilizado o paquímetro e caneta Faber-Castel[®] CD MARKER preta com ponta média (Figuras 11).

Cada amostra retirada foi lavada em solução fisiológica 0,9% e imediatamente colocada em tubo Falcon (Sarstedt®) de 50 ml com formol a 10%. Os tubos foram identificados com o número das amostras referente ao animal que foi coletado, tibia coletada e se a amostra era experimental, controle positivo ou negativo (Figura 12).

Todo experimento foi detalhado em uma planilha experimental, contendo data do procedimento, fármacos utilizados, tempo cirúrgico, intercorrências e data da MII (Apêndice 6).

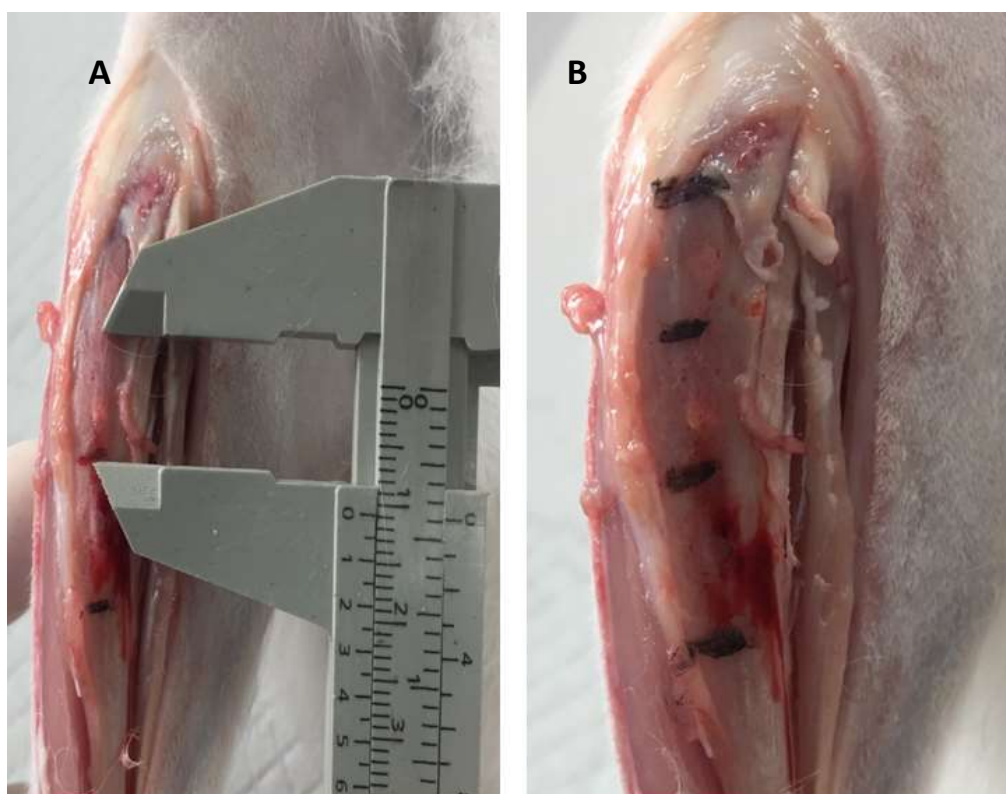


Figura 11 - Mensuração dos espécimes

As imagens 11 A e B representam as mensurações e marcações das áreas de corte para coleta dos espécimes.

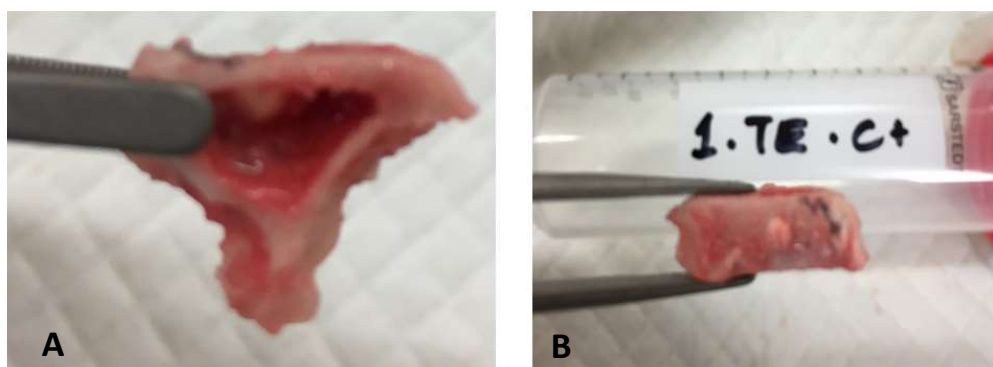


Figura 12 - Amostras coletadas

As imagens 12A e B representam respectivamente os espécimes já separados e lavados com solução fisiológica, prontos para serem envasados no tubo Falcon com formol a 10%.

4.11. PROCESSAMENTO LABORATORIAL DAS AMOSTRAS: HISTOLOGIA

As amostras não foram desmineralizadas, e encontravam-se fixadas em formol a 10% desta forma foi dada sequência na segunda etapa do protocolo para inclusão de tecido ósseo em resina para microscopia. Nessa etapa foi realizada a desidratação das amostras deixando-as mergulhadas em álcool 70° por 24 horas, depois mais 24 horas em álcool 90° e em seguida foram realizadas mais três etapas, deixando as amostras mergulhadas em álcool 100° por 24, 48 e 56 horas respectivamente, com troca de recipientes a cada intervalo de tempo. Após a desidratação foi realizada a diafanização e as peças ficaram mergulhadas em Xilol por 24 horas e na segunda fase trocada de recipiente e mantida mais 48 horas também em Xilol. Após essa etapa, a inclusão de resina nas amostras foi realizada. As amostras foram colocadas em um frasco de vidro com tampa de aproximadamente 20 ml, com uma camada de resina de mais ou menos dois mm no fundo do frasco para a amostra não ficar em contato direto com o vidro. Na próxima etapa

foi realizado o preparo e penetração pela resina, as amostras foram cobertas com uma solução de 15% de Dibutilftalato e 85% de Metilmetacrilato (solução A) por 5 dias na geladeira, após esse período as amostras foram retiradas dessa solução e colocadas em uma solução composta pela solução A adicionada de 1% de peróxido de benzoila e mantida por cinco dias em geladeira. Após esse período, as amostras foram retiradas dessa solução e colocadas em uma solução composta pela solução A, acrescida de 3% de peróxido de benzoila e mantida por mais 5 dias em geladeira. Na última fase dessa etapa, as amostras foram mantidas em estufa a 37°C por 48 horas. Os frascos de vidro foram quebrados e as amostras emblocadas na resina foram submetidas a cortes retangulares de 2,5 cm de comprimento por dois de altura. Os blocos foram identificados com caneta Faber-Castel® CD MARKER preta com ponta média.

Os espécimes emblocados foram submetidos ao corte com serra de ourives de 0,5mm acoplada à um arco de serra. Para serragem, os blocos ficaram presos à um torno morsa de bancada (Figura 13) para dar precisão aos cortes. Os cortes foram realizados no sentido transversal do osso sob irrigação constante, compondo as duas corticais ósseas e o implante e nas amostras com o orifício vazio foram realizados no centro do orifício, também na transversal compondo as duas corticais ósseas. A espessura dos cortes foram de aproximadamente 5µm (Figura 14), o material cortado foi submetido ao lixamento com lixas d'água nas granulações 1000, 1500, 2000 e 2500 respectivamente, e finalizado o processo com lixa d'água 4000 (Figura 15), o material foi colado em uma lâmina acrílica com Cianocrilato, Super Bonder® (Figura 16), que após colado nas lâminas, o material foi polido na lixa d'água 4000.



Figura 13 - Corte do material

A imagem representa o material emblocado, preso no torno de morsa e sendo cortado com a serra de ourives.

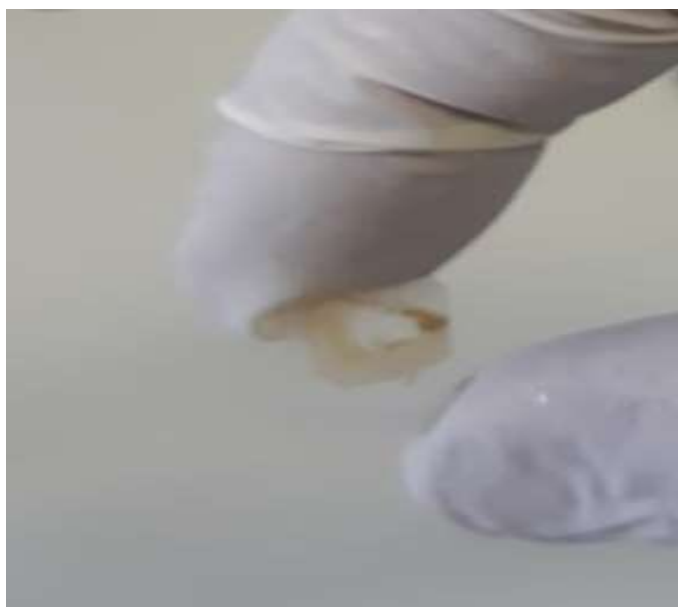


Figura 14 - Material cortado

A imagem representa o material após ser cortado do bloco com aproximadamente $5\mu\text{m}$ de espessura.



Figura 15 - Material sendo lixado

A imagem representa o material sendo lixado em lixa d'água gramatura 2500.

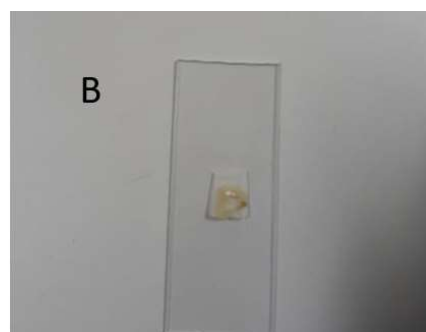


Figura 16 - Colagem do material na lâmina

A imagem 16A representa o material sendo colado na lâmina de acrílico e a 16B material já colado.

Com o material colado e após as lâminas prontas, as mesmas foram coradas com *Hematoxilina-Eosina* (HE) (Figuras 17, 18, 19, 20 e 21).

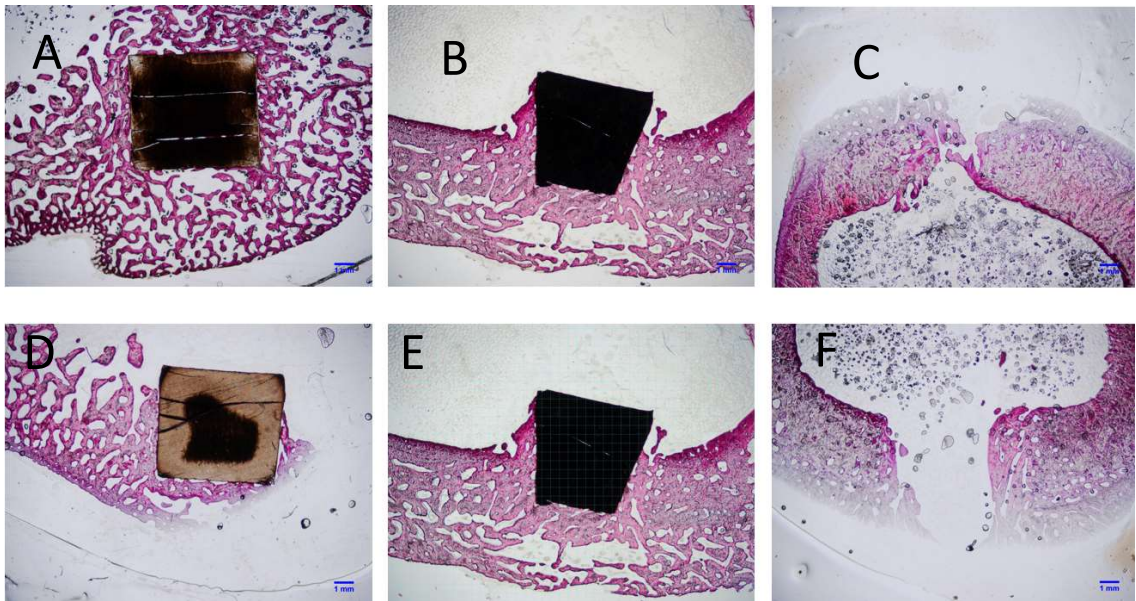


Figura 17 - Lâminas de histologia do coelho 10

As imagens A, B, C correspondem respectivamente à histologia dos biomateriais controle positivo, amostra experimental e controle negativo implantados nas tíbia direita do coelho 10, as imagens D, E e F correspondem respectivamente à histologia dos biomateriais controle positivo, amostra experimental e controle negativo implantados nas tíbia esquerda do coelho 10.

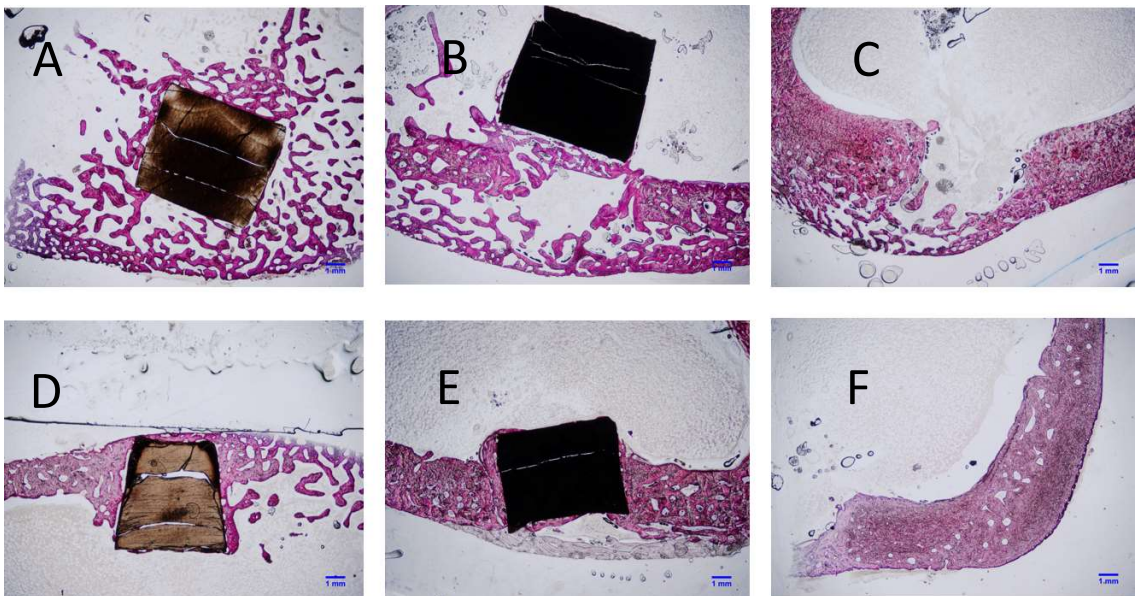


Figura 18 - Lâminas de histologia do coelho 11

As imagens A, B, C correspondem respectivamente à histologia dos biomateriais controle positivo, amostra experimental e controle negativo implantados nas tíbia direita do coelho 11, as imagens D, E e F correspondem respectivamente à histologia dos biomateriais controle positivo, amostra experimental e controle negativo implantados nas tíbia esquerda do coelho 11.

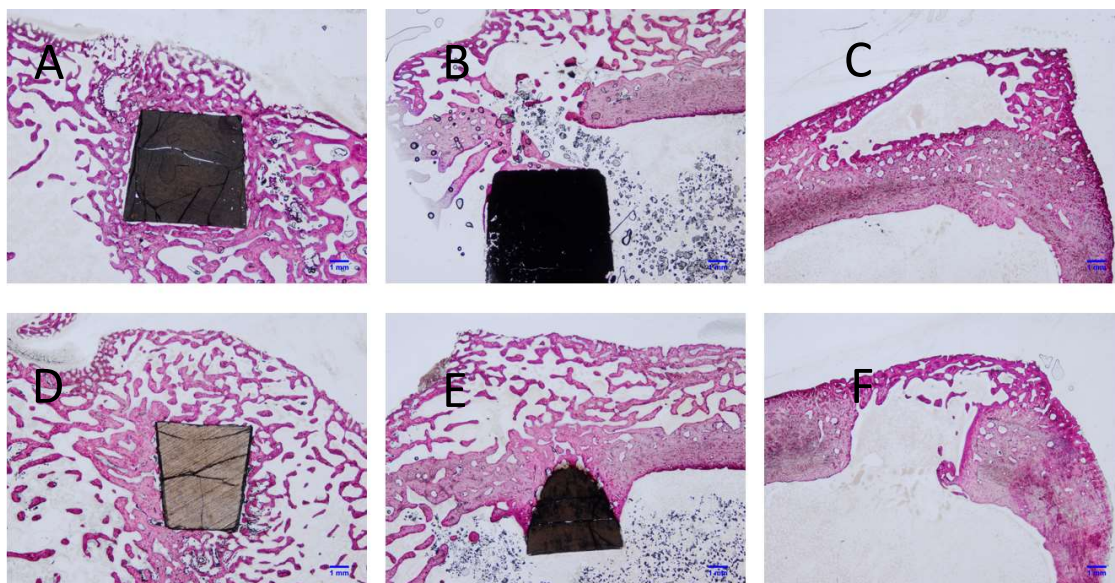


Figura 19 - Lâminas de histologia do coelho 16

As imagens A, B, C correspondem respectivamente à histologia dos biomateriais controle positivo, amostra experimental e controle negativo implantados nas tíbia direita do coelho 16, as imagens D, E e F correspondem respectivamente à histologia dos biomateriais controle positivo, amostra experimental e controle negativo implantados nas tíbia esquerda do coelho 16.

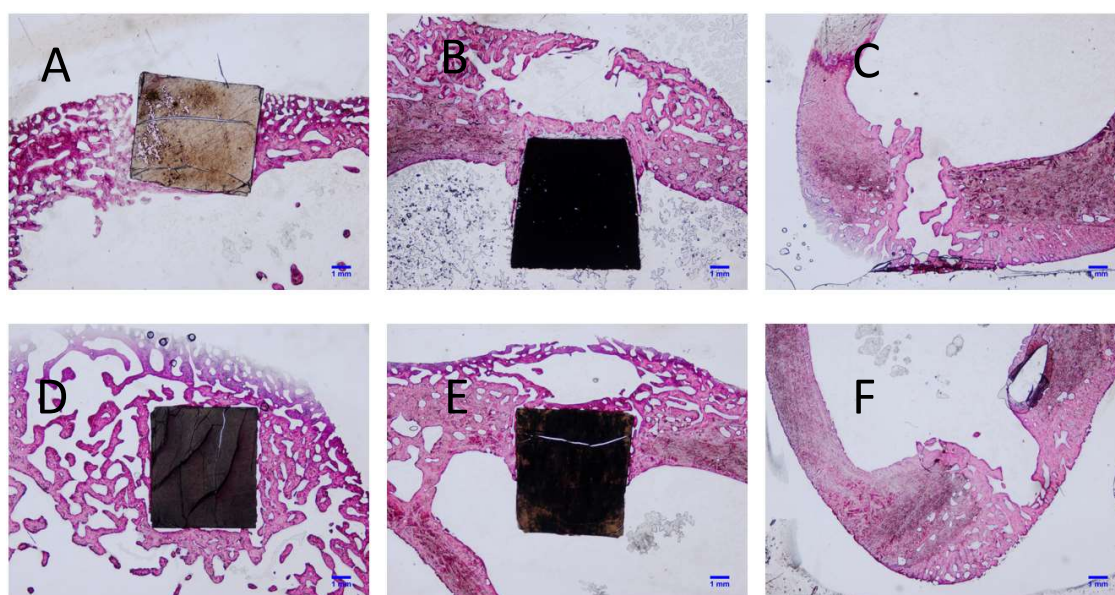


Figura 20 - Lâminas de histologia do coelho 20

As imagens A, B, C correspondem respectivamente à histologia dos biomateriais controle positivo, amostra experimental e controle negativo implantados nas tíbia direita do coelho 20, as imagens D, E e F correspondem respectivamente à histologia dos biomateriais controle positivo, amostra experimental e controle negativo implantados nas tíbia esquerda do coelho 20.

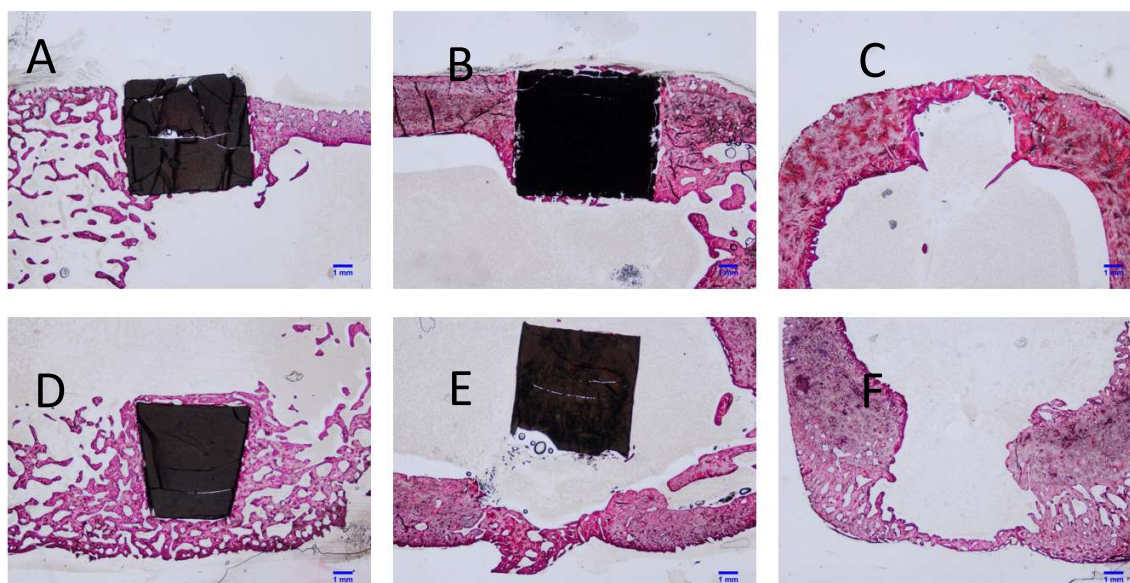


Figura 21 - Lâminas de histologia do coelho 21

As imagens A, B, C correspondem respectivamente à histologia dos biomateriais controle positivo, amostra experimental e controle negativo implantados nas tíbia direita do coelho 21, as imagens D, E e F correspondem respectivamente à histologia dos biomateriais controle positivo, amostra experimental e controle negativo implantados nas tíbia esquerda do coelho 21.

A análise histológica de proliferação óssea foi avaliada com auxílio de um diagrama quadriculado de 25 quadrados por 0,2 mm cada, com interseções sobreposto nas imagens das amostras experimentais, dos controles positivos e controles negativos, representando a área de 100% (Figura 22). As interseções sob qual o tecido ósseo estava em contato com o implante foram contadas, nos controles negativos e a área delimitada foi entre o osso e o defeito cirúrgico. A porcentagem de osso formado foi calculada seguindo a seguinte equação: número de interseção óssea x 100/pontos totais contados. Todas as análises foram realizadas usando o software analisador de imagens (NIS Elements BR, Nikon Instruments Ink) por um examinador treinado, calibrado e cego por meio do método de coeficiente de concordância proposto em 1989 por Lawrence I-Kuei Lin.

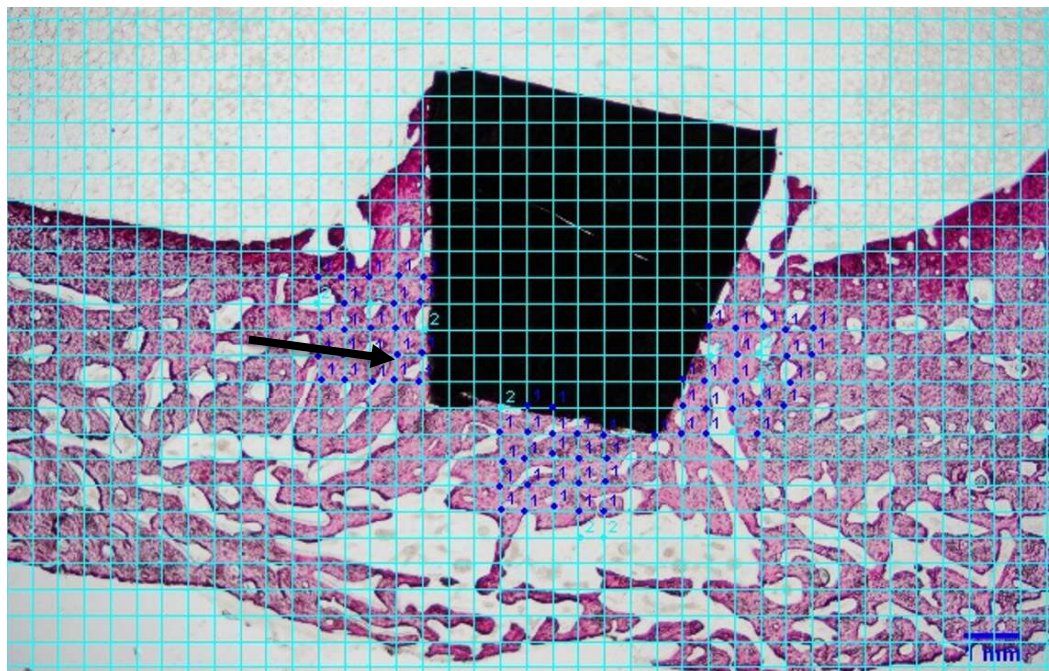


Figura 22 - Análise histológica

A imagem representa a contagem de osso neo-formado em contato com o implante De hidroxiapatita na amostra 10 – TDA. Os quadriculados com números representam a presença de osso neo formado (seta).

4.12. PROCESSAMENTO LABORATORIAL DAS AMOSTRAS: *MicroCT*

Para análise de MicroCT foram selecionadas 24 amostras de forma aleatória. As amostras selecionadas foram dos coelhos identificados com os números 13, 23, 24 e 27, as amostras com identificação 13 e 24 pertenciam ao grupo AM e as amostras 23 e 27 ao grupo US.

As análises foram realizadas no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) – Programa de Engenharia Nuclear (PEN), localizado no COPPE/Federal Universidade do Rio de Janeiro (UFRJ) sob orientação do Professor Ricardo Tadeu Lopes e co-orientação da Pós Doutoranda Aline Saddock.

As amostras foram analisadas pelo equipamento Skyscan/Bruker High Energy model 1173 system com Tensão: 70 kV, Corrente: 114 μ A, Matriz: 2240 x 2240, Filtro: 1,0 mm de Al, Tamanho de pixel: 7,83 μ m (Figura 23).



Figura 23 - Equipamento *Skyscan*

A imagem representa o equipamento utilizado para análise das imagens.

Na análise MicroCT as amostras foram submetidas à duas análises. Na análise I foi selecionado em vermelho uma região de interesse (ROI – “Region of Interest”) do neo osso formado ao redor do implante colocado, nas amostras controle positivo e amostra experimental, e no controle negativo foi selecionada toda região com o neo osso formado dentro do orifício de 2,5 mm (Figura 24), com o objetivo de quantificar o volume do neo osso. Na análise II foi selecionado um ROI com formato de anel contendo 0,5 mm de altura e 0,1 mm de espessura, ao redor dos implantes nas amostras controle positivo e experimental e na transição do neo osso e osso pré-existente nas amostras controle negativo, padronizando todas as áreas analisadas, com o objetivo de quantificar o volume percentual de poros dentro do neo osso (Figura 25).

As imagens foram reconstruídas no *software Nrecon* e reposicionadas a partir do programa *DataViewer*, para obter a vista mais adequada para uma

inspeção detalhada, as análises foram realizadas de forma quantitativa utilizando o programa *CTAnalysis* e o perfil 3D obtido a partir do programa *CTvox*.

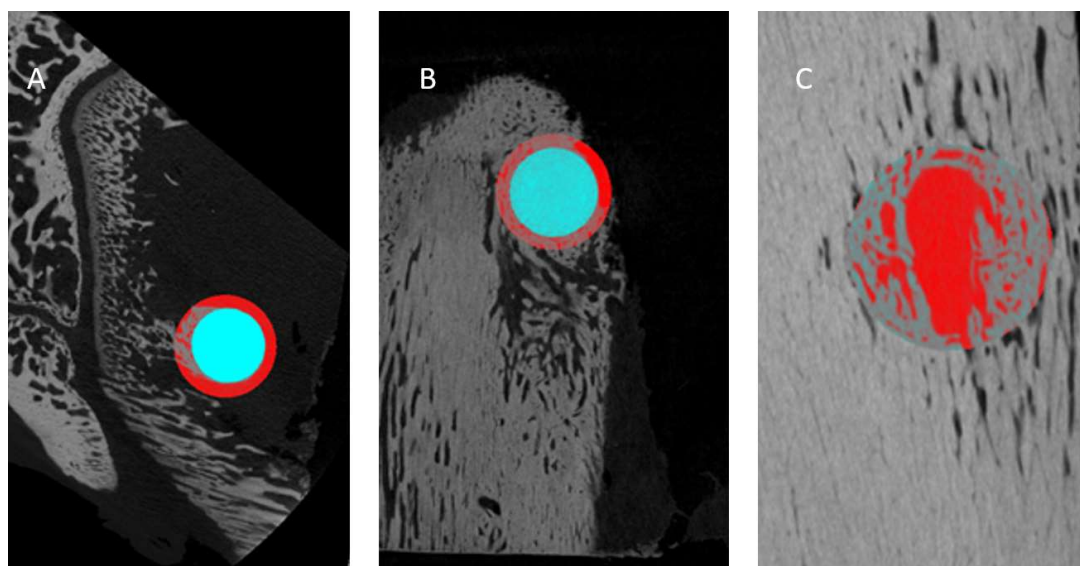


Figura 24 - Análise I Micro CT

As imagens A, B e C representam as áreas de interesse (ROI) traçadas nas amostras 23 TEC+, TEA e TEC-.

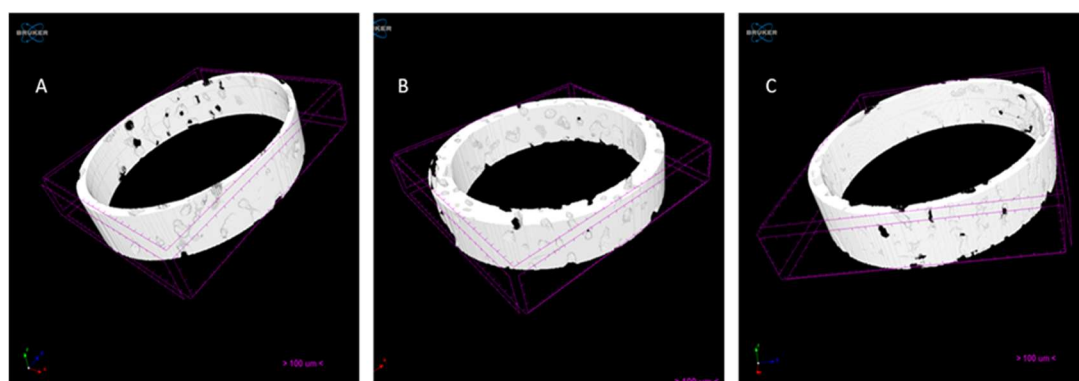


Figura 25 - Análise II Micro CT

As imagens 20 A, B e C representam o ROI em forma de anel de 0,5 mm de altura e 0,1 mm de espessura, ao redor do implante.

5. RESULTADOS

RESULTADOS

5.1 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

A avaliação radiográfica foi somente visual, como demonstrados nas Figuras 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35 e suas respectivas subdivisões por letras.

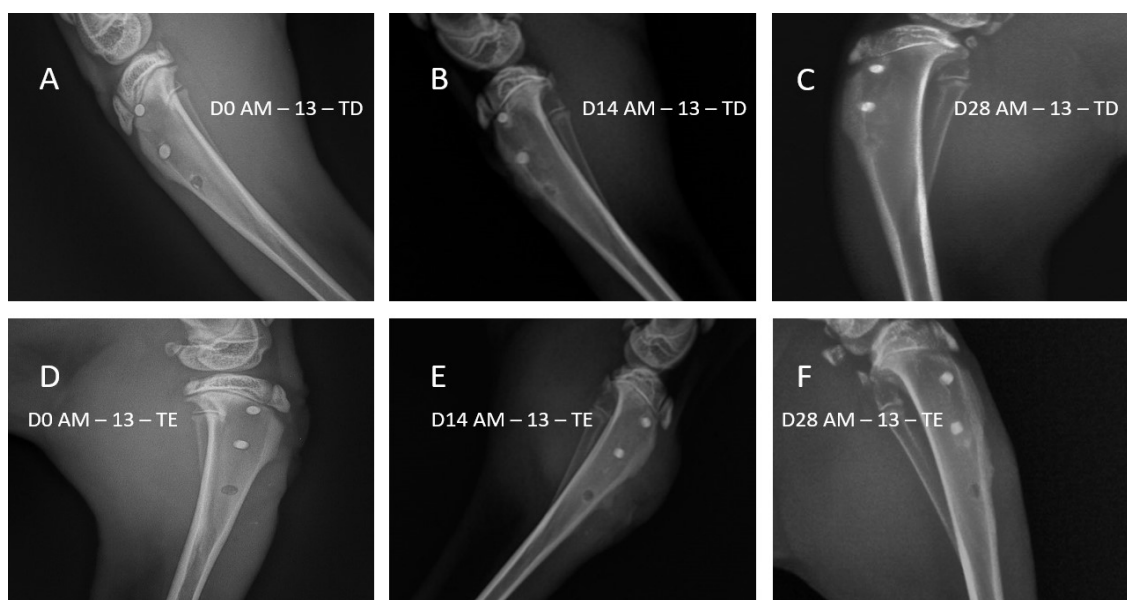


Figura 26 - Radiografias coelho 13, projeção ML

As imagens A, B e C representam radiografias da tíbia direita do coelho de número 13 na projeção ML nos dias zero, 14 e 28 respectivamente, após implantação dos biomateriais. As letras D, E e F representam radiografias da tíbia esquerda do coelho de número 13 na projeção ML nos dias zero, 14 e 28 respectivamente, após implantação dos biomateriais.

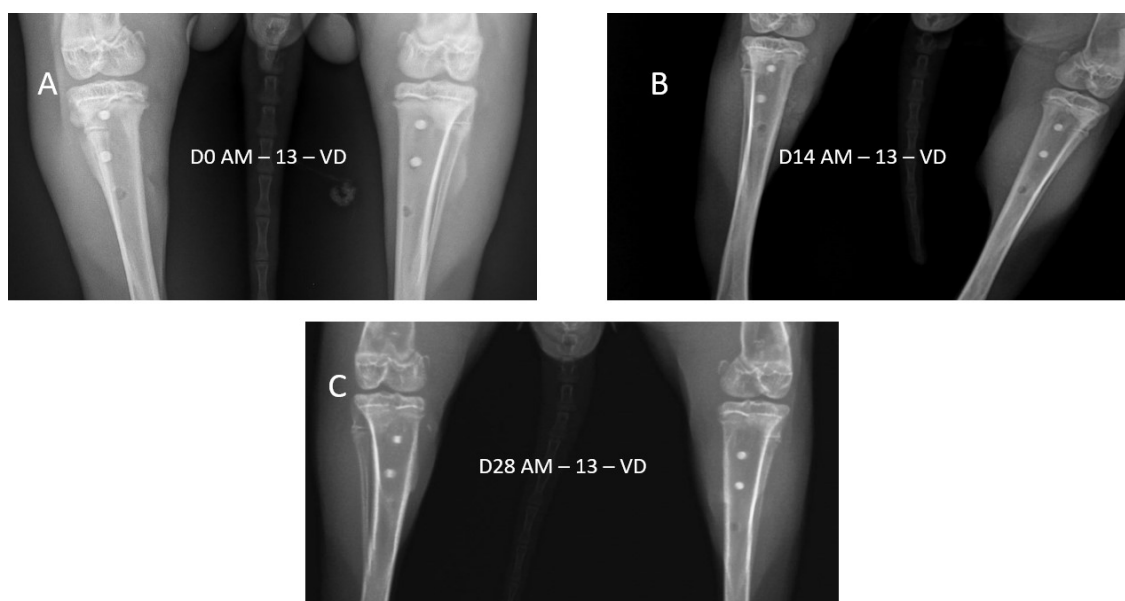


Figura 27 - Radiografias coelho 13, projeção VD

As imagens A, B e C representam radiografias das tíbias direita e esquerda do coelho 13, na projeção VD nos dias zero, 14 e 28 respectivamente, após implantação dos biomateriais.

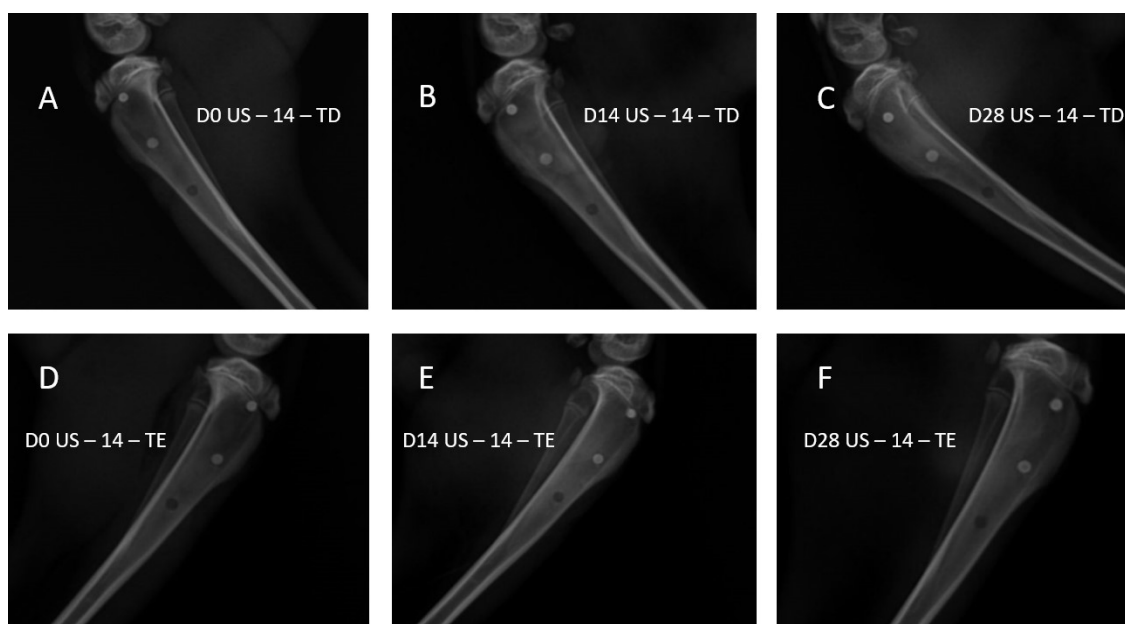


Figura 28 - Radiografias coelho, 14 projeção ML

As imagens A, B e C representam radiografias da tíbia direita do coelho de número 14 na projeção ML nos dias zero, 14 e 28 respectivamente, após implantação dos biomateriais. As letras D, E e F representam radiografias da tíbia esquerda do coelho de número 14 na projeção ML nos dias zero, 14 e 28 respectivamente, após implantação dos biomateriais.

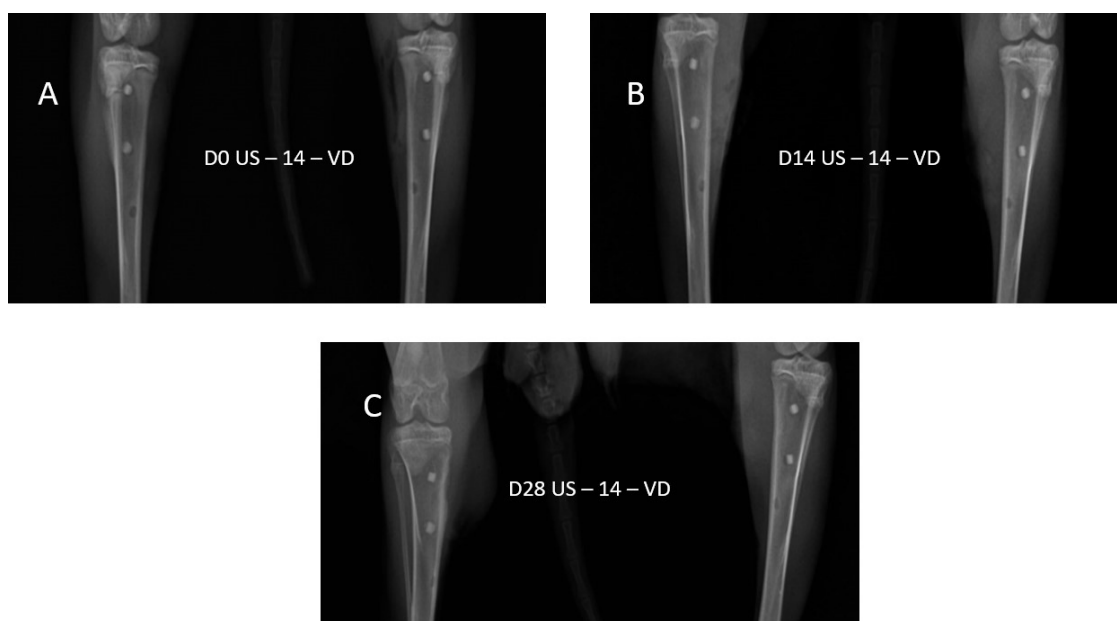


Figura 29 - Radiografias coelho 14, projeção VD

As imagens A, B e C representam radiografias das tíbias direita e esquerda do coelho 13, na projeção VD nos dias zero, 14 e 28 respectivamente, após implantação dos biomateriais.

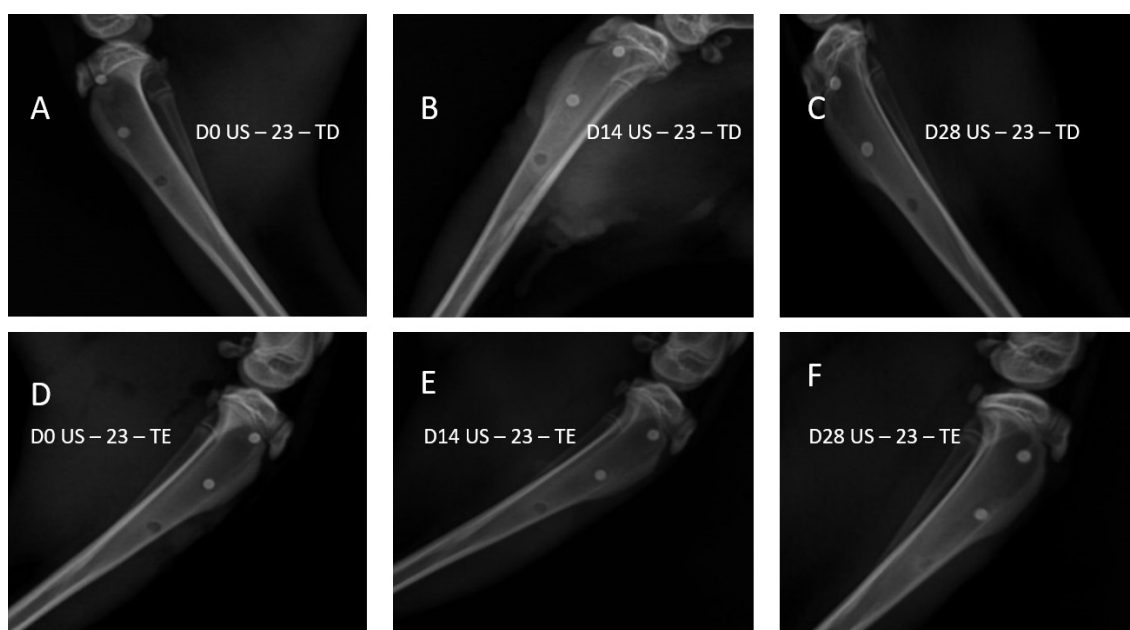


Figura 30 - Radiografias coelho 23, projeção ML

As imagens A, B e C representam radiografias da tíbia direita do coelho de número 23 na projeção ML nos dias zero, 14 e 28 respectivamente, após implantação dos biomateriais. As letras D, E e F representam radiografias da tíbia esquerda do coelho de número 23 na projeção ML nos dias zero, 14 e 28 respectivamente, após implantação dos biomateriais.

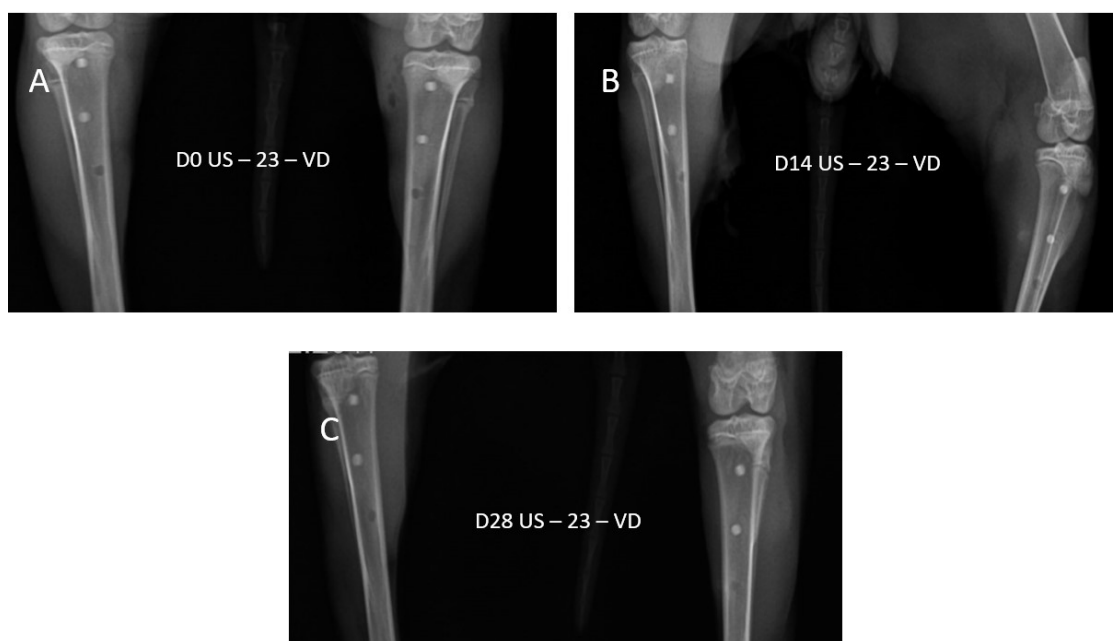


Figura 31 - Radiografias coelho 23, projeção VD

As imagens A, B e C representam os Raios - X das tíbias direita e esquerda do coelho 23, na projeção VD nos dias zero, 14 e 28 respectivamente, após implantação dos biomateriais.

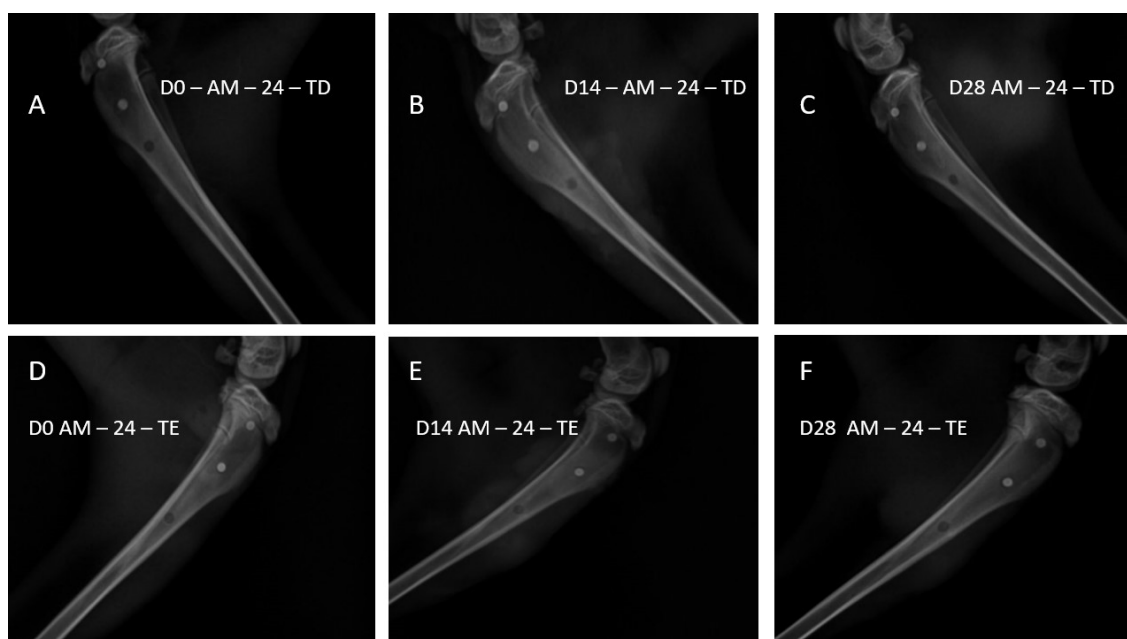


Figura 32 - Radiografias coelho 24, projeção ML

As imagens A, B e C representam o radiografias da tíbia direita do coelho de número 24 na projeção ML nos dias zero, 14 e 28 respectivamente, após implantação dos biomateriais. As letras D, E e F representam radiografias da tíbia esquerda do coelho de número 24 na projeção ML nos dias zero, 14 e 28 respectivamente, após implantação dos biomateriais.

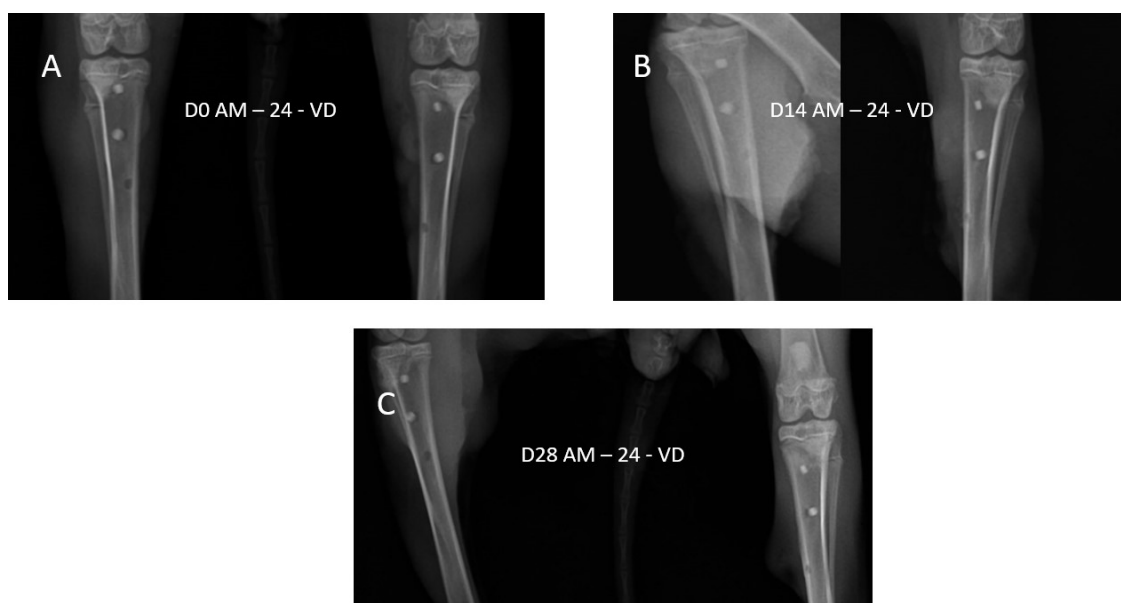


Figura 33 - Radiografias coelho 24, projeção VD

As imagens A, B e C representam radiografias das tíbias direita e esquerda do coelho 24, na projeção VD nos dias zero, 14 e 28 respectivamente, após implantação dos biomateriais.

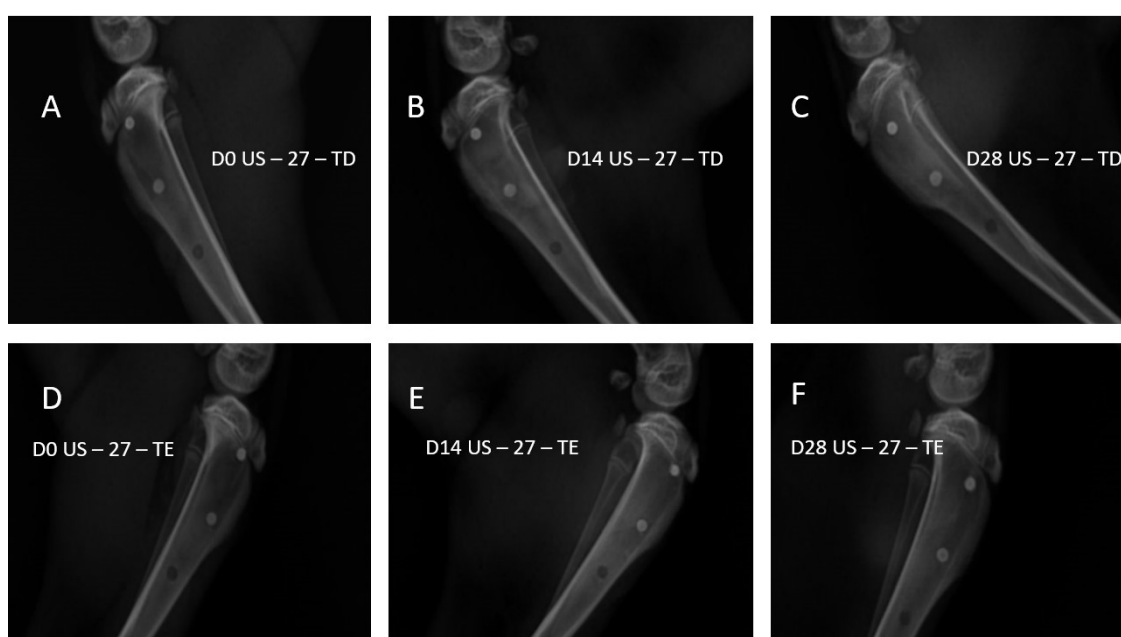


Figura 34 - Radiografias 27, projeção ML

As imagens A, B e C representam radiografias da tíbia direita do coelho de número 27 na projeção ML nos dias zero, 14 e 28 respectivamente, após implantação dos biomateriais. As letras D, E e F representam radiografias da tíbia esquerda do coelho de número 27 na projeção ML nos dias zero, 14 e 28 respectivamente, após implantação dos biomateriais.

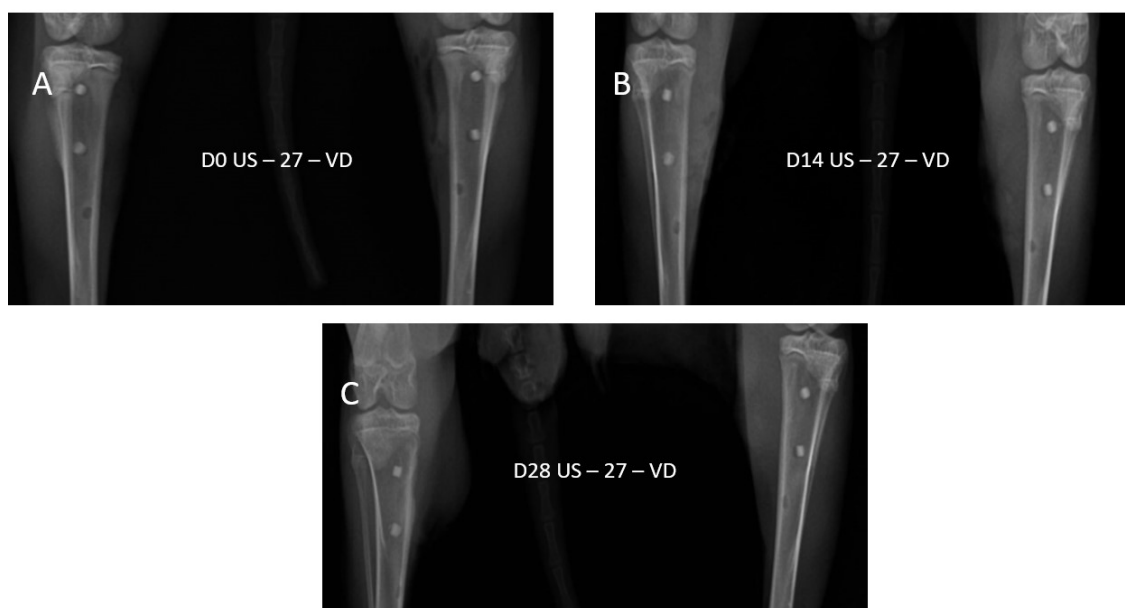


Figura 35 - Radiografias coelho 27, projeção VD.

As imagens A, B e C representam radiografias das tíbias direita e esquerda do coelho 27, na projeção VD nos dias zero, 14 e 28 respectivamente, após implantação dos biomateriais.

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os dados da análise histológica estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Análise histológica

Lâmina	Pontos totais	Pontos com osso	Porcentagem de osso formado
1TDC ⁺¹	75	59	78,67
1TEC ⁺²	50	43	86,00
1TDA ³	50	36	72,00
1TEA ⁴	25	18	72,00
1TDC ⁻⁵	25	20	80,00
1TEC ⁻⁶	25	18	72,00
2TDC ⁺	50	46	92,00
2TEC ⁺	50	26	52,00
2TDA	75	53	70,67
2TEA			
2TDC ⁻	25	20	80,00

2TEC-			
3TDC+	50	31	62,00
3TEC+	75	52	69,33
3TDA	25	16	64,00
3TEA	25	18	72,00
3TDC-	25	16	64,00
3TEC-	50	46	92,00
4TDC+	50	36	72,00
4TEC+			
4TDA	75	32	42,67
4TEA			
4TDC-	50	39	78,00
4TEC-	50	44	88,00
5TDC+	33	25	75,76
5TEC+			
5TDA	50	44	88,00
5TEA	75	53	70,67
5TDC-			
5TEC-	75	54	72,00
6TDC+			
6TEC+	100	65	65,00
6TDA	75	49	65,33
6TEA	75	53	70,67
6TDC-	50	48	96,00
6TEC-	75	49	65,33
7TDC+	100	72	72,00
7TEC+	75	49	65,33
7TDA	50	47	94,00
7TEA	75	65	86,67
7TDC-	25	24	96,00
7TEC-			
8TDC+	100	83	83,00
8TEC+	100	61	61,00
8TDA	50	36	72,00
8TEA	100	74	74,00

8TDC-			
8TEC-	25	20	80,00
9TDC+	25	16	64,00
9TEC+			
9TDA	75	67	89,33
9TEA	75	51	68,00
9TDC-	25	20	80,00
9TEC-	25	17	68,00
10TDC+	100	63	63,00
10TEC+	25	19	76,00
10TDA	75	53	70,67
10TEA	75	65	86,67
10TDC-	25	11	44,00
10TEC-	25	22	88,00
11TDC+	100	49	49,00
11TEC+	75	43	57,33
11TDA	75	58	77,33
11TEA	75	50	66,67
11TDC-	25	19	76,00
11TEC-	25	23	92,00
12TDC+	100	59	59,00
12TEC+	100	60	60,00
12TDA	75	56	74,67
12TEA	75	56	74,67
12TDC-	25	22	88,00
12TEC-	25	21	84,00
14TDC+	75	61	81,33
14TEC+	75	55	73,33
14TDA	75	67	89,33
14TEA	75	54	72,00
14TDC-	25	19	76,00
14TEC-	25	19	76,00
15TDC+	100	81	81,00
15TEC+	75	52	69,33
15TDA	75	56	74,67

15TEA	75	64	85,33
15TDC-	25	17	68,00
15TEC-	25	22	88,00
16TDC+	100	78	78,00
16TEC+	100	23	23,00
16TDA	75	54	72,00
16TEA	75	53	70,67
16TDC-	25	23	92,00
16TEC-	25	19	76,00
17TDC+	100	55	55,00
17TEC+	100	51	51,00
17TDA	75	59	78,67
17TEA	75	38	50,67
17TDC-	25	21	84,00
17TEC-	25	23	92,00
18TDC+	100	55	55,00
18TEC+	100	55	55,00
18TDA	50	40	80,00
18TEA	25	18	72,00
18TDC-	25	23	92,00
18TEC-	25	13	52,00
19TDC+	100	72	72,00
19TEC+			
19TDA	75	37	49,33
19TEA	100	79	79,00
19TDC-	25	18	72,00
19TEC-	25	17	68,00
20TDC+	75	51	68,00
20TEC+	100	70	70,00
20TDA	75	47	62,67
20TEA	75	51	68,00
20TDC-	25	15	60,00
20TEC-	25	20	80,00
21TDC+	50	28	56,00
21TEC+	100	51	51,00

21TDA	75	50	66,67
21TEA	75	64	85,33
21TDC-	25	12	48,00
21TEC-	25	18	72,00
22TDC+	75	52	69,33
22TEC+			
22TDA			
22TEA	75	64	85,33
22TDC-	25	14	56,00
22TEC-	25	21	84,00
25TDC+	50	25	50,00
25TEC+	100	35	35,00
25TDA			
25TEA			
25TDC-	25	21	84,00
25TEC-	25	11	44,00
26TDC+	75	50	66,67
26TEC+	100	58	58,00
26TDA	75	43	57,33
26TEA	75	59	78,67
26TDC-	25	18	72,00
26TEC-	25	21	84,00
28TDC+			
28TEC+			
28TDA	75	28	37,33
28TEA	75	47	62,67
28TDC-	25	10	40,00
28TEC-	39	37	94,87

1- TDC+ - Tíbia direita controle positivo; 2- TEC+ - Tíbia esquerda controle positivo; 3- TDA - Tíbia direita amostra; 4- TEA - Tíbia esquerda amostra experimental; 5- TDC- - Tíbia direita controle negativo; 6- TEC- - Tíbia esquerda controle negativo. As amostras destacadas em vermelho não entraram na contagem devido essas terem sido destacadas do osso e impossibilitar a contagem na área de contado.

Os dados obtidos foram analisados com o emprego do programa estatístico *Graphpad Prism 6.01* e os resultados expressos com média \pm desvio padrão. Para comparação das médias entre os grupos foi empregado o método de Análise de Variância (ANOVA) de Duplo Fator, seguido do teste de *Tukey*. O nível de significância foi $p < 0,05$.

Os dados da análise estatística da histologia, estão representados na Figura 36.

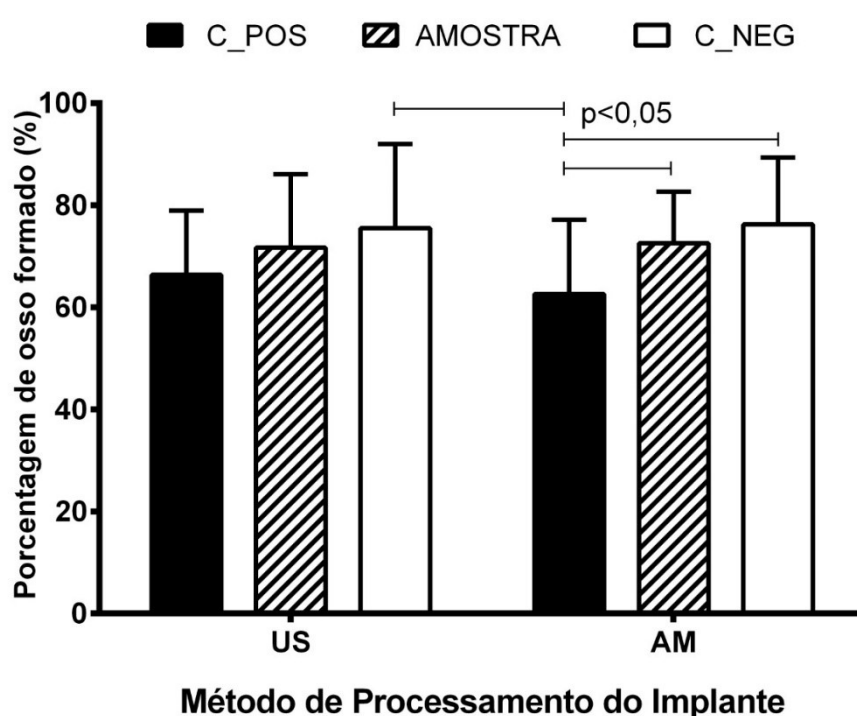


Figura 36 - Análise estatística da histologia

Análise comparativa entre os grupos controle positivo, amostra experimental e controle negativo e entre os grupos das amostras sinterizadas por agitação magnética (AM) e sonda ultrassônica (US).

De acordo com a análise estatística da histologia, as amostras do controle negativo foram superiores quanto a formação óssea, tanto no grupo das amostras AM quanto no grupo US, também foi possível identificar que

houve maior crescimento ósseo nas amostras experimentais quando comparadas às amostras controle positivo, em ambos os grupos AM e US, o crescimento ósseo foi maior no grupo US comparado ao grupo AM.

5.3 ANÁLISE DE MICROTOMOGRAFIA (MicroCT):

Os dados da análise de MicroCT estão representados na tabela 3.

Tabela 3 - Análise MicroCT.

Amostra	Análise I $V_{\text{osso}}/V_{\text{Total}}$	Análise II $V_{\text{poros}}/V_{\text{Anel}}$
13TDA ¹	25,8%	26,7%
13TDC ⁺²	19,6%	47,4%
13TDC ⁻³	40,8%	14,7%
13TEA ⁴	25,1%	21,6%
13TEC ⁺⁵	18,5%	32,6%
13TEC ⁻⁶	31,4%	12,5%
23TDA	22,1%	28,3%
23TDC ⁺	19,9%	32,4%
23TDC ⁻	28,1%	23,0%
23TEA	31,5%	21,7%
23TEC ⁺	24,4%	23,5%
23TEC ⁻	41,0%	21,0%
24TDA	33,3%	36,8%
24TDC ⁺	25,8%	44,4%

24TDC-	39,5%	14,3%
24TEA	36,6%	27,3%
24TEC+	23,3%	31,9%
24TEC-	30,6%	20,2%
27TDA	26,6%	28,8%
27TDC+	17,8%	32,1%
27TDC-	33,3%	16,4%
27TEA	19,9%	22,3%
27TEC+	16,7%	32,8%
27TEC-	31,5%	18,2%

1- TDC+ – Tíbia direita controle positivo; 2- TDA – Tíbia direita amostra experimental; 3- TDC- – Tíbia direita controle negativo; 4- TEC+ – Tíbia esquerda controle positivo; 5- TEA – Tíbia esquerda amostra experimental; 6- TEC- – Tíbia esquerda controle negativo.

Os dados obtidos foram analisados com o emprego do programa estatístico *Graphpad Prism* 6.01 e os resultados expressos com média \pm desvio padrão. Para comparação das médias entre os grupos foi empregado o método de Análise de Variância (ANOVA) de Duplo Fator, seguido do teste de *Tukey*. O nível de significância foi $p < 0,05$.

Os dados da análise estatística da MicroCT relacionado ao volume de osso e poros neo formados, estão representados nas Figura 37 e 38 respectivamente.

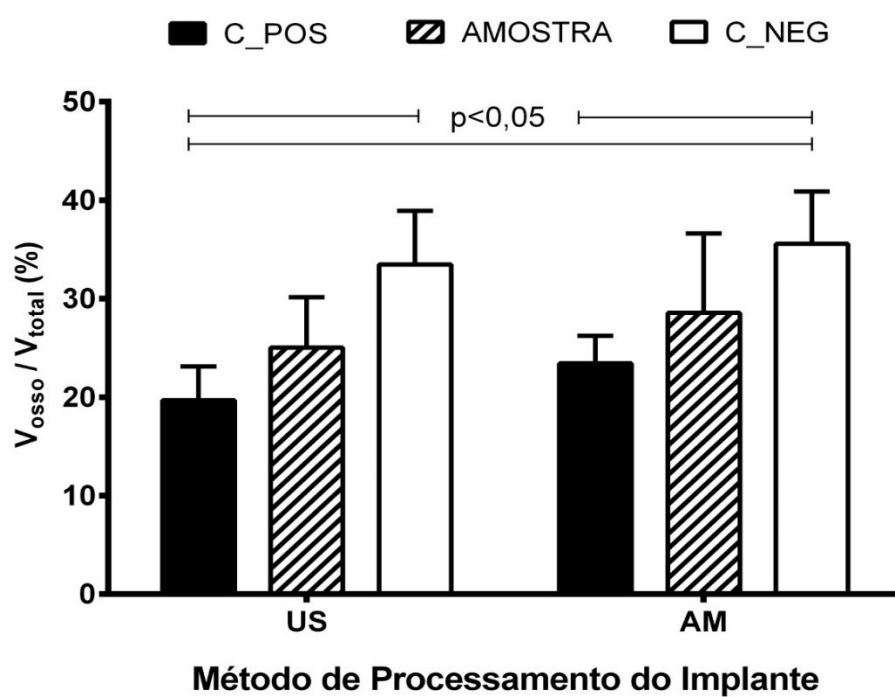


Figura 37 - Análise estatística do volume de osso neo formado

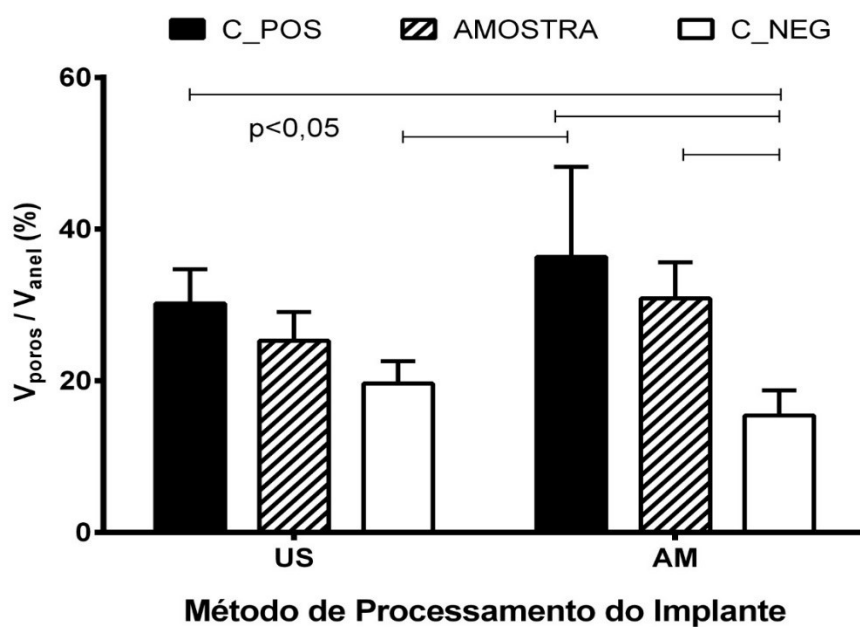


Figura 38 - Análise estatística do volume de poros no osso neo formado

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A Engenharia Tecidual (ET) é uma área interdisciplinar que utiliza de princípios da Engenharia com as técnicas da Biologia para regeneração de tecidos biológicos (SHALAK 1988, LANGER & VACANTI 1993), e tem como objetivo desenvolver substitutos que restauram, mantêm ou melhoram a função tecidual (LANGER & VACANTI, 1993). A ET foi descrita também por FONT TELLADO *et al.* 2015, como a área que busca mimetizar estruturalmente os tecidos ou órgãos, considerando suas propriedades intrínsecas e suas interfaces, até sua regeneração completa. As técnicas de ET surgiram na década de 30, com estudos realizados por Bissegli (1933) que implantou um polímero (*scaffold*) com células tumorais de ratos em um abdômen de um porco da índia e após 12 dias essas células permaneceram vivas. A qualidade, bem como as características do material utilizado para confecção dos *scaffolds*, como tamanho, material utilizado, quantidade e distribuição dos poros, assim como, sua resistência estão diretamente relacionados a adesão, proliferação, migração e diferenciação celular (SACHLOS & CZERNUSZKA, 2003). Os estudos de CHAN & LONG (2008) corroboraram com essas informações e afirmaram ainda, a necessidade da confecção dos *scaffolds* com materiais biocompatíveis. NICHOL & KHADEMHOSEINI, 2009 ainda consideraram como princípio, que a ET necessitava de uma estrutura (*scaffold*) que mimetizasse a arquitetura e a complexidade dos tecidos a fim de favorecer a micro vascularização, ligações celulares e morfologia específica dos tecidos. Nossos estudos, relevando os aspectos relatados pelos autores citados acima, consideram que a HA é um *scaffold* que apresentou as características de

biocompatibilidade e que sua macro e micro geometria poderá mimetizar a arquitetura e adequar a complexidade do tecido ósseo.

BUTLER et al. 2009 e DEMIRBAG et al. 2011 revelaram que o entendimento da biomecânica dos tecidos, células e elementos bioativos eram fatores importantes a considerar para a melhor abordagem da ET devido ao fato deles colaborarem para a indução da célula à sua função. Além disso, LANGER em 2000 e DUAILIBI et al., 2004, ressaltaram as vantagens que a ET apresentava em relação às limitações que técnicas convencionais quanto a necessidade de substituição de órgãos e tecidos e a problemática quando estamos à frente de falta de doadores, falência, ausência ou disfunção de órgãos e tecidos. Com este foco, nossa pesquisa corrobora com a ideia de regenerar o órgão ou tecido a fim de produzir novamente estas estruturas de forma original evitando as desvantagens e limitações dos métodos apontados nas técnicas convencionais.

A substituição e regeneração do tecido ósseo foi considerado um grande desafio para a Medicina e ET, principalmente a reconstrução da macro e microestrutura desse tecido. A nanotecnologia também foi apontada por VIEIRAS et al., 2017 como uma das formas de se extrair de nano estruturas, características compatíveis a um tecido natural, além de favorecer a inclusão de fatores indutores e células para facilitar a distribuição destes, na estrutura interna de um *scaffold* quando implantados. Corroborando com a ideia do autor supracitado, nosso estudo visou colaborar na regeneração do tecido ósseo com o auxílio de um biomaterial formado por uma nano estrutura de HA, implantado em tibia de coelho, esses implantes apresentaram resultados superiores quando comparados com as amostras derivadas de HA microparticuladas.

Biomaterial foi definido como qualquer material natural ou sintético que pode executar, acrescentar ou substituir a função de um tecido onde será implantado (CHIM & GOSAIN, 2009). Inúmeros biomateriais a base de matriz óssea desmineralizada, tais como, plasma rico em plaquetas, adjuvantes de fatores de crescimento, hidroxiapatita ou materiais sintéticos como, cerâmica de fosfato tri-cálcico, vidros bioativos, sulfato de cálcio e polímeros, foram utilizados pela ET para substituir grandes perdas teciduais (De GRADO *et al.* 2018). Esses biomateriais são classificados de acordo com sua estrutura química ou comportamento biológico (WANG 2003). O osso e os dentes são compostos basicamente por HA (JONG 1926) e a HA que compõe os ossos é considerada uma nano estrutura (GOPI *et al.* 2008; REY *et al.* 2009). Na última década, os estudos com os biomateriais com a finalidade de interagir com material biológico tiveram grande expansão e interesse. Aplicações *in vitro* ou *in vivo* estão colaborando em diferentes oportunidades para terapias avançadas baseadas em células (ABDEEN & SAHA, 2017). Os biomateriais de HA nano e micro particulada utilizadas no presente estudo interagiu com o tecido ósseo de forma positiva, o maior volume e menor porosidade óssea foram observados nos biomateriais de HA nano particulado quando comparado aos micro particulados. Nenhum estudo anterior fez esta comparação.

A presença de um biomaterial em um tecido está diretamente relacionada com os resultados biológicos, colaborando na proliferação celular e remodelamento tecidual (ZIUPOS, 1998), além disso colaboraram na osteocondução, osteoindução e osseointegração (ALBREKTSSOM & JOHANSSON, 2001). Para ocorrer a osteointegração, um dos fatores a ser considerado é o tamanho do poro do biomaterial (mínimo 100 - 135 μ m) (SUCHANECK *et al.* 1998). A osseoindução corre apenas quando o

biomaterial está diretamente ligada a uma proteína morfogenética óssea da circulação (Le GEROS, 2002). Os biomateriais foram apontados com maior vantagem quando comparados ao autoenxerto por possuírem um menor risco de contaminação (WAN et al. 2006), também possuem vantagens quanto ao menor risco de rejeição quando comparados aos aloenxertos ou xenoenxertos (PRECHEUR, 2017). No presente estudo, os biomateriais testados apresentaram osseointegração, tanto na forma micro como na forma nano particulada, esse fator foi possível ser avaliado na análise histopatológica, o crescimento ósseo na interface osso-implante ocorreu de forma favorável, a osteocondução não foi possível ser avaliado, devido o biomaterial não possuir capilaridade, assim como a osteoindução não ocorreu por não ter uma proteína misturada à HA. Durante os 28 dias de experimento não houve sinais de rejeição dos implantes.

Um biomaterial adequado precisa apresentar características como ser biocompatível, não gerar resposta inflamatória adversa, ser facilmente moldado ao tecido ósseo, manter forma e volume ao longo do tempo, possuir radioluscência para boa avaliação radiográfica após implantado, como também ser termicamente não condutor, bioativo, capaz de ser esterilizado, e prontamente disponível a um custo razoável (PRYOR et al., 2009). O termo Hidroxiapatita está relacionado a presença de duas hidroxilas (OH) enquanto apatita tem origem da palavra grega “apatos”, que tem o significado de enganar (FIHRI et al., 2017). A HA é um biomaterial que possui lenta degradação e permanece no local implantado por um longo período (GOSAI et al., 2002). A HA também apresenta excelente biocompatibilidade e bioatividade e também é caracterizada como não tóxica, não alergênica, não carcinogênica, ter radiopacidade, ser osteocondutora e o melhor substituto ósseo (CARVALHO et al., 2004; PATEL, 2005; TAN et al., 2013). Nos

últimos anos, ainda é crescente a busca de um biomaterial ideal que tem como princípio a HA nano ou micro particulada com custos acessíveis (YAZIDANI et al., 2018). No presente estudo, os biomateriais a base de HA foram acompanhados radiograficamente a cada 14 dias, totalizando 28 dias de experimento, três tomadas de raios-x foram realizadas, no dia zero (dia da implantação cirúrgica), 14 e 28 dias após cirurgia, os resultados corroboraram com os estudos supracitados e todos os implantes demonstraram radiopacidade, não foram reabsorvidos no período avaliado, as imagens radiográficas e o tecido ao redor dos implantes não demonstraram sinais de infecção ou até mesmo rejeição, garantindo a possibilidade de desenvolver um scaffold com esse biomaterial para futuramente será utilizado como substituto do tecido ósseo.

7. CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Os implantes de HA nano particulada sinterizada por Agitação Magnética e por Sonda Ultrassônica apresentaram resultados superiores no volume de osso neoformado e menor porosidade quando comparados com o implante de HA microparticulado, porém não superaram o volume ósseo e porosidade do orifício sem implante.

8. REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Abdeen AA; Saha K. Manufacturing Cell Therapies Using Engineered Biomaterials. *Trends Biotechnol.* 2017; 35(10): 971–982.

Albrektsson T, Johansson C, Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* (2001) 10: S96–S101.

Balasundaram G, Sato M, Webster TJ. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD, *Biomaterials.* 2006; 27: 2798-2805.

Bisceglie V. Ueber die antineoplastische Immunitat; Ueber die Wachstumsfaehigkeit der heterologen Geschwuelste in erwachsenen Tieren nach Einpflanzung in Kollodiumsaeckchen *Ztschr Krebsforsch* 1933; 40: 141–141.

Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2004; 6:1, 41-75

Butler DL, Goldstein SA, Guldborg RE, Guo XE, Kamm R, Laurencin CT, Tranquillo RT. The Impact of Biomechanics in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Tissue Engineering. Part B, Reviews.* 2009; 15(4), 477–484.

Carvalho PSP, Bassi APF, Violin LA. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. *Implant News.* 2004; 1:255-259.

Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal.* 2008; 17(4): S467–S479.

Chim H, Gosain AK. Biomaterials in craniofacial surgery: experimental studies and clinical application. *J Craniofac Surg.* 2009; 20(1):29-33.

Demirbag B, Huri PY, Kose GT, Buyuksungur A, Hasirci V. Advanced cell therapies with and without scaffolds. *Biotechnology Journal.* 2011; 6 (12): 1437–1453.

De Grado GF, Keller L, Gillet YI, Wagner Q, Musset AM, Benkirane N, Bornert F, Offner D. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *Journal of Tissue Engineering* June 4, 2018.

Duailibi MT, Duailibi SE, Young C, Bartett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dental Research.* 2004; 83(7): 523-38

Fihri A, Len C, Varma RS, Solhy A. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. *Coord. Chem. Rev.* 2017; 347:48–76.

Font Tellado S, Balmayor ER, Van Griensven, M. Strategies to engineer tendon/ligament-to-bone interface: Biomaterials, cells and growth factors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015, 94, 126–140.

Gopi D, Govindaraju KM, Victor CA, Kavitha L, Rajendiran N. Spectroscopic investigation of nanohydroxyapatite powders synthesized by conventional and ultrasonic coupled sol-gel routes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2008; 70 (5):1243-5.

Gosain AK, Song L, Riordan P, Amarante MT, Nagy PG, Wilson CR, Toth JM, Ricci JL. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived

biomaterials in an adult sheep model: part I. *Plast Reconst Surg.* 2002; 109(2):619-630.

Jong WF. La substance minerale dans les os. *Recl Trav Chim Pays – Bas Belg.* 1926; 45:445–448.

Landi E, Sprio S, Sandri M, Celotti G, Tampieri A. Development of Sr and CO₃ co-substituted hydroxyapatites for biomedical applications. *Acta Biomater.* 2008a; 4, 656-663.

Landi, E. Logroscino G, Proietti L, Tampieri A, Sandri M, Sprio S. Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour. *J Mater Sci Mater Med.* 2008b; 19(1): 239-247.

Langer R., Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993; 260 (5110): 920–926.

Langer R. Tissue Engineering. *Molecular Therapy.* 2000; 1(1).

LeGeros RZ. Propriedades dos biomateriais osteocondutores: fosfatos de cálcio. *Clin Orthop Relat Res.* 2002; 395: 81-98.

Nichol JK, Khademhosseini A. Modular tissue engineering: engineering biological tissues from the bottom up. *Soft Matter* 2009 5(7): 1312-1319.

Patel, N. In vivo assessment of hydroxyapatite and silicate-substituted hydroxyapatite granules using an ovine defect model. *J Mater Sci Mater Med.* 2005; 16(5): 429-440.

Precheur, HV. Bone graft materials. *Dental Clinics of North American, Philadelphia.* 2007; 51: 729-746.

Pryor LS, Gage E, Langevin CJ, Herrera F, Breithaupt AD, Gordon CR, Afifi AM, Zins JS, Meltzer H, Gosman A, Cohen SR, Holmes R. Cranial Maxillofac Trauma Reconstruction 2009; 2(3): 151-160

Rey C, Combes C, Drouet C, Glimcher MJ. Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporos Int.* 2009; 20(6):1013-21.

Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater.* 2003 Jun 30;5:29-39.

Skalak RC, Fred Fox: Tissue engineering: proceedings of a workshop, held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, 1988 Feb; 26-29.

Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J. Mater. Res.* 1998;13:94–117.

Tan L, Yu X, Wan P, Yang K. Biodegradable Materials for Bone Repairs: A Review. *J. Mater. Sci. Technol.* 2013; 29:503–513.

Tang Y, Chappell HF, Dove MT, Reeder RJ, Lee YJ. Zinc incorporation into hydroxyapatite. *Biomaterials.* 2009; 30(15): 2864-2872.

Vieiras S, Vial S, Reis RL, Oliveira JM. Nanoparticles for bone tissue engineering. *Biotechnol Prog.* 2017 May; 33(3):590-611.

Yazdani J, Ahmadian E, Sharifi S, Shahi S, Maleki DS. A short view on nanohydroxyapatite as coating of dental implants. *Biomed Pharmacother.* 2018 Sep;105:553-557.

Wan, DC, Nacamuli, RP, Longaker MT. Craniofacial bone tissue engineering. *Dental Clinics of North American*, Philadelphia. 2006; 50(2):175-190.

Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*. 2003; Jun; 24(13):2133-51.

Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Bizios R. Hydroxyapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium II: mechanisms of osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res Part A*. 2002; 59(2): 312–317.

Webster, TJ. Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations. *Biomaterials*. 2004; 25(11): 2111-2121.

Ziupos P. Recent development in the study of failure solid biomaterials and bone: fracture and pre-fracture toughness. *Material Science and Engineering*. 1998; 6(1):33-40.

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

- Instituto Internacional de Pesquisas Tecnológicas. International Technology Research Institute (ITRI) [Internet]. Citado em 2002. Disponível em https://dpcpsi.nih.gov/sites/default/files/opep/document/Final_Report_%2800-03-NHLBI%29_2002.pdf
- Fundação Nacional de Ciência. National Science Foundation (NSC) [Internet]. Citado em 2004. Disponível em <https://www.nsf.gov/pubs/2004/nsf0450/who.pdf>
- Descritores em Ciências da Saúde (Decs) [Internet]. São Paulo: Biblioteca Regional de Medicina (Bireme) – [citado 2013 Jan 27]. Disponível em: <http://decs.bvs.br/>

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

Legislação Brasília: Concelho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) – [citado 2013 jan 27]. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/31055.html>

Nomina Anatômica Veterinária [Internet]. International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. 2012 – [citado 2013 jan 27]5.ed. Disponível em: http://www.wava-amav.org/Downloads/nav_2012.pdf

Normas para utilização de animais de laboratório na pesquisa e ensino na Unifesp [Internet]. São Paulo: Centro de Desenvolvimento de Medicina Experimental (Cedeme/Unifesp) – [citado 2013 jan 27]. Disponível em: <http://www.unifesp.br/centros/cedeme/normas.htm>

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



10 de junho de 2018
CEUA N 3570230115

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Renato Dalcin Segala
Depto/Disc: Citomol- Unifesp
Prof. Dr. Silvio Eduardo Dualibi (orientador)

Título do projeto: "Avaliação da interação entre implantes de hidróxiapatita nanoparticulada e tíbias de coelhos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 08/junho/2018) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Por motivos de saúde o pesquisador Paulo de Oliveira Martins estará se afastando da pesquisa e transferindo para o novo pesquisador Renato Dalcin Segala conforme dados sistema. Segue carta como anexo para troca de pesquisador. Atenciosamente".

Comentário da CEUA: "Aprovada a alteração do pesquisador principal de Paulo de Oliveira Martins para Renato Dalcin Segala. Conjuntamente foram alterados título e dados pessoais".

Atenciosamente

Prof. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

APÊNDICE 2

Randomização entre os coelhos e a rota de sinterização (AM; US)

08/07/2017

A Randomization Plan
from
<http://www.randomization.com>

1.	US
2.	AM
3.	US
4.	US
5.	AM
6.	AM
7.	US
8.	US
9.	AM
10.	US
11.	US
12.	AM
13.	AM
14.	US
15.	AM
16.	AM
17.	AM
18.	AM
19.	AM
20.	AM
21.	AM
22.	US
23.	US
24.	AM
25.	US
26.	US
27.	US
28.	US

28 subjects randomized into 1 block.

To reproduce this plan, use the seed 14534
along with the number of subjects per block/number of blocks
and (case-sensitive) treatment labels as entered originally.

Randomization plan created on 08/07/2017 13:52:14

APÊNDICE 3

Randomização do início do procedimento cirúrgico, TD ou TE

08/07/2017

A Randomization Plan
 from
<http://www.randomization.com>

1.	TE
2.	TD
3.	TE
4.	TD
5.	TE
6.	TE
7.	TD
8.	TE
9.	TE
10.	TE
11.	TD
12.	TD
13.	TD
14.	TD
15.	TE
16.	TD
17.	TE
18.	TE
19.	TD
20.	TD
21.	TE
22.	TD
23.	TD
24.	TE
25.	TD
26.	TD
27.	TE
28.	TE

28 subjects randomized into 1 block
 To reproduce this plan, use the seed 14514
 along with the number of subjects per block/number of blocks
 and (case-sensitive) treatment labels as entered originally.
 Randomization plan created on 08/07/2017 13:50:14

APÊNDICE 4

Randomização entre as amostras AM e o número do implante

08/07/2017

A Randomization Plan
from
<http://www.randomization.com>

1. AM-6 _____
2. AM-11 _____
3. AM-12 _____
4. AM-13 _____
5. AM-10 _____
6. AM-1 _____
7. AM-7 _____
8. AM-9 _____
9. AM-3 _____
10. AM-5 _____
11. AM-2 _____
12. AM-8 _____
13. AM-4 _____
14. AM-14 _____

14 subjects randomized into 1 block
To reproduce this plan, use the seed 6025
along with the number of subjects per block/number of blocks
and (case-sensitive) treatment labels as entered originally.
Randomization plan created on 08/07/2017 14:01:06

APÊNDICE 5

Randomização entre as amostras US e o número do implante

08/07/2017

A Randomization Plan

from

<http://www.randomization.com>

1. US-9 _____
2. US-6 _____
3. US-3 _____
4. US-7 _____
5. US-1 _____
6. US-2 _____
7. US-4 _____
8. US-11 _____
9. US-12 _____
10. US-5 _____
11. US-8 _____
12. US-10 _____
13. US-14 _____
14. US-13 _____

14 subjects randomized into 1 block

To reproduce this plan, use the seed 19594
along with the number of subjects per block/number of blocks
and (case-sensitive) treatment labels as entered originally.
Randomization plan created on 08/07/2017 13:58:19

APÊNDICE 6**Planilha de trabalho experimental – Protocolo cirúrgico****IDENTIFICAÇÃO DO COELHO**

ID COELHO: 28 COELHO

GRUPO: AM/U

PROCEDÊNCIA: GRANJA COELHO REAL

SEXO: M IDADE: 4M PESO MÉDIO: 2,81KG

TEMPO

DATA: 28/07; 08/09; 20/10 E

24/11/2017

INÍCIO/TÉRMINO:

TEMPO MÉDIO CIR.: 15'64"

EXPERIMENTO

LOCAL DO EXPERIMENTO: CEDEME - UNIFESP

SEDAÇÃO: MORFINA 0,1MG/KG + ACEPROMAZINA 0,75MG/KG/IM

ANESTESIA: XILAZINA 5MG/KG + CETAMINA 35MG/KG/IM

ANTIBIÓTICO: ENROFLOXACINA 2,5MG/KG/IM

ANTIINFLAMATÓRIO E ANALGÁSICO: MAXICAN 0,1MG/KG/IM + DAPIRONA 25MG/KG/IM + TRAMAL 3MG/KG/IM

POSIÇÃO DO ANIMAL: DECÚBITO LATERAL ESQUERDO E DIREITO

CIRURGIÃO: RENATO DALCIN SEGALA

IDENTIFICAÇÃO DO IMPLANTE

INÍCIO: TD () TE ()

IMPLANTE TÍBIA DIREITA:

IMPLANTE TÍBIA ESQUERDA:

EUTANÁSIA

DATA: 25/08; 06/10; 17/11 E 22/12/2017

FÁRMACOS: ACEPROMAZINA 0,75MG/KG/IM; TIOPENTAL 150MG/KG/IV; KCL 1ML/KG/IV

OBSERVAÇÕES