

Oduvaldo Câmara Marques Pereira Júnior

**COMPARAÇÃO ENTRE POLÍMERO DE MAMONA (*Ricinus communis*) E AUTO-ENXERTO ÓSSEO ESPONJOSO
NO TRATAMENTO DE DEFEITO ÓSSEO SEGMENTAR
INDUZIDO NO RÁDIO DE COELHOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Cirurgia Veterinária.

Orientador: ***Prof. Dr. Paulo Iamaguti***

Co-orientador: ***Prof^a. Dr^a. Sheila Canevese Rahal***

Botucatu – SP

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Pereira Júnior, Oduvaldo Câmara Marques.

Comparação entre polímeros de mamona(*Ricinus communis*) e auto-enxerto ósseo esponjoso no tratamento de defeito ósseo segmentar induzido no rádio de coelhos / Oduvaldo Câmara Marques Pereira Júnior. – Botucatu : [s.n.], 2005.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2005.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Iamaguti

Co-orientador: Prof^a. Adj. Sheila Canevese Rahal

Assunto CAPES: 50500007

1. Osso – Doenças – Aspectos genéticos. 2. Coelho – Doenças. 3. Mamona.

CDD 636.93220896

Palavras chave: Biomaterial; Falha óssea; Osso; Poliuretana.

Dedico este trabalho

A Deus

“Sempre tenho o Senhor diante de mim.
Com Ele à minha direita, não serei abalado.
Por isso o meu coração se alegra
e no íntimo exulto.”

Salmos 16:8-9a

**Aos meus pais Oduvaldo e Regina Célia
e minhas irmãs Patrícia e Raquel**

Por todo amor e carinho dedicados a mim ao longo desses anos.
Pelo apoio, incentivo e amizade em todos os momentos da minha vida.

Obrigado por tudo.

Amo vocês.

Ao Prof. Dr. Paulo Iamaguti

Por ter possibilitado a
realização deste Mestrado.

À Prof^a. Dr^a. Sheila Canevese Rahal

Pela orientação, dedicação, amizade e capacidade de transmitir
seus conhecimentos e experiências profissionais.

Muitas foram as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos:

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FMVZ – UNESP Botucatu pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À BIOMECÂNICA Ind. e Com. de Prod. Ortopédicos Ltda. pelo fornecimento dos biomateriais e em especial ao senhor Guilherme Arradi pela atenção dispensada.

Ao meu pai, professor Oduvaldo Câmara Marques Pereira, pelas sugestões, orientações e correções feitas neste trabalho de dissertação.

Ao professor Sérgio Luis Felisbino do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu pelo auxílio e ensinamentos na área de histologia e morfometria.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia pelo auxílio na obtenção dos cortes histológicos, em especial à Sueli.

Aos professores do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária pelos ensinamentos e contribuição na minha formação profissional.

Ao pós-graduando Eduardo Hatschbach por auxiliar no procedimento anestésico do experimento e pelas fotos do procedimento cirúrgico.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, em especial ao professor Luiz Carlos Vulcano por permitir a realização dos exames radiográficos.

Ao residente Alexandre L. C. Bicudo, pela realização dos exames radiográficos.

Aos amigos Priscila Teodoro Pavan e Augusto Francisco Paes pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos e radiológicos.

A todos os funcionários do Biotério Central da Unesp pelo fornecimento dos animais.

Ao senhor José Carlos Georgete, do Laboratório Experimental de Clínica Médica, por ter cedido as gaiolas para alojar os animais durante todo o experimento.

Aos funcionários do coelhário do Laboratório Experimental de Clínica Médica pela limpeza das gaiolas e tratamento dos animais.

Ao professor João Lauro Viana de Camargo do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu por ter disponibilizado o equipamento para a obtenção das medidas das áreas de produção óssea ao exame radiográfico.

À Carla A. S. Franchi pelo auxílio na obtenção das medidas das áreas de produção óssea ao exame radiográfico.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação pela simpatia, atenção e disponibilidade.

Às bibliotecárias Rosemary Cristina da Silva, pela correção das referências; e Rosemeire A. Vicente pela elaboração da ficha catalográfica.

Aos amigos de Pós-Graduação pela convivência e por compartilharem seus conhecimentos.

A todos alunos e estagiários que auxiliaram na realização das cirurgias.

RESUMO

PEREIRA-JÚNIOR, O.C.M. **Comparação entre polímero de mamona (*Ricinus communis*) e auto-enxerto ósseo esponjoso no tratamento de defeito ósseo segmentar induzido no rádio de coelhos**. 2005. 103p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RESUMO

Objetivou-se avaliar, por meio de exames radiográficos e histológicos, a função da resina de poliuretana derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*), na forma de grânulos, no tratamento de defeito ósseo segmentar induzido no rádio de coelhos, tendo como padrão comparativo o enxerto ósseo esponjoso autólogo. Foram utilizados 20 coelhos da raça Norfolk, fêmeas, com idade entre 12 e 14 meses e peso entre 4 e 5kg. Uma falha óssea segmentar de 1,0 cm de comprimento foi induzida na diáfise de ambos os rádios pela excisão de fragmento osteoperiosteal. No rádio esquerdo o defeito foi tratado com a resina de poliuretana e no direito com auto-enxerto esponjoso colhido do úmero proximal esquerdo. Para realização dos exames histológicos foram eutanaziados cinco animais aos 15 dias, 30 dias, 60 dias e 120 dias de pós-operatório. A regeneração óssea foi maior no defeito tratado com auto-enxerto esponjoso em todos os períodos de observação, sendo que, aos 120 dias de pós-operatório, estes estavam totalmente reconstituídos. Pela avaliação histológica o polímero de mamona atuou como preenchedor de espaço, minimizando a produção de tecido fibroso no local, além de não apresentar sinais de reabsorção em nenhum dos momentos de avaliação. Foi possível concluir que o polímero de mamona na forma de grânulos é biocompatível e osteointegrável, porém não apresenta a mesma capacidade de regeneração óssea do auto-enxerto esponjoso.

Palavras-chave: Biomaterial; Falha óssea; Osso; Poliuretana.

ABSTRACT

PEREIRA-JÚNIOR, O.C.M. **Comparison between castor oil plant (*Ricinus communis*) polyurethane and cancellous bone autograft in the treatment of bone induced segmental defect in rabbits.** 2005. 103p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ABSTRACT

The aim of the present study was to compare, by radiographic and histological analyses, the castor oil plant polyurethane in granules presentation, applied to a segmental bone defect, created in both radial diaphyses, to the cancellous bone autograft, in order to evaluate an alternative to bone defect healing. Norfolk adult female rabbits, with approximately 13 months of age and a mean body weight of 4.5kg were used. Thus, a one-cm segmental defect was created in both radial diaphyses. The defect in the left radius was filled with the castor oil plant polyurethane, and the right one, filled with cancellous bone autograft, collected from the left proximal humerus. The rabbits were euthanased at 15, 30, 60 and 120 days post-surgery (5 animals/period), in order to proceed the histological analysis. New bone formation was increased and accelerated in the defect treated with cancellous bone autograft along all periods of observation. In the last moment (120 days), the defects were totally reconstituted and remodeled. The polyurethane acted as a space filler, minimizing the local production of fibrous tissue. No granules degradation or reabsorb were detected, as well as any inflammatory reaction. Thus, it was possible to conclude that the castor oil plant polyurethane, in granules presentation, was biocompatible and osteointegrated, but did not show the same bone regeneration capacity of the cancellous bone autograft.

Key word: Biomaterial; Segmental bone defect; Bone; Polyurethane.

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Indução de defeito ósseo segmentar no rádio de coelho. Incisão de pele na face craniomedial da região do terço médio-proximal do rádio (a). Exposição do rádio após afastamento muscular (b). Secção de fragmento osteoperiosteal do terço médio-proximal do rádio (c). Defeito ósseo segmentar de 1cm de comprimento (d).....43
- Figura 2: Tratamento de defeito ósseo segmentar induzido no rádio direito de coelho por meio de enxerto ósseo esponjoso autólogo. Colheita do enxerto ósseo esponjoso da região craniolateral da porção proximal do úmero esquerdo com uso de cureta (a). Enxerto acondicionado em placa de Petri até o momento da aplicação (b). Aplicação do enxerto esponjoso no defeito ósseo criado (c). Defeito ósseo segmentar totalmente preenchido por auto-enxerto ósseo esponjoso (d).....44
- Figura 3: Tratamento de defeito ósseo segmentar induzido no rádio esquerdo de coelho por meio de polímero de mamona na forma de grânulos. Grânulos de polímero de mamona antes (a) e após (b) a mistura com 0,1 ml de sangue autólogo. Defeito ósseo segmentar totalmente preenchido pelo polímero de mamona misturado com sangue (c).....45
- Figura 4: Demonstração em exame radiográfico do local colhido para o processamento histológico. Incluiu-se a região do defeito ósseo segmentar e suas porções proximais e distais, bem como a porção da ulna contígua à área.....49
- Figura 5: Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com auto-enxerto esponjoso (coelho nº 3) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 dias de pós-operatório (b), quando nota-se a formação óssea a partir da extremidade proximal do rádio e da face cranial da ulna.....54
- Figura 6: Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com auto-enxerto esponjoso (coelho nº 6) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 (b) e 30 (c) dias de pós-operatório. Nota-se discreta reação periosteal na extremidade proximal do rádio aos 15 dias e nas extremidades proximal e distal aos 30 dias de pós-operatório. Verifica-se início de formação óssea a partir da extremidade osteotomizada proximal do rádio aos 15 dias, que preenche 100% do defeito aos 30 dias de pós-operatório.....55
- Figura 7: Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com auto-enxerto esponjoso (coelho nº 12) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 (b), 30 (c) e 60 (d) dias de pós-operatório. Observa-se reação periosteal na extremidade proximal do rádio aos 15 e 30 dias de pós-operatório. O início de formação óssea no centro do defeito já é detectado aos 15 dias de pós-operatório. Aos 30 dias de pós-operatório nota-se intensa neoformação óssea a partir das extremidades do rádio e da face cranial da ulna, que aos 60 dias de pós-operatório ocupa 100% do defeito com sinais de remodelação óssea.....56

Figura 8: Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com auto-enxerto esponjoso (coelho nº 18) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 (b), 30 (c), 60 (d) e 120 (e) dias de pós-operatório. Verifica-se reação periosteal na extremidade proximal do rádio aos 15 dias de pós-operatório e em ambas as extremidades do rádio aos 30 dias de pós-operatório. Verifica-se o início de formação óssea na extremidade osteotomizada proximal do rádio e no centro do defeito aos 15 dias de pós-operatório, que ocupa aproximadamente 70% do defeito aos 30 dias de pós-operatório. Aos 60 dias de pós-operatório a neoformação óssea ocupa 100% do defeito e aos 120 dias já se detecta a remodelação óssea.....57

Figura 9: Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com polímero de mamona (coelho nº 3) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 dias de pós-operatório (b). Nota-se discreta radiopacidade do polímero na região do defeito no pós-operatório imediato e início de formação óssea a partir da extremidade proximal do rádio e face cranial da ulna aos 15 dias de pós-operatório.....60

Figura 10: Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com polímero de mamona (coelho nº 9) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 (b) e 30 (c) dias de pós-operatório. Visualiza-se discreta radiopacidade do polímero na região do defeito no pós-operatório imediato e início de formação óssea a partir da extremidade proximal do rádio e face cranial da ulna aos 15 dias de pós-operatório. Aos 30 dias de pós-operatório nota-se neoformação óssea a partir de ambas as extremidades osteotomizadas do rádio e a partir da face cranial da ulna ocupando aproximadamente 45% do defeito.....61

Figura 11: Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com polímero de mamona (coelho nº 12) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 (b), 30 (c) e 60 (d) dias de pós-operatório. Observa-se neoformação óssea ocupando 60% do defeito, a partir das extremidades osteotomizadas do rádio e da face cranial da ulna aos 60 dias de pós-operatório (d), permanecendo uma área radiotransparente no centro do defeito.....62

Figura 12: Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com polímero de mamona (coelho nº 16) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 (b), 30 (c), 60 (d) e 120 (e) dias de pós-operatório. Observa-se neoformação óssea nas extremidades osteotomizadas do rádio e na face cranial da ulna aos 30 dias de pós-operatório (c), ocupando cerca de 60% do defeito ósseo. Aos 60 dias de pós-operatório (d), nota-se que a produção óssea ocupa 79% do defeito ósseo. Aos 120 dias de pós-operatório (e), a quantidade de tecido ósseo neoformado continua semelhante à do período anterior, mas já com sinais de remodelação óssea.....63

Figura 13: Corte histológico longitudinal de defeito tratado com auto-enxerto esponjoso aos 15 dias de pós-operatório. Nota-se a formação de tecido cartilaginoso (C) próxima às extremidades osteotomizadas do rádio (setas) e avançando para o centro do defeito. A formação de tecido ósseo trabecular é visível (setas largas) a partir das bordas do defeito (especialmente proximal) e em maior quantidade a partir da face cranial da ulna (U). No centro do defeito há áreas de tecido adiposo (A). Tecido conjuntivo (TC) derivado do periósteo é observado recobrendo toda a região externa do defeito.....66

- Figura 14: Detalhe do defeito ósseo tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso aos 15 dias de pós-operatório. Observa-se proliferação de trabéculas ósseas (T) a partir da borda proximal do rádio (setas) e a presença de tecido cartilaginoso (C) e de tecido conjuntivo (TC).....67
- Figura 15: Detalhe da formação óssea na região central do defeito ósseo tratado com auto-enxerto esponjoso aos 15 dias de pós-operatório. Verifica-se o aspecto trabecular e a presença de osteócitos (setas).....67
- Figura 16: Corte histológico longitudinal do defeito ósseo tratado com auto-enxerto esponjoso aos 30 dias de pós-operatório. O tecido ósseo neoformado (setas largas) ocupa todo o defeito ósseo, sendo visualizadas uma pequena área de tecido cartilaginoso (C) próxima à extremidade osteotomizada superior do rádio (setas) e uma área de tecido adiposo (A) no centro do defeito ósseo. O osso neoformado próximo à face cranial da ulna (U) já se apresenta mais compacto (setas vazadas) que no resto da falha segmentar. Nota-se a presença de tecido conjuntivo derivado do periósteo (TC) recobrindo toda superfície do defeito ósseo.....68
- Figura 17: Defeito ósseo tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso aos 30 dias de pós-operatório. Nota-se a proliferação trabecular (setas largas) a partir da extremidade osteotomizada proximal (linha tracejada) do rádio (R).....69
- Figura 18: Defeito ósseo tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso aos 30 dias de pós-operatório. Detalhe de trabécula óssea (T) margeada por osteoblastos (setas) na região central do defeito ósseo.....69
- Figura 19: Corte histológico longitudinal do defeito ósseo tratado com auto-enxerto esponjoso aos 60 dias de pós-operatório. Nota-se a diminuição da área de neoformação óssea (setas cheias), devido à formação de zonas de medula óssea (MO) entre as trabéculas, e a presença de septo de tecido conjuntivo (TC) próximo ao centro do defeito ósseo. O tecido ósseo neoformado próximo à ulna apresenta aspecto lamelar (setas vazadas).....70
- Figura 20: Defeito ósseo tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso aos 60 dias de pós-operatório. Nota-se septo de tecido conjuntivo (TC) entre as trabéculas ósseas neoformadas (setas cheias) e a presença de tecido cartilaginoso na região central do defeito ósseo próximo à ulna (U).....71
- Figura 21: Defeito ósseo tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso aos 60 dias de pós-operatório, na região da extremidade osteotomizada distal do rádio (R). Verifica-se início de formação de medula óssea (MO) entre as áreas de tecido ósseo neoformado (setas cheias).....71
- Figura 22: Imagem radiográfica em posição lateral (a) e corte histológico longitudinal (b) de defeito tratado com auto-enxerto esponjoso aos 120 dias de pós-operatório (coelho nº 5). Observa-se no destaque da radiografia o tecido ósseo neoformado em fase de remodelação e ocupando toda área do defeito ósseo. No corte histológico correspondente, nota-se a formação de uma cortical óssea delgada (setas vazadas) e a formação do canal medular na região do defeito ósseo (CM).....72

- Figura 23: Defeito ósseo tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso aos 120 dias de pós-operatório. Verifica-se a remodelação óssea das trabéculas provenientes da ulna (U) para formação de canal medular (CM) na região central do defeito ósseo..... 73
- Figura 24: Defeito ósseo tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso aos 120 dias de pós-operatório. Observa-se a formação do canal medular (CM) e de cortical óssea (CO) na região do defeito ósseo e a presença de feixes musculares (setas).....73
- Figura 25: Corte histológico longitudinal do defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 15 dias de pós-operatório. Verificam-se áreas de tecido cartilaginoso (C) próximas às extremidades osteotomizadas do rádio (setas). Observa-se intensa reação periosteal nas extremidades do rádio e formação de tecido ósseo trabecular (setas largas) a partir das bordas do defeito ósseo e a partir da face ulnar (U). No centro do defeito ósseo notam-se os grânulos de polímero (*) envoltos por tecido conjuntivo ou por tecido ósseo neoformado. Tecido conjuntivo (TC) derivado do periósteo recobre toda a região mais externa do defeito ósseo.....76
- Figura 26: Detalhe da região proximal do defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 15 dias de pós-operatório. Presença de formação óssea trabecular (setas cheias), tecido cartilaginoso (C) e grânulos de polímero (*) em contato íntimo com o tecido cartilaginoso.....77
- Figura 27: Detalhe da região média do defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 15 dias de pós-operatório. Nota-se a presença de grânulos de polímero de mamona em contato com tecido ósseo neoformado (*).....77
- Figura 28: Corte histológico longitudinal do defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 30 dias de pós-operatório. Nota-se proliferação de trabéculas ósseas (setas cheias) a partir das extremidades osteotomizadas do rádio (setas) e da face ulnar (U), além de tecido cartilaginoso (C) próximo à borda distal do rádio. Os grânulos de polímero próximos à ulna estão envolvidos por tecido ósseo neoformado (*), e os mais afastados permanecem circundados por tecido conjuntivo (#). Verifica-se a formação da medula óssea (MO) a partir do canal medular da extremidade distal do rádio. Alguns grânulos de polímero (•) encontram-se em contato íntimo com as células da medula óssea e tecido ósseo neoformado.....78
- Figura 29: Defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 30 dias de pós-operatório. Verifica-se a neoformação óssea (setas cheias) a partir da extremidade osteotomizada distal do rádio (setas) e os grânulos de polímero envoltos por tecido ósseo e células de medula óssea (*).....79
- Figura 30: Detalhe de grânulo de polímero de mamona (*) circundado por tecido ósseo neoformado (seta cheia) e medula óssea (MO).....79

- Figura 31: Corte histológico longitudinal do defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 60 dias de pós-operatório. Nota-se formação óssea (setas cheias) em forma de cunha a partir da extremidade osteotomizada proximal do rádio, face ulnar (U) e, em menor quantidade, a partir da extremidade osteotomizada distal do rádio. Os grânulos de polímero estão envoltos por tecido ósseo neoformado (*) e grande quantidade de tecido conjuntivo (TC) derivado do periósteo na região da extremidade osteotomizada proximal do rádio.....80
- Figura 32: Defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 60 dias de pós-operatório. Verifica-se a proliferação óssea (setas cheias) a partir da extremidade osteotomizada proximal (linha tracejada) do rádio (R) e grânulos de polímero (*) envoltos por tecido ósseo.....81
- Figura 33: Defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 60 dias de pós-operatório. Grânulos de polímero (*) estão envoltos por tecido ósseo (setas cheias), tecido conjuntivo (TC) e medula óssea (MO).....81
- Figura 34: Imagem radiográfica em posição lateral (a) e corte histológico longitudinal (b) de defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 120 dias de pós-operatório (animal nº 3). Observa-se no destaque da radiografia produção óssea unindo as extremidades osteotomizadas do rádio, mas permanecendo uma região radiotransparente na região central do defeito ósseo (cabeça de seta). No corte histológico correspondente, nota-se a formação óssea unindo ambas as extremidades osteotomizadas do rádio (setas), áreas de medula óssea (MO) sem canal medular evidente, grânulos de polímero envoltos por tecido ósseo e medula óssea (*), e o princípio de formação da cortical óssea na região do defeito ósseo em oposição à ulna (setas vazadas). A região radiotransparente da imagem radiográfica corresponde à região de concentração de grânulos de polímero no corte histológico.....82
- Figura 35: Detalhe da região central do defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 120 dias de pós-operatório. Os grânulos de polímero (*) estão completamente envolvidos por tecido ósseo neoformado.....83
- Figura 36: Detalhe de grânulo de polímero integrado (setas) ao tecido ósseo neoformado.....83
- Figura 37: Microscopia de polarização para observação da organização estrutural dos grânulos de polímero de mamona. Não há evidências de alterações na estrutura dos grânulos de polímero (*) aos 15 dias (a), 30 (b), 60 (c) e 120 dias (d), de pós-operatório.....84

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Valores médios (mm^2) das áreas de grânulos de polímero de mamona encontrados no defeito ósseo induzido, em função do momento (dias de pós-operatório), e seus respectivos desvios padrões.....87
- Tabela 2: Valores médios (mm^2) das áreas de produção de tecido cartilaginoso na região do defeito ósseo e seus respectivos desvios padrões, em função do tratamento (auto-enxerto esponjoso e polímero de mamona) e dos momentos de avaliação (dias de pós-operatório).....87
- Tabela 3: Valores médios (mm^2) das áreas de produção de tecido ósseo na região do defeito ósseo e seus respectivos desvios padrões, em função do tratamento (auto-enxerto esponjoso e polímero de mamona) e dos momentos de avaliação (dias de pós-operatório).....87

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1	Introdução.....	22
2	Revisão de Literatura.....	25
2.1	Polímero de mamona.....	26
2.2	Enxertos ósseos.....	33
3	Objetivo.....	37
4	Material e Métodos.....	39
4.1	Animais e ambientes de experimentação.....	40
4.2	Técnica anestésica.....	40
4.3	Procedimento cirúrgico.....	41
4.4	Condutas pré- e pós-operatórias.....	46
4.5	Avaliação clínica.....	46
4.6	Exames radiográficos.....	46
4.7	Exame histológico.....	47
4.7.1	Colheita e processamento histológico de inclusão.....	47
4.7.2	Obtenção dos cortes histológicos e imagens digitalizadas.....	48
4.7.3	Exame morfométrico.....	50
4.8	Análise estatística.....	50
5	Resultados.....	51
5.1	Avaliação clínico-cirúrgica.....	52

5.2	Exames radiográficos.....	52
5.2.1	Membros tratados com auto-enxerto esponjoso.....	52
5.2.2	Membros tratados com polímero de mamona.....	58
5.3	Avaliação histológica.....	64
5.3.1	Membros tratados com auto-enxerto esponjoso.....	64
5.3.2	Membros tratados com polímero de mamona.....	74
5.4	Microscopia de polarização.....	84
5.5	Exame morfométrico e análise estatística.....	85
6	Discussão.....	87
7	Conclusões.....	93
8	Referências.....	95
9	Anexo	104
9.1	Aprovação pela Comissão de Ética.....	105

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Além de importante reservatório para a homeostasia de íons minerais do organismo, os ossos constituem parte fundamental do sistema locomotor, funcionam como braços de alavanca durante os movimentos, resistem à força da gravidade, protegem e sustentam tecidos e órgãos adjacentes (Glimcher, 1982). Desta forma, o tecido ósseo é freqüentemente acometido por traumatismos, doenças de origens e comportamentos variados, infecções e deformidades congênitas (Leonel et al., 2004).

Fraturas em ossos longos, especialmente as cominutivas, constituem um constante desafio ao cirurgião. Casos com grandes perdas de tecido ósseo, fraturas com não-união ou consolidação retardada recebem tratamentos nem sempre satisfatórios, concorrendo em muitas vezes para a amputação do membro (Iamaguti et al. 1995). A aplicação adequada de um enxerto ósseo é, com freqüência, o fator crítico diferenciador entre o reparo bem sucedido de uma fratura e o desenvolvimento de uma não-união, bem como da possibilidade de salvamento do membro e a necessidade de sua amputação (Slatter, 2000).

Apesar de o enxerto ósseo esponjoso autógeno ser considerado o melhor estimulador da regeneração óssea, possui entre outros inconvenientes a limitação em volume e a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para colheita (Moore et al., 2001). Desta forma, vários biomateriais são constantemente testados e desenvolvidos com o intuito de se produzir substitutos a este tipo de enxerto (Bauer, 2000; Moore et al., 2001). Esses materiais apresentam como vantagem a disponibilidade ilimitada e a facilidade de esterilização e armazenamento (Bucholz, 2002). Os biomateriais sintéticos são, em sua maioria, osteocondutores e osteointegráveis (Moore et al., 2001).

À medida que surgiram resultados de estudos clínicos e experimentais com o emprego dos biomateriais, alguns produtos se destacaram e outros foram desacreditados. Dentre os primeiros, encontra-se a resina poliuretana derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*), que foi desenvolvida, em 1984, pelo Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (Ignácio et al., 1996). A poliuretana é formada a

partir da reação tipo uretana entre dois componentes básicos, o poliálcool e o pré-polímero (Bioosteo, 2004). Ela pode ser utilizada na formulação pura ou em associação com o carbonato de cálcio. A função do carbonato é fornecer íons cálcio, o que facilita a troca iônica na interface osso-resina, com incremento do mecanismo de deposição de cálcio na matriz colágena, nas várias fases do processo de reparação óssea (Ignácio, 1999).

Embora estudos experimentais (Caruzo & Roslindo, 1995; Ohara et al., 1995; Oliveira et al., 1995; Teixeira & Ramalho, 1995) tenham comprovando o potencial dessa poliuretana para utilização no tratamento de afecções ortopédicas, somente em 1999 o produto foi aprovado pelo Ministério da Saúde do Brasil (registro Anvisa nº 10171110079) e no ano de 2003 pela *Food and Drug Administration* (FDA), agência do governo norte-americano (Ereno, 2003). Atualmente existem diversas apresentações comerciais do material que permitem diferentes flexibilidades de aplicação, tais como em forma de biomassa, blocos pré-moldados, grânulos e endopróteses. O produto pode ser aplicado já polimerizado ou, então, em forma de biomassa para ser manipulado e moldado conforme a necessidade, no momento do ato cirúrgico (Bioosteo, 2004).

Devido ao número ainda limitado de ensaios experimentais empregando as diferentes modalidades da poliuretana derivada da mamona, o presente trabalho visou testar o biomaterial na forma de grânulos, para ser empregado em defeitos ósseos segmentares induzidos em coelhos, tendo como padrão ouro o enxerto esponjoso autólogo.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Polímero de mamona

Nas últimas décadas, segundo Perry (1999), foram desenvolvidos e empregados materiais como hidroxiapatita (HA), compostos de coral-colágeno, coral natural, cerâmicas à base de carbonato de cálcio e combinações de colágeno, para o tratamento de diversas afecções ortopédicas. Entre as funções destes materiais estão a osteocondução e a osteointegração.

O biomaterial osteocondutivo promove aposição de tecido ósseo em sua superfície, funcionando, em parte, como um arcabouço receptivo que facilita a formação óssea (Bauer & Smith, 2002). Para Greenwald et al. (2001), a osteocondução é uma facilitação da incursão de vasos sangüíneos e osso neoformado para dentro de um arcabouço. Este arcabouço deve fornecer, principalmente, um substrato no qual células osteoblásticas possam crescer, se diferenciar e depositar matriz óssea extra-celular, além de ser biocompatível (Lu et al., 2000). Osteointegração é definida como uma ancoragem direta de um implante pela formação de tecido ósseo ao redor deste, sem o crescimento de tecido fibroso na interface osso-implante (Merck, 2005). Contudo, nenhum material sintético utilizado até o momento apresenta características próximas ao tecido natural, atendendo tanto aos aspectos biológicos como também às necessidades mecânicas (Pereira et al., 2003).

Por outro lado, o uso de recursos renováveis tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, em especial pelo potencial como substitutos de derivados petroquímicos (Siddaramaiah, 2004). De acordo com Ohara (1995), as resinas poliuretanas vegetais são produtos substitutivos alternativos de polióis e pré-polímeros sintetizados a partir de moléculas derivadas de ácidos graxos vegetais. Dentre as vantagens na utilização deste tipo de resina estão a processabilidade, a flexibilidade de formulação, a versatilidade de temperatura de cura e o controle de pico exotérmico na transição líquido-gel, as excelentes propriedades estruturais, além da ausência de emissão de irritantes ou vapores tóxicos.

Ohara (1995) referiu que a síntese de resinas poliuretanas a partir da biomassa de origem vegetal, para um país com potencial agroindustrial como o Brasil, é extremamente interessante. Oleaginosas como a mamona (*Ricinus communis*), da classe dicotiledônea, de origem geraniácea e da família das *Euforbaceae*s, possuem um grande potencial oleoquímico, garantindo o fornecimento de insumos de fabricação em uma gama diversificada de produtos. Desta forma, no ano de 1984, o grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros da Universidade de São Paulo, cidade de São Carlos, desenvolveu um novo polímero derivado do óleo extraído de sementes da mamona (Ignácio, 1995).

Posteriormente, Ignácio (1999) descreve que, estruturalmente, o óleo de mamona é um poliéster com três moléculas do ácido 12-hidroxi-oléico (ou ácido ricinoléico), e cada uma delas apresenta um grupo hidroxila no carbono 12. Para a formação da poliuretana, a reação de pré-polimerização é feita entre um diisocianato e um polioliol, e a polimerização final pode ser realizada com um dioliol, diamina ou polioliol. Deste modo, a poliuretana vegetal derivada do óleo de mamona é composta por diisocianatos lineares alifáticos, tais como o hexametilenodisocianato (HDI), isofuranodisocianato (IPDI) e o difenilmetanodisocianato (MDI). Ela pode ser utilizada pura ou em associação com o carbonato de cálcio. A função do carbonato é fornecer íons cálcio, o que facilita a troca iônica na interface osso-resina, com incremento do mecanismo de deposição de cálcio na matriz colágena nas várias fases do processo de reparação óssea.

Atualmente, no Brasil, a poliuretana derivada de mamona é vendida comercialmente pela Biomecânica, com o nome de BioOsteo® (Bioosteo, 2004) e pela Poliquil Araraquara Polímeros Químicos Ltda. (Anvisa, 2005). Segundo informações do fabricante (Bioosteo, 2004), o BioOsteo® é um polímero formado pela reação uretana dos seus dois componentes básicos, o polioliol (*OH*) e o pré-polímero (*NCO*). Foi quimicamente projetado para prover sítios ativos [grupos de hidroxila (*-OH*) reagindo com os grupos isocianato (*-NCO*)]. Além disso, possui carbonato de cálcio, como material de preenchimento não ativo (não interfere na reação principal), o que melhora sua capacidade de integração com o tecido ósseo. A reação de policondensação termina o polímero Bioethano (polímero uretana biologicamente ativo) com uma proporção controlada e balanceada, na razão de um *OH* para um *NCO*, nos seus sítios ativos. No produto final do polímero BioOsteo® não existem sítios ativos livres (*OH* e/ou *NCO*) para futura interação com os tecidos

onde foi implantado, mas apenas uma quantidade previamente calculada de cadeias uretanas, que atraem o cálcio orgânico no processo de integração óssea. As indicações clínicas para sua utilização incluem a fixação de próteses, a reconstituição e o preenchimento de espaços ósseos.

A presença de porosidade na arquitetura interna de um biomaterial é condição fundamental para a estabilização e neoformação tecidual. Por apresentar poros irregulares, o polímero de mamona atuaria como material osteocondutivo (Leonel et al., 2003). Contudo, conforme Ignácio (1995), os resultados experimentais utilizando o polímero de mamona são ainda controversos, com relação ao preenchimento desses poros após a inserção em tecidos vivos.

Ohara et al. (1995) implantaram a resina de mamona intra-óssea (côndilo medial) e intra-articularmente no joelho de coelhos, respectivamente na forma de corpo-de-prova com cálcio e em gel. Os animais foram avaliados aos três, 15 e 40 dias de pós-operatório. Nos joelhos que receberam o gel foi detectado sinovite e derrame sinovial apenas aos três dias de pós-operatório. Pelo exame histológico do côndilo medial, aos 15 dias de pós-operatório, foi evidenciada presença de tecido conjuntivo fibroso envolvendo o material implantado, com raros osteoblastos e osteoclastos na periferia. Aos 40 dias de pós-operatório, constataram neoformação óssea com abundantes osteoblastos e trabéculas ósseas ao redor e nas lacunas do implante. Em nenhum dos momentos de avaliação observaram reação inflamatória com presença de células gigantes ou do tipo corpo-estranho, sugerindo biocompatibilidade da resina. Além disso, não detectaram qualquer agressão do osso à resina, seja por reabsorção ou substituição do material.

Dois defeitos de 5 mm de diâmetro na calota craniana de 10 coelhos foram promovidos por Oliveira et al. (1995), sendo um tratado com poliuretana derivado do óleo de mamona e o outro com osso cortical autógeno triturado. No defeito que recebeu poliuretana notaram ausência de reação inflamatória e formação parcial de tecido ósseo. Por sua vez, o defeito tratado com enxerto apresentava incorporação em fase de remodelação.

Ao implantarem a resina poliuretana no arco zigomático de ratos, Caruzo & Roslindo (1995) concluíram, por análises histológicas efetuadas aos 30 e 60 dias de pós-operatório, que o material foi biocompatível. A presença de células multinucleadas sugeriu reabsorção do material, e a persistência do material implantado indicou retardo no reparo ósseo.

Defeitos ósseos foram induzidos com fresa cilíndrica na mandíbula de 30 ratos e preenchidos com a poliuretana vegetal acrescida de carbonato de cálcio. Pelas avaliações histológicas efetuadas aos 15, 25 e 40 dias de pós-cirúrgico, verificou-se a ocorrência de aceitação orgânica da resina, não ocorrendo formação de cápsula ou migração local de células inflamatórias. Além disso, o carbonato de cálcio auxiliou a neoformação óssea estimulando o aparecimento de células osteogênicas (Teixeira & Ramalho, 1995).

Ignácio et al. (1995) aplicaram o polímero da mamona em defeitos segmentares de 2cm de comprimento induzidos no rádio de coelhos, que foram avaliados com duas, quatro, oito e 16 semanas de pós-operatório. Radiograficamente detectaram união do polímero aos segmentos ósseos proximal e distal, e a partir destes ocorreu neoformação óssea periosteal centrípeta, com desenvolvimento de uma nova cortical. Ao exame histológico, esta última revelou-se uma cortical delgada e ainda incompleta. Além disso, não foi detectado crescimento de tecido ósseo nos poros ou no corpo do polímero, nem a presença de células gigantes ou reação tipo corpo-estranho.

Defeitos cilíndricos promovidos na metáfise distal do fêmur de cães foram preenchidos com polímero de mamona na forma porosa ou compacta e, então avaliados por meio de exames radiográficos, tomografia computadorizada, microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica, aos três, seis e 12 meses de pós-cirúrgico. A microscopia eletrônica de varredura evidenciou, em todos os momentos de observação, a presença de estrutura semelhante a tecido conjuntivo fibroso, na interface entre a poliuretana e o tecido ósseo adjacente. Em todos os segmentos analisados à microscopia óptica, ambas as formas de implante, encontravam-se envoltas por tecido conjuntivo com alta densidade de fibras colágenas, dispostas paralelamente à superfície do material, e com presença de fibroblastos, que se interpunham entre o implante e o tecido ósseo adjacente. Em nenhum local foi observada a presença de tecido ósseo em contato com a superfície do biomaterial, nem sinais indicativos de degradação do mesmo, concluindo-se ser o implante de poliuretana espaçador biológico biocompatível, biotolerante e sem osteointegração (Ignácio, 1999).

O poliuretano de óleo de mamona foi utilizado por Rezende et al. (2001) na forma de prótese como substituo parcial do tendão calcâneo comum em

coelhos. Clinicamente, o poliuretano de mamona mostrou-se biocompatível, visto não ter induzido reação desfavorável que comprometesse a cicatrização tendínea.

Calixto et al. (2001) testaram o floculado de resina de mamona, de formato irregular e tamanho variável, no reparo ósseo alveolar de 80 ratos. Pelo exame histológico, aos sete dias de pós-operatório, os flocos de resina de mamona estavam circundados por tecido de granulação com a presença de trabéculas ósseas imaturas. A partir dos 14 dias de pós-operatório, notaram uma quantidade progressivamente maior de tecido ósseo em maturação ao redor dos flocos, no geral com a presença de tecido conjuntivo interposto. A presença da resina não suscitou uma resposta inflamatória persistente, em que pese a ocorrência de uma quantidade discreta de células gigantes tipo corpo-estranho aderidas à sua superfície. Os autores concluíram ser o produto biocompatível e capaz de certo grau de integração óssea direta. O formato irregular dos flocos não favoreceu a aderência aos tecidos reparacionais.

A ação de agentes antimicrobianos contra *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella nigrescens*, *Clostridium perfringes* e *Bacteroides fragilis* foi avaliada *in vitro*. O digluconato de clorexidina 2% demonstrou a melhor eficiência, seguido pelo detergente de mamona, paramonoclorofenol canforado e hidróxido de cálcio (Ferreira et al., 2002).

Ziliotto et al. (2003) empregaram o polímero extraído da mamona para preenchimento do canal de aloenxerto conservado em glicerina 98%, que foi interposto para o tratamento de falha óssea segmentar induzida no rádio e ulna de cães. Histologicamente, na interface entre o polímero e o osso, foi observada a presença de infiltrado inflamatório mononuclear. Não houve osteointegração e o biomaterial não foi absorvido nem substituído por tecido ósseo. Segundo os autores, o polímero foi um substituto adequado ao cimento ósseo, que é o material tradicionalmente utilizado nestas circunstâncias.

A poliuretana em formato de pino foi aplicada, por Maria et al. (2003), na tíbia de 12 cães, com idade entre 3 e 4 meses, para avaliar sua biocompatibilidade. Ao exame histopatológico, o produto não desencadeou processos infecciosos ou de rejeição e foi biotolerante, porém não ocorreu osteointegração.

Com o objetivo de se avaliar a importância da porosidade interna do polímero de mamona durante a neoformação óssea, Leonel et al. (2003) realizaram

ressecação de um segmento do arco zigomático em ratos, preenchendo-o com polímero derivado do óleo de mamona em forma de blocos pré-polimerizados ou em forma de biomassa. Os resultados histopatológicos demonstraram a existência de neoformação tecidual em meio aos poros de ambos os materiais aos 15, 30, 60, 90 e 120 dias de avaliação. Ocorreu progressiva diminuição no volume do polímero, à medida que este foi substituído por tecido ósseo.

Leonel et al. (2004) empregaram blocos pré-polimerizados que foram fixados com resina, ambos derivados do óleo de mamona, para a reconstrução de defeito segmentar de 2mm no arco zigomático de ratos. No exame histológico efetuado aos 15 e 30 dias de pós-cirúrgico havia presença de tecido conjuntivo denso ao redor do polímero, sem associação com células inflamatórias. Com 60 dias de pós-operatório, a quantidade do polímero encontrava-se reduzida, devido à sua substituição por tecido ósseo neoformado, e os poros do polímero remanescente estavam preenchidos por tecido conjuntivo denso, com presença de macrófagos. Aos 90 e 120 dias de pós-operatório, uma considerável parte do polímero havia sido substituído por tecido ósseo, permanecendo ainda fragmentos circundados por tecido ósseo. A neoformação óssea ocorreu pela deposição inicial de uma matriz osteóide não mineralizada, que posteriormente originou um tecido ósseo lamelar. O biomaterial foi classificado como bioinerte por permanecer no defeito, evitando o preenchimento do mesmo por tecido fibroso, sendo lentamente substituído por tecido ósseo. Os autores concluíram ser o biomaterial osteocondutor, uma vez que ocorreu o crescimento de tecido ósseo sobre sua superfície e em meio aos seus poros, desde os períodos iniciais de observação.

Em estudo *in vitro* da biocompatibilidade da poliuretana *Ricinus communis* em três composições químicas diferentes, Beloti et al. (2003) observaram que os eventos celulares iniciais não foram afetados pela composição; contudo, a poliuretana combinada com carbonato de cálcio ou fosfato de cálcio favoreceu os eventos que promovem a mineralização da matriz.

DelCarlo et al. (2003) trataram defeitos segmentares de 1,5 cm promovidos no rádio de coelhos com cilindros de polímero de mamona, acrescido de 40% de carbonato de cálcio, associado ou não à impregnação com medula óssea autógena. Os cilindros foram apenas encaixados no local, sem uso de fixação interna ou externa. Ocorreu osteogênese e osteocondução, especialmente quando acrescido de medula óssea. Quando os mesmos tipos de implantes foram aplicados

em sítio heterotópico (músculo reto abdominal) de coelhos, detectaram-se células gigantes e tecido fibroso envolvendo o material, que foi considerado não osteoindutor, visto a manutenção da forma sem qualquer evidência de crescimento ósseo à histologia. Os autores concluíram que o implante foi biocompatível, mas sem capacidade de osteoindução.

Discos de poliuretana vegetal (1mm de espessura e 5mm de diâmetro) com e sem carbonato de cálcio, foram implantados no tecido conjuntivo subcutâneo da região dorsal de camundongos, que foram avaliados histologicamente aos sete, 20, 30 e 60 dias de pós-operatório. No período inicial (7 dias) havia discreta inflamação e presença de macrófagos. Aos 20 dias, ocorreu desaparecimento da inflamação e formação de cápsula conjuntiva delicada, constituída por poucas camadas de fibroblastos e fibras colágenas, dispostas paralelamente aos discos, que foi enquadrada como reação nível 2. Esta se refere à presença de pequena reação tecidual, a qual está mais relacionada ao trauma cirúrgico do que às propriedades do material inserido no tecido conjuntivo. Nos últimos períodos (30 e 60 dias), um tecido fibroso denso envolvia os tubos de polietileno e, para ambos os materiais, o tecido conjuntivo adjacente apresentava características histológicas de normalidade. Os autores concluíram que a resina de mamona foi bem aceita pelo tecido conjuntivo do dorso de camundongos e, o acréscimo de carbonato de cálcio, não modificou a sua compatibilidade (Mastrantonio & Ramalho, 2003).

Mendoza-Barrera et al. (2003) estudaram a adição de fator de crescimento epidermal ao polímero de mamona, que foi utilizado em defeitos de 1mm de diâmetro produzidos na tíbia de ratos. Utilizaram a espectroscopia fotoacústica e a difração por raio-X para avaliação do reparo ósseo e osteointegração com três semanas de pós-operatório e, a espectroscopia por energia dispersiva, por um período de até 8 semanas. Os autores concluíram que a adição do fator de crescimento epidermal acelerou o processo de reparação óssea quando comparado com o grupo tratado apenas com polímero de mamona e o controle sem tratamento, por estimular a proliferação e divisão celular. Houve diminuição na produção óssea quando se empregou o polímero de mamona isoladamente.

A caracterização e a biointegração do polímero de mamona BioOsteo® injetado em defeitos de 1mm de diâmetro, produzidos na superfície craniomedial da tíbia de ratos foram estudadas por Mendoza-Barrera et al. (2004). A osteointegração

foi acompanhada por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia por energia dispersiva e difração por raio-X. Não foi detectada reação inflamatória ou rejeição do implante no período de até oito semanas de observação. Além disso, ocorreu mínima reabsorção do material implantado por ação celular em sua superfície e diminuição na velocidade da reparação óssea nos membros tratados com o polímero, quando comparados ao controle sem tratamento. Os autores concluíram ser o BioOsteo® indicado mais para ossos chatos do que longos, em especial, os faciais.

Figueiredo et al. (2004) compararam implantes de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita porosa de coral, poliuretana de mamona em forma de biomassa e enxerto ósseo autógeno, no reparo de defeito ósseo de 6x10mm de diâmetro realizado no fêmur de coelhos. As avaliações radiológicas, tomográficas e histológicas foram realizadas com quatro e 12 semanas de pós-operatório. Os autores concluíram que o implante de osso bovino desvitalizado produz maior reação inflamatória, maior formação de cavidades císticas e reparação tecidual guiada mais lenta, quando comparado ao enxerto ósseo autógeno e aos implantes de hidroxiapatita porosa de coral e poliuretana de mamona. Esta última mostrou maior propriedade osteocondutiva e menor reação inflamatória que o osso bovino desvitalizado, com invasão de seus poros e preenchimento das cavidades císticas por tecido ósseo, mostrando-se eficaz como arcabouço para a reparação tecidual guiada.

Placas e espaçadores feitos de polímero derivado do óleo de mamona foram utilizados por Laranjeira et al. (2004) para a realização de tração linear, fixação e fusão vertebral cervical em 20 cães adultos, concluindo, clínica e radiograficamente, serem estes eficientes em promover a tração linear e a estabilização vertebral cervical, porém sem a ocorrência de fusão vertebral.

2.2 Enxertos ósseos

Os enxertos ósseos favorecem a consolidação óssea, provendo uma fonte osteogênica, osteocondutiva, osteoindutiva e, dependendo do tipo, suporte mecânico (Fitch et al., 1997). Segundo Perry (1999), os enxertos ósseos e seus

substitutos têm um ou mais dos seguintes componentes: células tronco indiferenciadas, fatores de crescimento, e um arcabouço estrutural. Cada um deles tem sido utilizado individualmente ou em várias combinações no tratamento de defeitos ósseos. As células tronco indiferenciadas são caracterizadas por uma baixa taxa de crescimento, capacidade de regeneração e a habilidade de se diferenciar entre as várias linhagens celulares. Elas substituem células que foram perdidas pela senilidade ou por injúria. Os fatores de crescimento são proteínas que induzem as células tronco a se proliferarem ou se diferenciarem em células tipo osteoblasto. O arcabouço estrutural auxilia na diferenciação das células tronco e, embora não osteogênico, pode aumentar o potencial osteogênico das células tronco e dos fatores de crescimento.

De acordo com Bauer (2000), o termo incorporação é utilizado para descrever as interações biológicas entre o enxerto e o sítio receptor. Esta resposta inclui: a reação inflamatória do sítio receptor do enxerto devido ao trauma da preparação cirúrgica; a reação inflamatória e/ou imune do sítio receptor ao próprio material enxertado; e o processo de proliferação celular, migração, diferenciação e revascularização, que resulta na formação de novo osso e união entre o enxerto e o sítio receptor. A taxa e a extensão da incorporação são dependentes do tipo de material enxertado, dos tecidos na margem do sítio receptor e estado fisiológico sistêmico do receptor. A mecânica no ambiente do enxerto também tem profundo efeito na revascularização e na diferenciação celular. Se o material ósseo enxertado não tiver uma estabilidade mecânica adequada, haverá proliferação de tecido de granulação e fibrose na interface entre o enxerto e o sítio receptor, dificultando a incorporação.

O auto-enxerto de osso fresco é o mais efetivo em promover a consolidação, já que proporciona células viáveis e elimina os problemas de histocompatibilidade e transmissão de doenças (Goldberg & Stevenson, 1987). Por outro lado, eles têm como desvantagens: a necessidade de dois tempos cirúrgicos, colheita e transplante (Pinto-Júnior, 1990); a exigência de um novo acesso cirúrgico e a limitação em quantidade (Itho et al., 1998); o aumento do tempo anestésico, o risco de infecções e a perda de sangue intra-operatória (Fitch et al., 1997). Além disso, Moore et al. (2001) também relatam como limitações as complicações da ferida cirúrgica, a perda de sensibilidade local e, o mais importante, a dor crônica no local da colheita. Esta última tem sido relatada como sendo superior a três meses,

em mais de 15% dos pacientes humanos, que foram submetidos à colheita de enxerto ilíaco.

Em estudo retrospectivo de 414 pacientes humanos submetidos à colheita de enxerto ósseo esponjoso a partir da crista do íleo, Arrington et al. (1996) identificaram 41 casos (10%) de complicações menores, tais como infecções e seromas superficiais, e pequenos hematomas. Em outros 24 casos (5,8%) foram observadas complicações mais importantes como a herniação do conteúdo abdominal, injúrias vasculares, infecções profundas, injúrias neurológicas, hematomas profundos e fratura da asa do íleo. Entretanto, os autores relatam que com adequado planejamento e técnica cirúrgica apropriada, a incidência dessas complicações pode ser reduzida.

Segundo Perry (1999), a limitação primária da utilização de auto-enxerto ósseo esponjoso é a quantidade de enxerto que é rapidamente obtida. Fontes de osso esponjoso são a crista ilíaca, a região distal do fêmur e o trocanter maior, além da região proximal da tíbia e da porção cranialateral do úmero (Perry, 1999; Finkemeier, 2002). Johnson (1986) em seu experimento utilizando auto-enxerto ósseo esponjoso em cães concluiu que nos animais de porte médio e grande, a colheita de osso esponjoso a partir da tíbia é um procedimento seguro.

A despeito de suas limitações, auto-enxertos ósseos esponjosos continuam a ser os mais efetivos meios pelos quais a consolidação óssea é alcançada clinicamente (Lane, 1999). Após a colheita, o enxerto esponjoso autólogo deve ser aplicado o mais rapidamente possível (Piermateii, 1997). Uma vez no local apropriado, a maioria das células transplantadas morre como resultado de isquemia ou são induzidas à apoptose. Entre as células mais resistentes à isquemia estão as células mesenquimais primitivas presentes na medula óssea e as progenitoras de células endoteliais, que são estimuladas a proliferar pela mudança na tensão de oxigênio, pH e citocinas locais resultantes do transplante (Bauer, 2000). Há evidências que osso de origem intramembranosa é mais osteoindutivo que o de origem endocondral (Perry, 1999).

As indicações para a utilização primária de auto-enxerto esponjoso incluem o preenchimento de defeitos corticais após curetagem ou excisão de cistos ósseos, tumores ou infecções crônicas; como um auxiliar em artrodeses de articulações danificadas por traumas, doenças ou deformidades; para substituir fragmentos corticais avasculares. Além disto, também são utilizados para promover

a consolidação nos casos de pseudo-artroses, em casos de não-união ou união retardada de fraturas, associadas ou não a osteomielite; como auxiliar no reparo de fraturas distais de rádio-ulna, particularmente em cães de pequeno porte, devido ao tênue suprimento vascular desta região; e para restabelecer a continuidade de um osso severamente fraturado (Schena, 1983; Alexander, 1987).

Miclau et al. (1996) criaram orifícios de 4,5cm de diâmetro na diáfise femoral de cães esqueleticamente maduros para avaliar a evolução do reparo ósseo utilizando auto-enxerto esponjoso colhido a partir do úmero proximal. Os autores concluíram que, ao contrário dos estudos realizados em defeitos ósseos segmentares, os orifícios apresentaram menor formação de calo ósseo e ausência de tecido cartilaginoso em todos os períodos de observação, e a incorporação do enxerto ocorre de maneira mais rápida e fidedigna. Além disso, foi suposto que a melhora na incorporação do enxerto estaria associada à menor ruptura do suprimento sangüíneo, tanto endosteal quanto periosteal, que este modelo propicia.

Iamaguti et al. (1995) verificaram em seu experimento com auto-enxerto ósseo esponjoso em defeitos produzidos nas tíbias de coelhos que este tipo de enxerto contribui para acelerar os processos de osteoindução, osteocondução e osteogênese, abreviando o período de consolidação. Harasen (1997) obteve sucesso ao tratar uma fratura fragmentada de fêmur, com perda óssea, em um gato de 18 meses por meio de aloenxerto ósseo cortical e auto-enxerto ósseo esponjoso.

A ocorrência de fratura em espiral do úmero de um cão, após 24 horas do procedimento cirúrgico de colheita de auto-enxerto esponjoso para a realização de artrodese calcâneoquartal foi relatada por Ferguson (1996). A causa da fratura foi associada ao direcionamento e posicionamento do orifício de colheita além do nível do tubérculo maior. A partir de exames radiográficos, foi constatado que o orifício havia sido realizado na diáfise proximal do úmero, ao invés da metáfise.

Enxertos ósseos autólogos continuarão, por hora, a ocupar um importante lugar no tratamento dos casos de não-união óssea. No futuro, entretanto, a sua utilização deve diminuir e, com o desenvolvimento de alternativas mais efetivas, eles podem, eventualmente, se tornar obsoletos (Keating, 2001).

OBJETIVO

3 OBJETIVO

Avaliar, por meio de exames radiográficos e histológicos, a função da resina de poliuretana derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*), na forma de grânulos, no tratamento de defeito ósseo segmentar induzido no rádio de coelhos, tendo como padrão comparativo o enxerto ósseo esponjoso autólogo.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e ambiente de experimentação

O presente protocolo experimental foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista (Unesp) Campus de Botucatu (Anexo 1).

Foram utilizados 20 coelhos da raça Norfolk, fêmeas, com idade entre 12 e 14 meses, pesando entre 4 e 5 kg, provenientes do Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu. Os animais foram numerados de um a 20 e divididos, aleatoriamente, em grupos eqüitativos de acordo com os momentos de observação no período pós-operatório (G1=15 dias, G2=30 dias, G3=60 dias, G4=120 dias). Em seguida, foram alojados em gaiolas individuais 60x60x60cm, suspensas do solo, onde receberam, *ad libitum*, água e ração comercial¹ para coelhos.

4.2 Técnica anestésica

Os animais foram tranqüilizados com acepromazina² (0,1 mg/kg/IV) e, 15 minutos após, anestesiados com uma associação de tiletamina-zolazepam³ (10mg/kg) e cloridrato de xilazina⁴ (0,5 mg/kg), aplicada por via intravenosa. Quando necessário, a manutenção anestésica foi realizada com tiletamina-zolazepam (3mg/kg/IV).

¹NUTRICOELHO - Purina - Rod. Campinas/Paulínia, Km 123 - Paulínia, SP.

²ACEPRAN 0,2% - Univet S.A. – Rua Clímaco Barbosa, 700 – São Paulo, SP.

³TELAZOL – Fort Dodge – Saúde Animal Ltda – Rua Luiz Fernando Rodriguez, 1701 – Campinas, SP.

⁴ROMPUN – Bayer S.A. – Rua Domingos Jorge, 1000 – São Paulo, SP.

4.3 Procedimento cirúrgico

Após a tricotomia de ambos os membros torácicos, os coelhos foram inicialmente posicionados em decúbito lateral direito. A anti-sepsia da área operatória foi efetuada com álcool iodado e a porção distal à articulação antebraquiocárpica esquerda isolada com atadura de crepe estéril, sendo então dispostos os panos de campo operatório.

Realizou-se uma incisão longitudinal de pele e tecido subcutâneo na região craniomedial do terço médio-proximal do rádio direito. Os músculos extensor radial do carpo e extensor digital comum foram afastados, o músculo pronador redondo seccionado e, então, isolou-se o rádio. Uma falha óssea segmentar de 1,0 cm de comprimento foi induzida no terço médio-proximal do rádio, tendo como padrão uma régua metálica estéril, aproximadamente 4,5 cm acima da articulação rádio-cárpica, por meio da retirada de fragmento osteoperiosteal com o uso de serra óssea circular. Durante a secção óssea, o local foi irrigado com solução salina 0,9% estéril.

Para a colheita do enxerto esponjoso, o membro torácico esquerdo foi estendido caudalmente de forma a expor a região da articulação escápulo-umeral esquerda. Efetuou-se incisão longitudinal de pele e tecido subcutâneo sobre a face craniolateral da porção proximal do úmero, a qual foi isolada após a separação dos músculos infra-espinhoso e deltóide, atingindo assim a cortical óssea. Com o auxílio de uma broca de 2mm de diâmetro e furadeira elétrica, a cortical óssea do tubérculo maior do úmero foi perfurada, permitindo o acesso à porção esponjosa do osso. Colheu-se 100 mg de enxerto esponjoso com o auxílio de uma cureta de Meyhoefer nº 02, que foi acondicionado em placa de Petri estéril até o momento da aplicação. Aproximaram-se os músculos infraespinhoso e deltóide com sutura tipo Sultan e o tecido subcutâneo com sutura contínua simples, utilizando-se fio de náilon monofilamento 4-0. A síntese da pele foi realizada com pontos simples isolados empregando-se fio de náilon monofilamento 3-0.

O enxerto ósseo esponjoso foi aplicado no defeito segmentar do rádio, de forma a preenchê-lo totalmente. O tecido subcutâneo foi aproximado com sutura contínua simples com fio de náilon monofilamento 4-0 de forma a manter o enxerto esponjoso no local transplantado, e a pele suturada com pontos simples isolados utilizando-se fio de náilon monofilamento 3-0.

A seguir, o animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo e induziu-se uma falha segmentar no rádio esquerdo, que foi preenchida com 100 mg de resina de poliuretana na forma de grânulos⁵, (diâmetro médio dos grânulos de 850 µm, poros de 1 a 2 µm e concentração de 34,5% de carbonato de cálcio na composição), misturada com 0,1 ml de sangue autólogo. A síntese dos tecidos foi realizada de forma similar à descrita anteriormente, para o enxerto ósseo esponjoso.

⁵BIO - OSTEO CHIPS – Biomecânica – Rua 2, s/n, Primeiro Distrito Industrial – Jaú, SP.

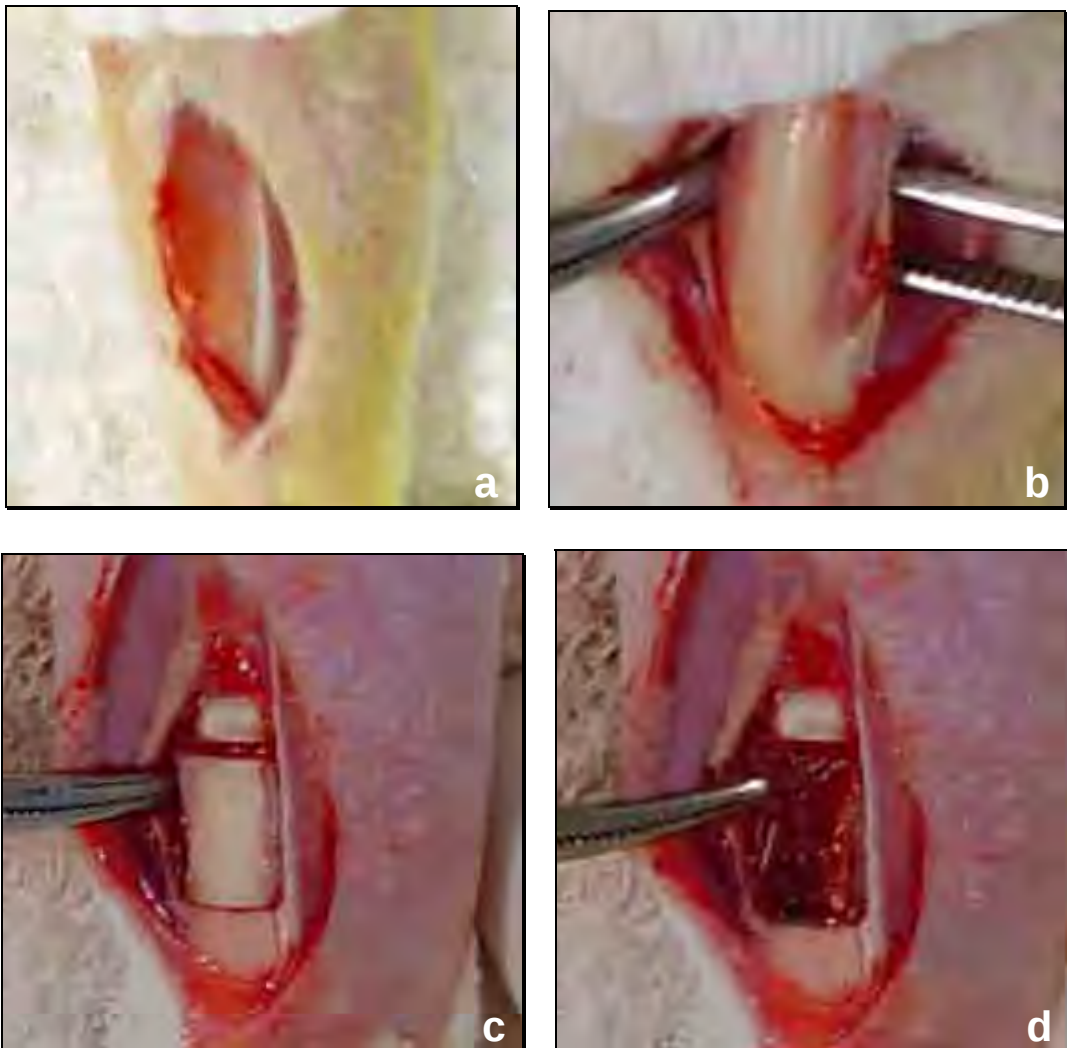


Figura 1 – Indução de defeito ósseo segmentar no rádio de coelho. Incisão de pele na face craniomedial da região do terço médio-proximal do rádio (a). Exposição do rádio após afastamento muscular (b). Secção de fragmento osteoperiosteal do terço médio-proximal do rádio (c). Defeito ósseo segmentar de 1cm de comprimento (d).

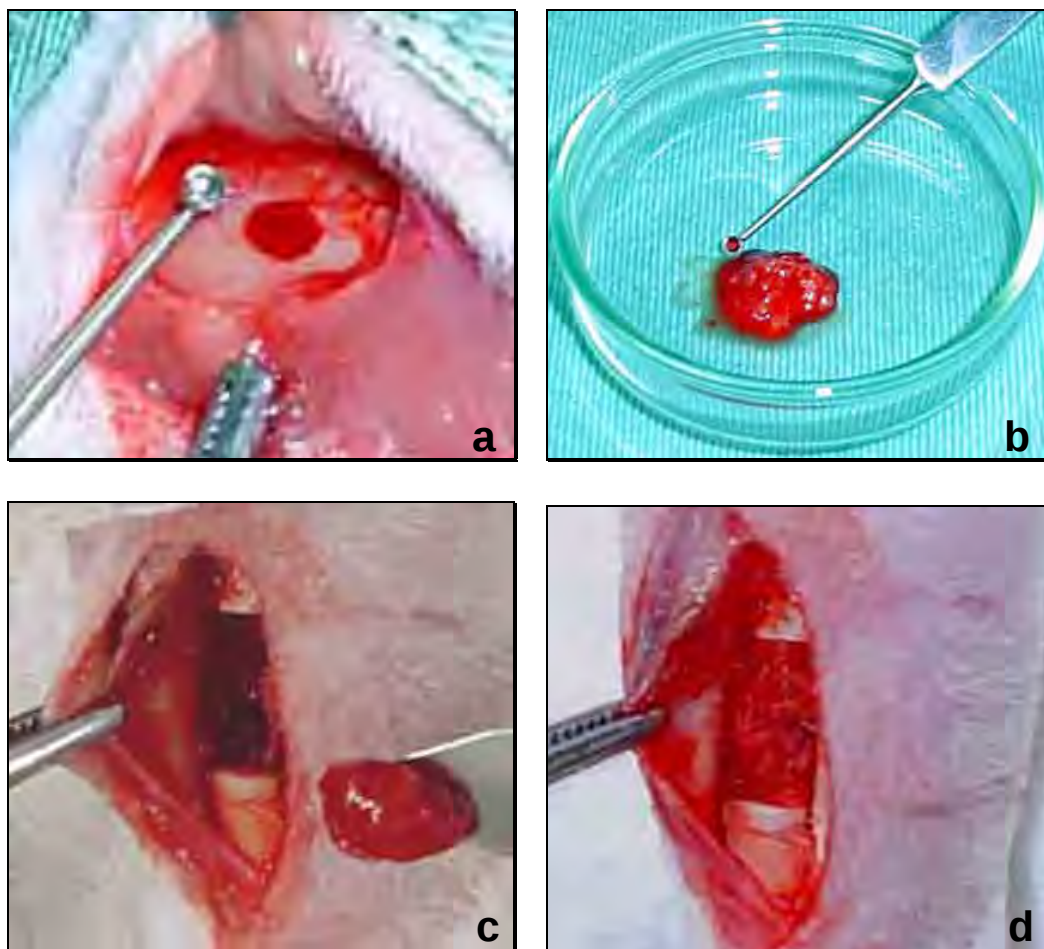


Figura 2 – Tratamento de defeito ósseo segmentar induzido no rádio direito de coelho por meio de enxerto ósseo esponjoso autólogo. Colheita do enxerto ósseo esponjoso da região craniolateral da porção proximal do úmero esquerdo com uso de cureta (a). Enxerto acondicionado em placa de Petri até o momento da aplicação (b). Aplicação do enxerto esponjoso no defeito ósseo criado (c). Defeito ósseo segmentar totalmente preenchido por auto-enxerto ósseo esponjoso (d).

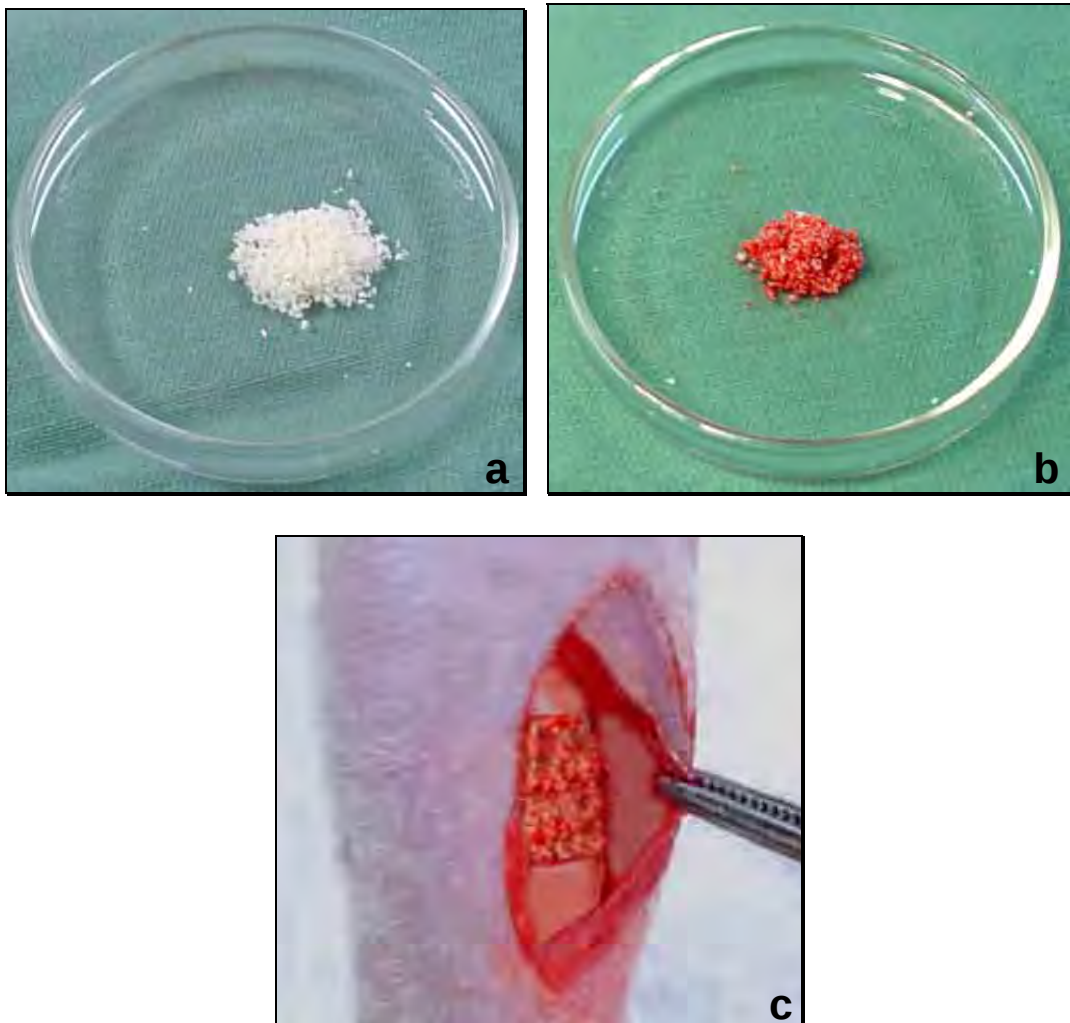


Figura 3 – Tratamento de defeito ósseo segmentar induzido no rádio esquerdo de coelho por meio de polímero de mamona na forma de grânulos. Grânulos de polímero de mamona antes (a) e após (b) a mistura com 0,1 ml de sangue autólogo. Defeito ósseo segmentar totalmente preenchido pelo polímero de mamona misturado com sangue (c).

4.4 Condutas pré- e pós-operatórias

No momento da tranquilização e quatro dias consecutivos após a cirurgia foram aplicadas enrofloxacina⁶ (5mg/kg via subcutânea, a cada 24 horas) e buprenorfina⁷ (0,03 mg/kg via subcutânea, a cada 12 horas). A flunixinina meglumina⁸ foi aplicada no pós-cirúrgico imediato e por mais dois dias de pós-operatório (1mg/kg via subcutânea, a cada 24 horas). As feridas cirúrgicas foram limpas com solução salina 0,9% estéril e os pontos cutâneos removidos no 10º dia de pós-operatório.

4.5 Avaliação clínica

Constou de observações quanto ao aspecto da ferida cirúrgica, presença ou não de edema nos membros, apoio ao solo, ingestão de ração e água, defecação e micção.

4.6 Exames radiográficos

Foram realizadas avaliações radiográficas dos membros torácicos em posições lateral e craniocaudal imediatamente ao procedimento cirúrgico e aos 15, 30, 60 e 120 dias de pós-operatório. O filme utilizado foi Kodak, base verde, 18x24cm, sendo a distância foco filme de 90 cm, kV 45 e mAmp 3,2. A revelação foi por processadora automática Macrotec⁹. Avaliou-se o defeito ósseo quanto ao tamanho, à presença ou não do biomaterial, e à formação ou não de tecido ósseo.

Desenhos dos contornos da área do total do defeito segmentar e das áreas de neoformação óssea foram realizados por sobreposição nas imagens radiográficas, com folhas de transparência, aos 30, 60 e 120 dias de pós-operatório.

⁶BAYTRIL 5% - Bayer S.A. - Rua Domingos Jorge, 1000 - São Paulo, SP.

⁷TEMGESIC – Schering-Plough S.A. – Estrada dos Bandeirantes, 3091 – Rio de Janeiro, RJ.

⁸BANAMINE – Schering-Plough Veterinária – Estrada dos Bandeirantes, 3091 – Rio de Janeiro, RJ.

⁹MACROTEC - Ind. e Com. de Equipamentos Ltda.

As imagens dos desenhos foram capturadas por câmera digital Sony XC77 e as áreas foram medidas usando-se um sistema de análise de imagem ZEISS KS300 Version 3.0, ambos cedido pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu. Obteve-se a porcentagem de neoformação óssea pela divisão da área de neoformação óssea pela área total do defeito.

4.7 Exame *histológico*

4.7.1 *Colheita e processamento histológico de inclusão*

Para a realização do processamento histológico, foram submetidos à eutanásia cinco coelhos em cada um dos momentos de observação, ou seja, aos 15, 30, 60 e 120 dias de pós-cirúrgico. Os animais foram previamente tranqüilizados com acepromazina (0,5 mg/kg via intravenosa) e, 15 minutos após, foi induzida anestesia geral com pentobarbital sódico (15 mg/kg via intravenosa)¹⁰, seguida da aplicação de cloreto de potássio a 19,1% intravenoso¹¹ até obtenção de parada cardiorrespiratória.

A região da falha óssea segmentar e as porções proximais e distais da mesma, incluindo a ulna, foram colhidas (Figura 4) e fixadas em formol tamponado a 10%, por três dias. Após este período, o material foi mantido em solução de formol tamponado a 10% e ácido acético a 10%, a qual era trocada a cada 15 dias, até a obtenção de descalcificação total, que ocorreu após 3 meses. O processamento de desidratação, diafanização e inclusão em Paraplast Plus¹² seguiu o seguinte protocolo:

1. lavagem em água corrente por 24 horas;
2. banho em álcool etílico a 70% por 24 horas;
3. banho de uma hora em álcool etílico a 80%;
4. banho de uma hora em álcool etílico a 90%;

¹⁰ HYPNOL – Cristália – Rodovia Itapira- Lindóia, km 14 – Itapira, SP.

¹¹ CLORETO DE POTÁSSIO – Ariston Ind. Quím. e Farm. Ltda. – Rua Adherbal Stresser, 84 – São Paulo, SP.

¹² PARAPLAST PLUS – Oxford – Kendal – Sigma.

5. banho de uma hora em álcool etílico a 95%;
6. três banhos de uma hora em álcool etílico 100%;
7. banho de 30 min em solução contendo 50% de xilol e 50% de álcool etílico 100%;
8. dois banhos de 30 min em xilol;
9. três banhos de uma hora em parafina em estufa a 60°C;
10. inclusão em Paraplast.

4.7.2 Obtenção dos cortes histológicos e imagens digitalizadas

Cortes histológicos, no plano longitudinal, de 5µm de espessura foram produzidos em micrótomo rotativo automático (Leica) e corados pela técnica de hematoxilina e eosina. Os cortes foram analisados em microscópio Leica DMLB ou em microscópio Zeiss Axioptio pela microscopia de luz e de polarização. As imagens foram digitalizadas por uma câmera digital DC300FX (Leica) ou AxioCam HRc (Zeiss).



Figura 4 – Demonstração em exame radiográfico do local colhido para o processamento histológico. Incluiu-se a região do defeito ósseo segmentar e suas porções proximais e distais, bem como a porção da ulna contígua à área.

4.7.3 Exame morfométrico

Com as imagens digitalizadas, foram realizadas análises morfométricas para se determinar, quantitativamente, as áreas ocupadas por tecido cartilaginoso, tecido ósseo neoformado e área de polímero na região do defeito ósseo. As mensurações foram realizadas em cortes histológicos profundos, que abrangiam o centro do defeito, utilizando-se o programa Leica QWin Standard Version 3.1.0.

4.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Quando o conjunto de dados para a comparação de dois grupos experimentais atendia aos requisitos para a aplicação da estatística paramétrica, utilizou-se o teste *t* de Student. Para a comparação de quatro diferentes momentos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), seguida de teste a posteriori de Tukey. Foram consideradas significativas as diferenças associadas à probabilidade $p < 0,05$. O tratamento estatístico foi operacionalizado pelo programa GraphPad InStat, versão 3.02.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação clínico-cirúrgica

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sem qualquer tipo de intercorrência, com tempo de duração média de 25 minutos para o membro tratado com enxerto ósseo esponjoso e 15 minutos para o membro tratado com biomaterial. O volume de 100 mg, necessário para o preenchimento do defeito, foi facilmente obtido no local de colheita escolhido para obtenção do enxerto ósseo autólogo.

Após o retorno anestésico, que variou entre uma e duas horas, os animais apoiavam o membro ao solo sem sinais de claudicação, porém a deambulação foi mais evidente após 48 horas. As feridas cirúrgicas estavam totalmente cicatrizadas após o sétimo dia de pós-operatório. Nenhum coelho apresentou sinais de infecção ou deiscência de pontos. A ingestão de água e alimentos manteve-se normal, bem como a defecação e micção.

5.2 Exames radiográficos

Em virtude da sobreposição da ulna na posição craniocaudal, os resultados da avaliação radiográfica foram baseados, em especial, na posição lateral, como se segue.

5.2.1 Membro tratado com auto-enxerto esponjoso

Na avaliação pós-operatória imediata, o comprimento do defeito segmentar manteve o padrão estabelecido de um centímetro em todos os grupos e as superfícies de corte estavam homogêneas. O eixo ósseo manteve-se sem alterações nos diferentes períodos de observação.

Verificou-se no grupo G1 (15 dias de pós-operatório) discreta reação periosteal das extremidades osteotomizadas do rádio em quatro dos cinco animais (n^{os} 2, 3, 4 e 5). Formação óssea foi observada em apenas três coelhos (n^{os} 3, 4 e 5). Em um deles (animal n^o 3) ela ocorreu a partir da ulna e da extremidade osteotomizada proximal do rádio, ocupando 25% da falha segmentar óssea (Figura 5). Nos demais (n^{os} 4 e 5) surgiu a partir da extremidade osteotomizada proximal do rádio, “em forma de cunha”, e ocupava em média 25% do defeito.

No grupo G2 (30 dias de pós-operatório) detectou-se reação periosteal discreta nas extremidades osteotomizadas do rádio em dois animais (n^{os} 7 e 9), e moderada nos outros três (n^{os} 6, 8 e 10). Observou-se formação óssea preenchendo parte do defeito, sendo que em quatro coelhos (n^{os} 7, 8, 9 e 10) a neoformação óssea ocupava em média 72,25% do defeito e em apenas um (coelho n^o 6) ocupava 100% do defeito (Figura 6). O tecido ósseo neoformado teve origem a partir da extremidade osteotomizada proximal do rádio e da face cranial da ulna em um animal (n^o 7), nos demais se desenvolveu a partir das extremidades osteotomizadas do rádio e da face cranial da ulna (n^{os} 6, 8, 9 e 10). O osso neoformado apresentou baixa radiopacidade nas falhas segmentares dos coelhos n^{os} 7 e 10 e, radiopacidade similar ao osso contíguo, nos de n^{os} 6, 8 e 9.

Aos 60 dias de pós-operatório (grupo G3) notou-se reação periosteal discreta nas extremidades osteotomizadas do rádio em quatro animais (n^{os} 11, 12, 14 e 15) e moderada em um (n^o 13). Três coelhos (n^{os} 11, 14 e 15) apresentaram neoformação óssea a partir das extremidades osteotomizadas do rádio e da face cranial da ulna preenchendo aproximadamente 75% do defeito, mas em dois destes (n^{os} 14 e 15) foi observada presença de linha radiotransparente no centro da falha óssea. Nos outros dois animais deste grupo (n^{os} 12 e 13) ocorreu neoformação óssea preenchendo totalmente o defeito, já com sinais de remodelação óssea (Figura 7).

Nos cinco coelhos avaliados aos 120 dias (grupo G4), observou-se neoformação óssea preenchendo totalmente o defeito ósseo segmentar, sendo que em três (n^{os} 17, 18 e 19) havia remodelação do osso neoformado (Figura 8). No animal n^o 20 ainda era possível observar-se a presença de linha radiotransparente no centro do defeito.



Figura 5 – Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com auto-enxerto esponjoso (coelho nº 3) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 dias de pós-operatório (b), quando nota-se formação óssea a partir da extremidade proximal do rádio e da face cranial da ulna.



Figura 6 – Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com auto-enxerto esponjoso (coelho nº 6) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 (b) e 30 (c) dias de pós-operatório. Nota-se discreta reação periosteal na extremidade proximal do rádio aos 15 dias e nas extremidades proximal e distal aos 30 dias de pós-operatório. Verifica-se início de formação óssea a partir da extremidade osteotomizada proximal do rádio aos 15 dias, que preenche 100% do defeito aos 30 dias de pós-operatório.



Figura 7 – Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com auto-enxerto esponjoso (coelho nº 12) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 (b), 30 (c) e 60 (d) dias de pós-operatório. Observa-se reação periosteal na extremidade proximal do rádio aos 15 e 30 dias de pós-operatório. O início de formação óssea no centro do defeito já é detectado aos 15 dias de pós-operatório. Aos 30 dias de pós-operatório nota-se intensa neoformação óssea a partir das extremidades do rádio e da face cranial da ulna, que aos 60 dias de pós-operatório ocupa 100% do defeito com sinais de remodelação óssea.



Figura 8 – Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com auto-enxerto esponjoso (coelho nº 18) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 (b), 30 (c), 60 (d) e 120 (e) dias de pós-operatório. Verifica-se reação periosteal na extremidade proximal do rádio aos 15 dias de pós-operatório e em ambas as extremidades do rádio aos 30 dias de pós-operatório. Verifica-se o início de formação óssea na extremidade osteotomizada proximal do rádio e no centro do defeito aos 15 dias de pós-operatório, que ocupa aproximadamente 70% do defeito aos 30 dias de pós-operatório. Aos 60 dias de pós-operatório a neoformação óssea ocupa 100% do defeito e aos 120 dias já se detecta a remodelação óssea.

5.2.2 Membro tratado com polímero de mamona

No pós-operatório imediato, o comprimento do defeito segmentar manteve o padrão estabelecido de um centímetro em todos os grupos e as superfícies de corte estavam homogêneas. O biomaterial (polímero de mamona) mostrou discreta radiopacidade em todos os períodos de avaliação, sendo mais observado no pós-operatório imediato.

No grupo G1 (15 dias de pós-operatório) notou-se discreta reação periosteal nas extremidades osteotomizadas do rádio em todos os animais. A formação óssea ocorreu em apenas dois coelhos e ocupava em média 25% do defeito (Figura 9), sendo no coelho nº 4 originava-se a partir da ulna e no coelho nº 3 a partir da ulna e extremidade osteotomizada proximal do rádio.

Observou-se no grupo G2 (30 dias de pós-operatório) discreta reação periosteal nas extremidades osteomizadas do rádio em um coelho (nº 8) e moderada em outro (nº 10). A formação óssea ocupava em média 49% do defeito em quatro animais (nºs 6, 7, 8 e 9) (Figura 10), e 61% no coelho nº 10, sendo formada a partir das extremidades osteotomizadas do rádio e face cranial da ulna.

Nos coelhos do grupo G3 (60 dias de pós-operatório) notou-se discreta reação periosteal nas extremidades osteotomizadas do rádio em quatro animais (nºs 11, 12, 14 e 15) e moderada em um (nº 13). A neoformação óssea “em forma de cunha” ocupava em média 58% do defeito em dois animais (nºs 11, 14), sendo proveniente das extremidades osteotomizadas do rádio. Nos demais preenchia em média 63% do defeito, sendo no coelho nº 13 a partir das extremidades osteotomizadas do rádio, e nos coelhos nº 12 e 15 a partir da ulna e das bordas do rádio (Figura 11).

Aos 120 dias de pós-operatório (grupo G4) detectou-se neoformação óssea ocupando 69% do defeito em um animal (nº 17) com presença de lacunas radiotransparentes, sendo uma central e outra próxima à extremidade osteotomizada proximal do rádio. Em dois coelhos (nºs 16 e 18) visibilizou-se neoformação óssea a partir das extremidades osteotomizadas do rádio e da face cranial da ulna, preenchendo aproximadamente 79% do defeito (Figura 12). No coelho nº 18 havia presença de linha radiotransparente próxima à extremidade osteotomizada proximal

do rádio. Em dois animais (n^{os} 19 e 20) a produção óssea ocupou 84% da falha segmentar.



Figura 9 – Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com polímero de mamona (coelho nº 3) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 dias de pós-operatório (b). Nota-se discreta radiopacidade do polímero na região do defeito no pós-operatório imediato e início de formação óssea a partir da extremidade proximal do rádio e face cranial da ulna aos 15 dias de pós-operatório.



Figura 10 – Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com polímero de mamona (coelho nº 9) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 (b) e 30 (c) dias de pós-operatório. Visualiza-se discreta radiopacidade do polímero na região do defeito no pós-operatório imediato e início de formação óssea a partir da extremidade proximal do rádio e face cranial da ulna aos 15 dias de pós-operatório. Aos 30 dias de pós-operatório nota-se neoformação óssea a partir de ambas as extremidades osteotomizadas do rádio e a partir da face cranial da ulna ocupando aproximadamente 45% do defeito.

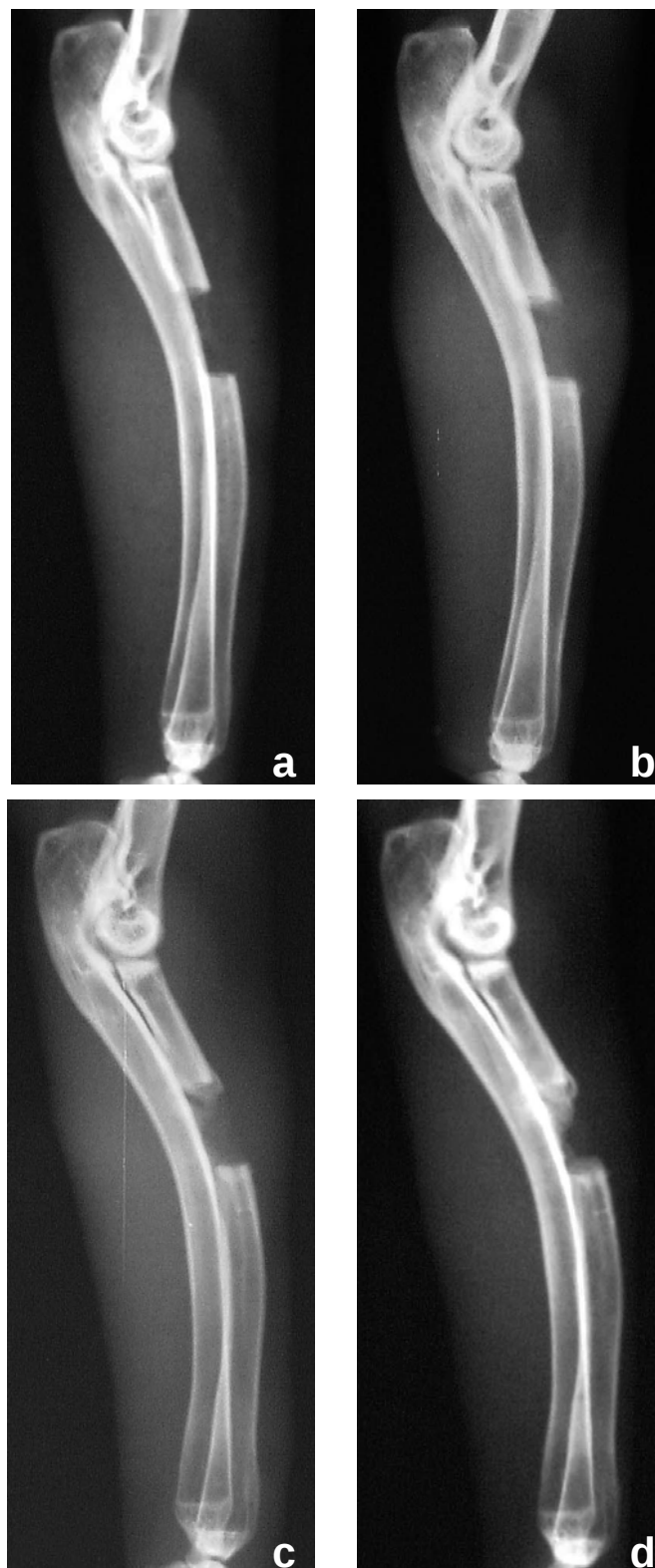


Figura 11 – Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com polímero de mamona (coelho nº 12) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 (b), 30 (c) e 60 (d) dias de pós-operatório. Observa-se neoformação óssea ocupando 60% do defeito, a partir das extremidades osteotomizadas do rádio e da face cranial da ulna aos 60 dias de pós-operatório (d), permanecendo uma área radiotransparente no centro do defeito.



Figura 12 – Aspecto radiográfico, em posição lateral, de membro tratado com polímero de mamona (coelho nº 16) no pós-operatório imediato (a) e aos 15 (b), 30 (c), 60 (d) e 120 (e) dias de pós-operatório. Observa-se neoformação óssea nas extremidades osteotomizadas do rádio e na face cranial da ulna aos 30 dias de pós-operatório (c), ocupando cerca de 60% do defeito ósseo. Aos 60 dias de pós-operatório (d), nota-se que a produção óssea ocupa 79% do defeito ósseo. Aos 120 dias de pós-operatório (e), a quantidade de tecido ósseo neoformado continua semelhante à do período anterior, mas já com sinais de remodelação óssea.

5.3 Avaliação histológica

5.3.1 Membro tratado com auto-enxerto esponjoso

Aos 15 dias de pós-operatório o quadro histológico foi similar para todos os animais. Ocorreu intensa formação de tecido cartilaginoso na região central do defeito e também a partir do periósteo do rádio. Áreas de neoformação óssea do tipo trabecular foram observadas a partir das extremidades osteotomizadas do rádio e, especialmente, a partir da ulna. Presença de grande quantidade de tecido conjuntivo na região central e na face mais externa do defeito, assim como de tecido adiposo, em menor quantidade no centro do defeito. O auto-enxerto esponjoso não foi visível nos cortes histológicos.

Com 30 dias de pós-operatório notou-se diminuição na quantidade de tecido cartilaginoso presente no defeito, assim como a gradual transformação deste em tecido ósseo trabecular. A área de neoformação óssea trabecular aumentou em relação ao período de observação anterior, chegando a ocupar toda a região do defeito e unindo ambas as extremidades do rádio. Constatou-se ainda presença de tecido adiposo e de tecido conjuntivo derivado do periósteo, sendo este último localizado em maior quantidade na face cranial do defeito (região oposta a ulna).

No período de 60 dias de pós-operatório, observou-se diminuta área de tecido cartilaginoso devido à sua substituição por tecido ósseo trabecular. A área de trabéculas ósseas sofreu redução em virtude do processo de remodelamento ósseo e início de formação de zonas de medula óssea. Estas foram detectadas por toda a região do defeito, mas sem formação de canal medular definido. Além disso, na face cranial do defeito havia presença de cortical óssea delgada incompleta e, em algumas áreas próximas à ulna, o tecido ósseo apresentava-se mais compacto.

Aos 120 dias de pós-operatório, o tecido cartilaginoso foi totalmente substituído por tecido ósseo, excetuando-se o coelho nº 5, que ainda apresentava pequena área de cartilagem no centro do defeito. Houve diminuição da área de tecido ósseo neoformado e aumento das áreas de medula óssea, que agora ocupavam a maior parte do defeito, restabelecendo o canal medular do rádio. Em

todos os animais, observou-se discreta cortical óssea externa unindo ambas as extremidades osteotomizadas do rádio.

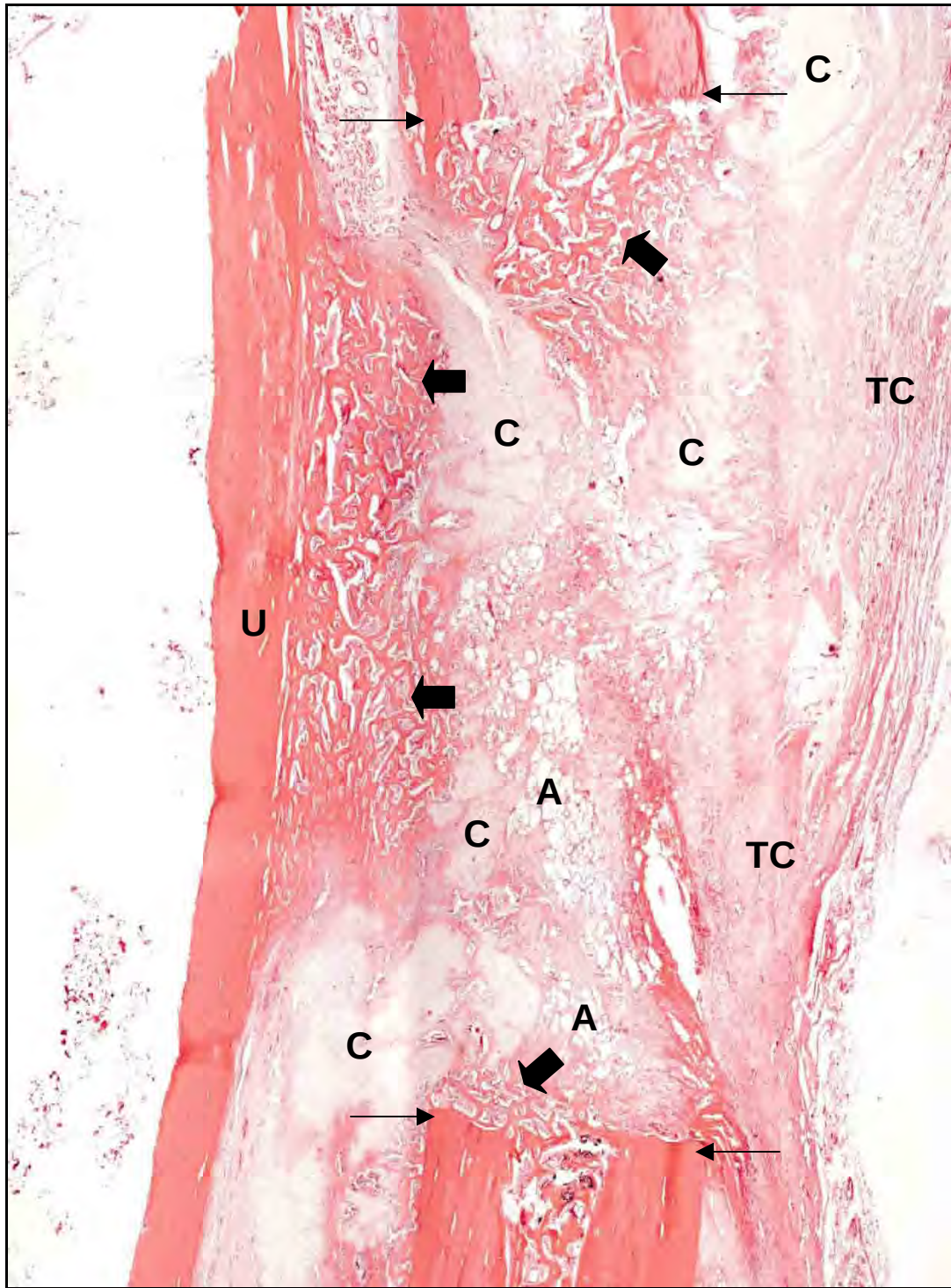


Figura 13 – Corte histológico longitudinal de defeito tratado com auto-enxerto esponjoso aos 15 dias de pós-operatório. Nota-se a formação de tecido cartilaginoso (C) próxima às extremidades osteotomizadas do radio (setas) e avançando para o centro do defeito. A formação de tecido ósseo trabecular é visível (setas largas) a partir das bordas do defeito (especialmente proximal) e em maior quantidade a partir da face cranial da ulna (U). No centro do defeito há áreas de tecido adiposo (A). Tecido conjuntivo (TC) derivado do periósteo é observado recobrindo toda a região externa do defeito.

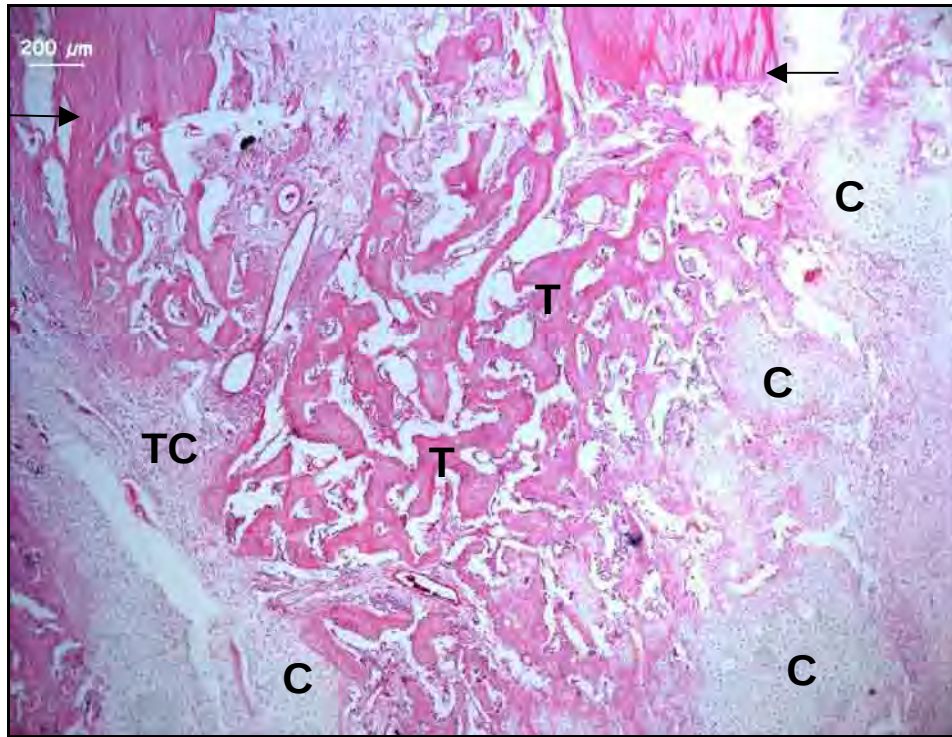


Figura 14 – Detalhe do defeito ósseo tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso aos 15 dias de pós-operatório. Observa-se proliferação de trabéculas ósseas (T) a partir da borda proximal do rádio (setas) e a presença de tecido cartilaginoso (C) e de tecido conjuntivo (TC). (HE – 5X)

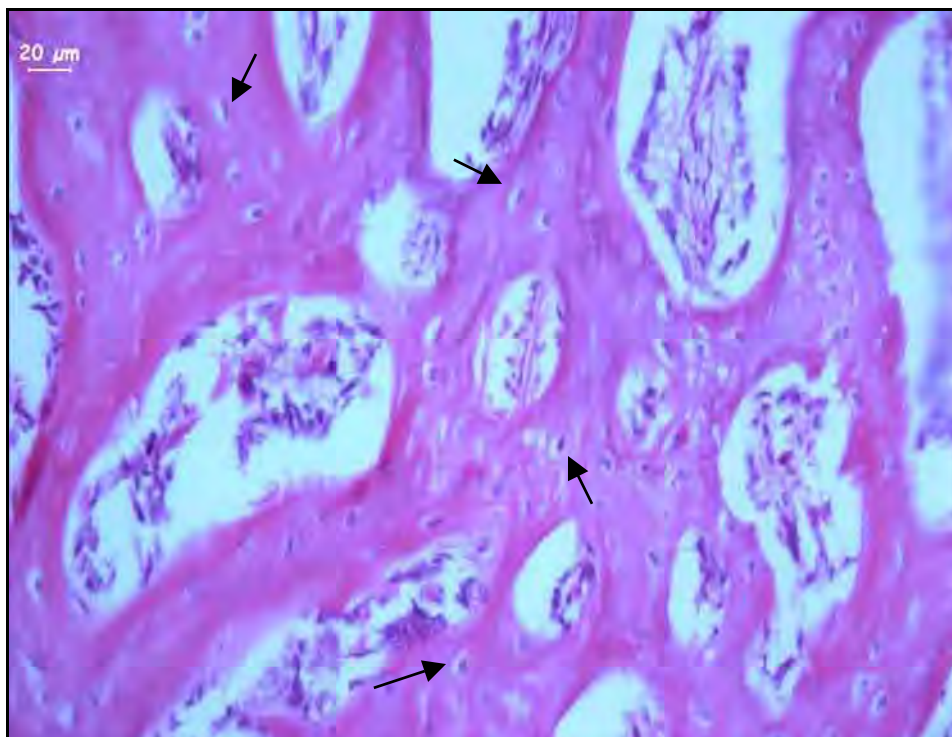


Figura 15 – Detalhe da formação óssea na região central do defeito ósseo tratado com auto-enxerto esponjoso aos 15 dias de pós-operatório. Verifica-se o aspecto trabecular e a presença de osteócitos (setas). (HE – 40X)

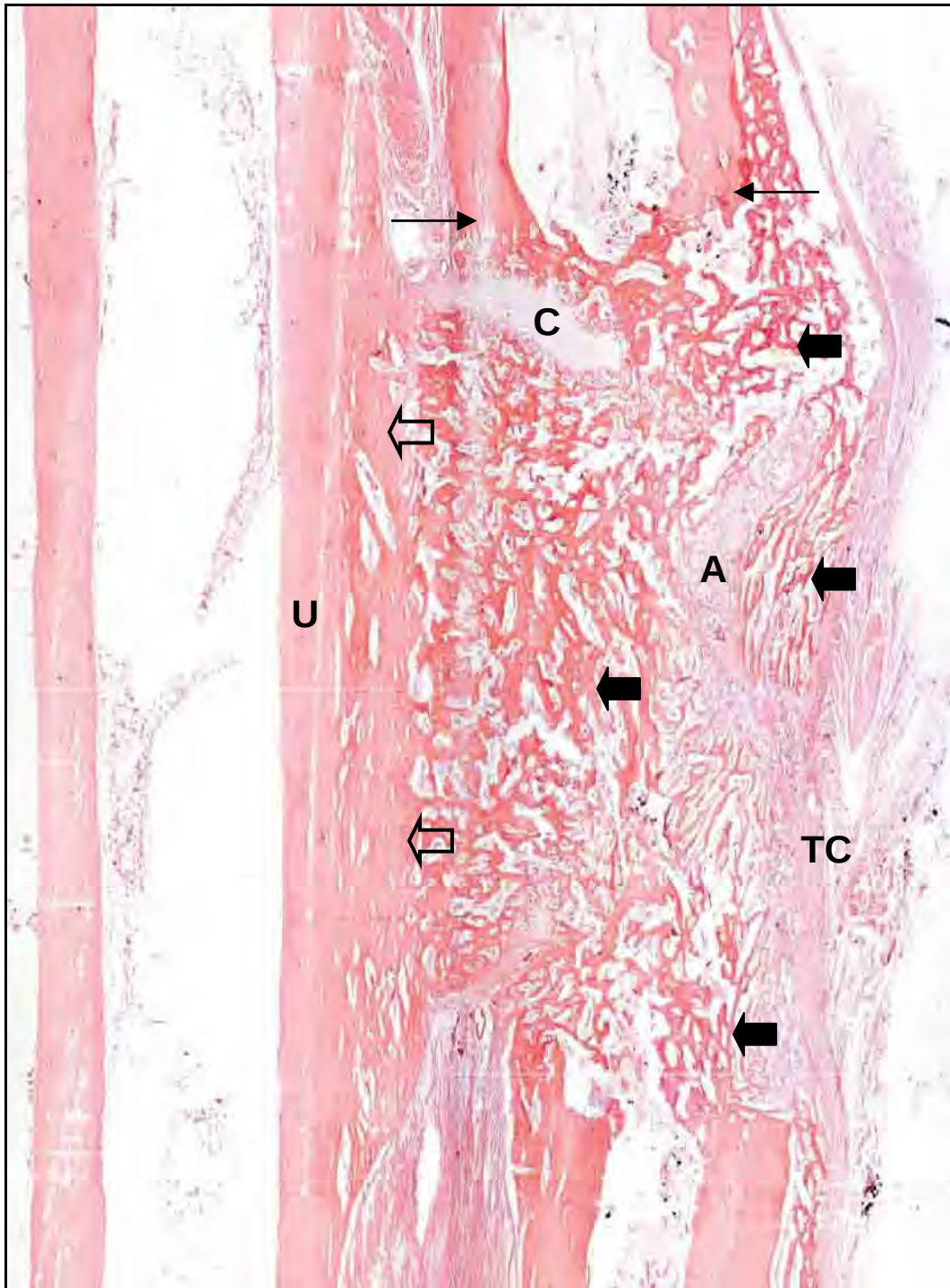


Figura 16 – Corte histológico longitudinal do defeito ósseo tratado com auto-enxerto esponjoso aos 30 dias de pós-operatório. O tecido ósseo neoformado (setas largas) ocupa todo o defeito ósseo, sendo visualizadas uma pequena área de tecido cartilaginoso (C) próxima à extremidade osteotomizada superior do rádio (setas) e uma área de tecido adiposo (A) no centro do defeito ósseo. O osso neoformado próximo à face cranial da ulna (U) já se apresenta mais compacto (setas vazadas) que no resto da falha segmentar. Nota-se a presença de tecido conjuntivo derivado do perióstio (TC) recobrindo toda superfície do defeito ósseo.

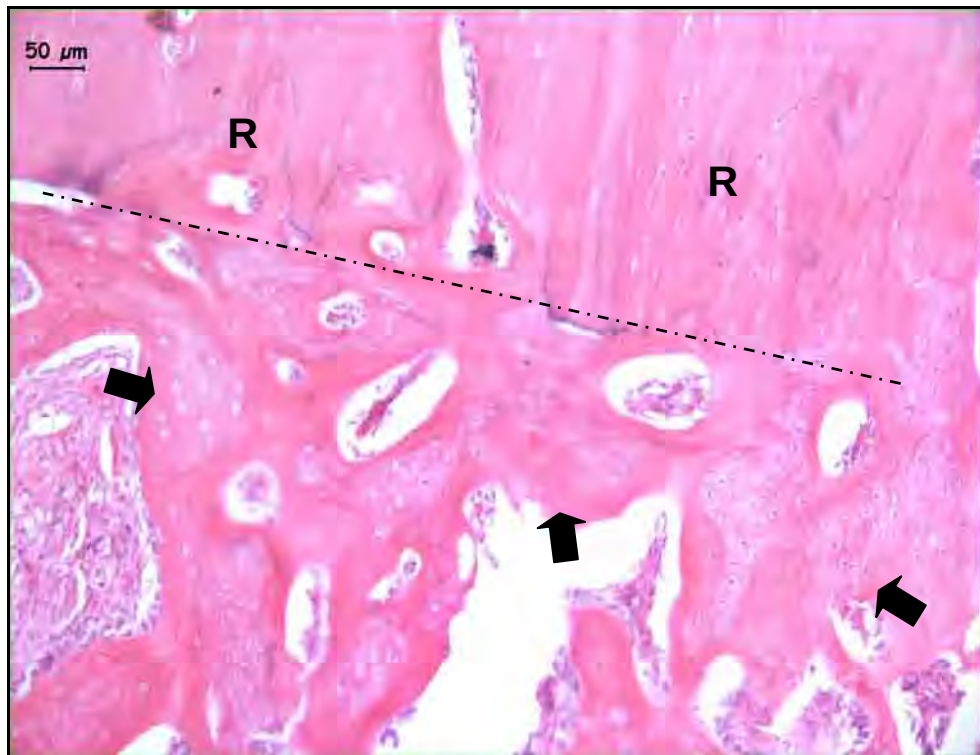


Figura 17 – Defeito ósseo tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso aos 30 dias de pós-operatório. Nota-se a proliferação trabecular (setas largas) a partir da extremidade osteotomizada proximal (linha tracejada) do rádio (R). (HE – 20X)

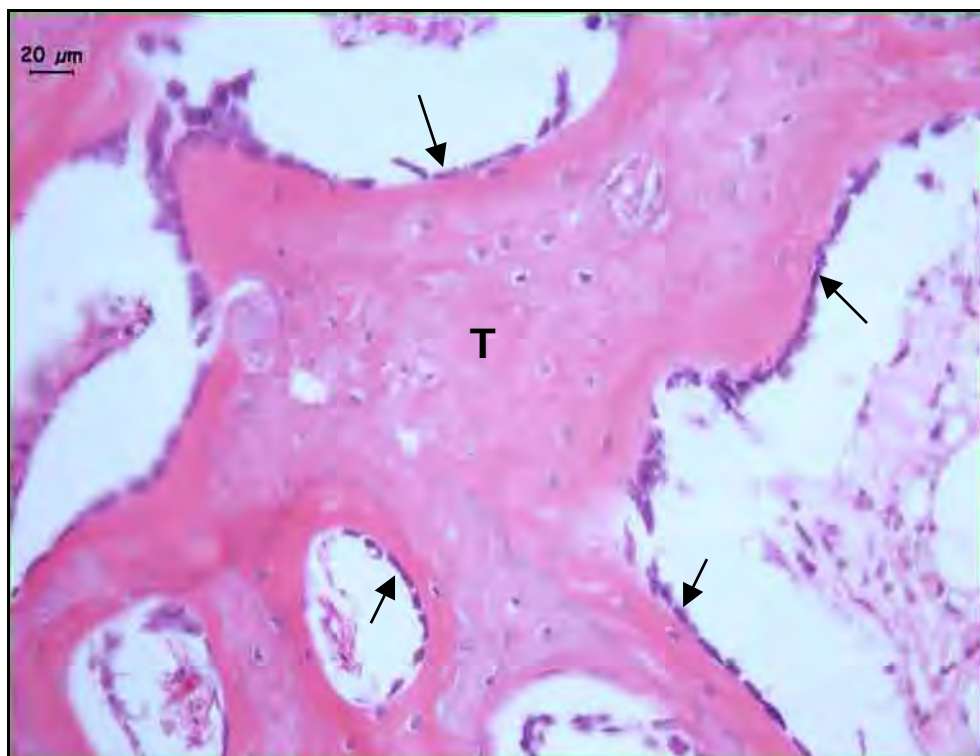


Figura 18 – Defeito ósseo tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso aos 30 dias de pós-operatório. Detalhe de trabécula óssea (T) margeada por osteoblastos (setas) na região central do defeito ósseo. (HE – 40X)

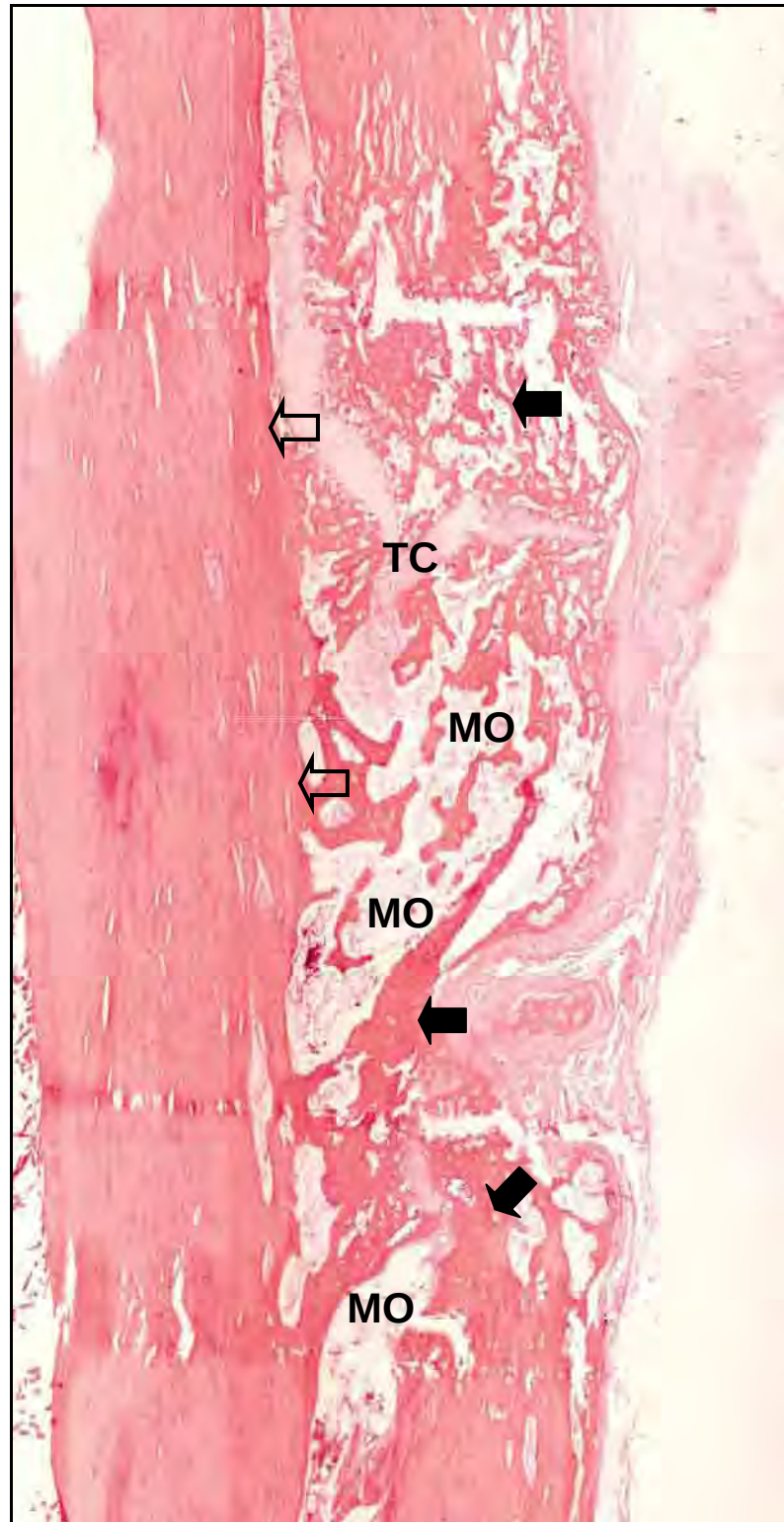


Figura 19 – Corte histológico longitudinal do defeito ósseo tratado com auto-enxerto esponjoso aos 60 dias de pós-operatório. Nota-se a diminuição da área de neoformação óssea (setas cheias), devido à formação de zonas de medula óssea (MO) entre as trabéculas, e a presença de septo de tecido conjuntivo (TC) próximo ao centro do defeito ósseo. O tecido ósseo neoformado próximo à ulna apresenta aspecto lamelar (setas vazadas).

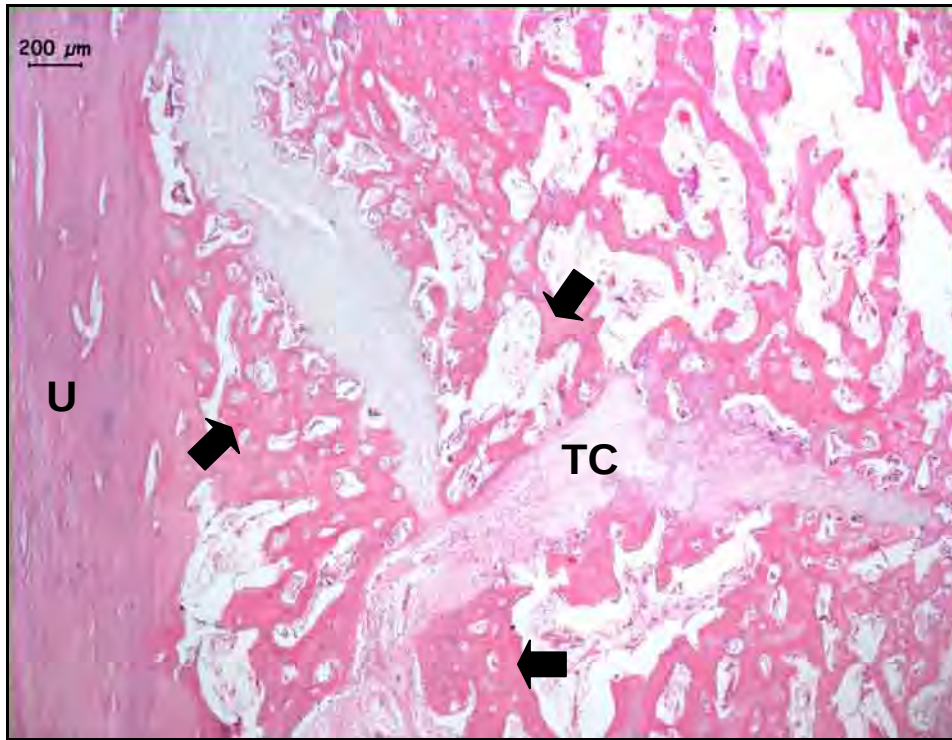


Figura 20 – Defeito ósseo tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso aos 60 dias de pós-operatório. Nota-se septo de tecido conjuntivo (TC) entre as trabéculas ósseas neoformadas (setas cheias) e a presença de tecido cartilaginoso na região central do defeito ósseo próximo à ulna (U). (HE – 5X)

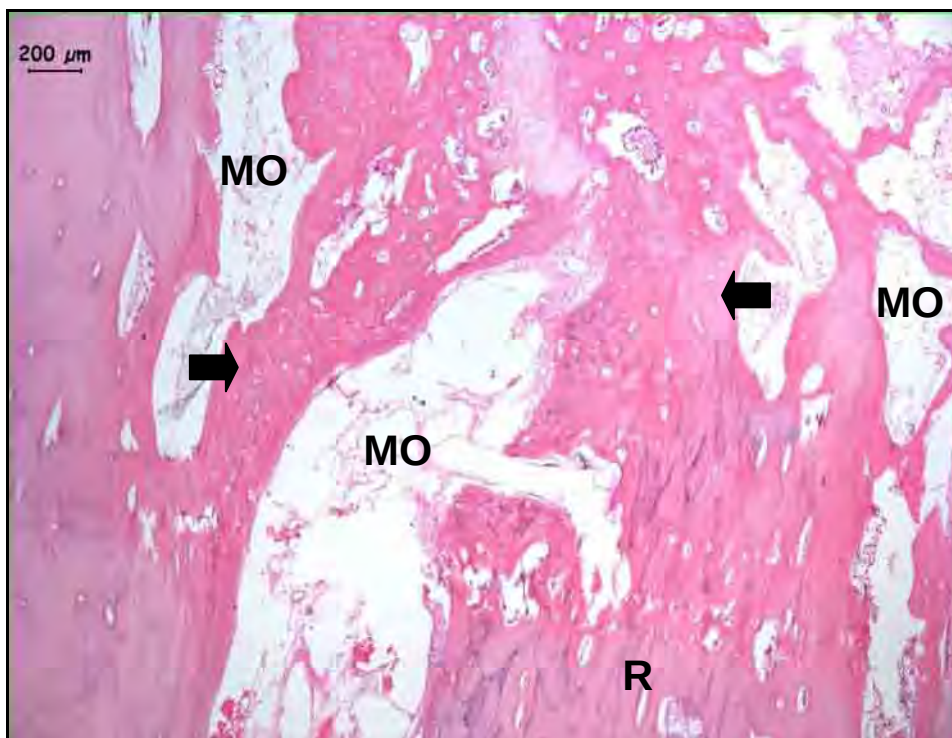


Figura 21 – Defeito ósseo tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso aos 60 dias de pós-operatório, na região da extremidade osteotomizada distal do rádio (R). Verifica-se início de formação de medula óssea (MO) entre as áreas de tecido ósseo neoformado (setas cheias). (HE – 5X)

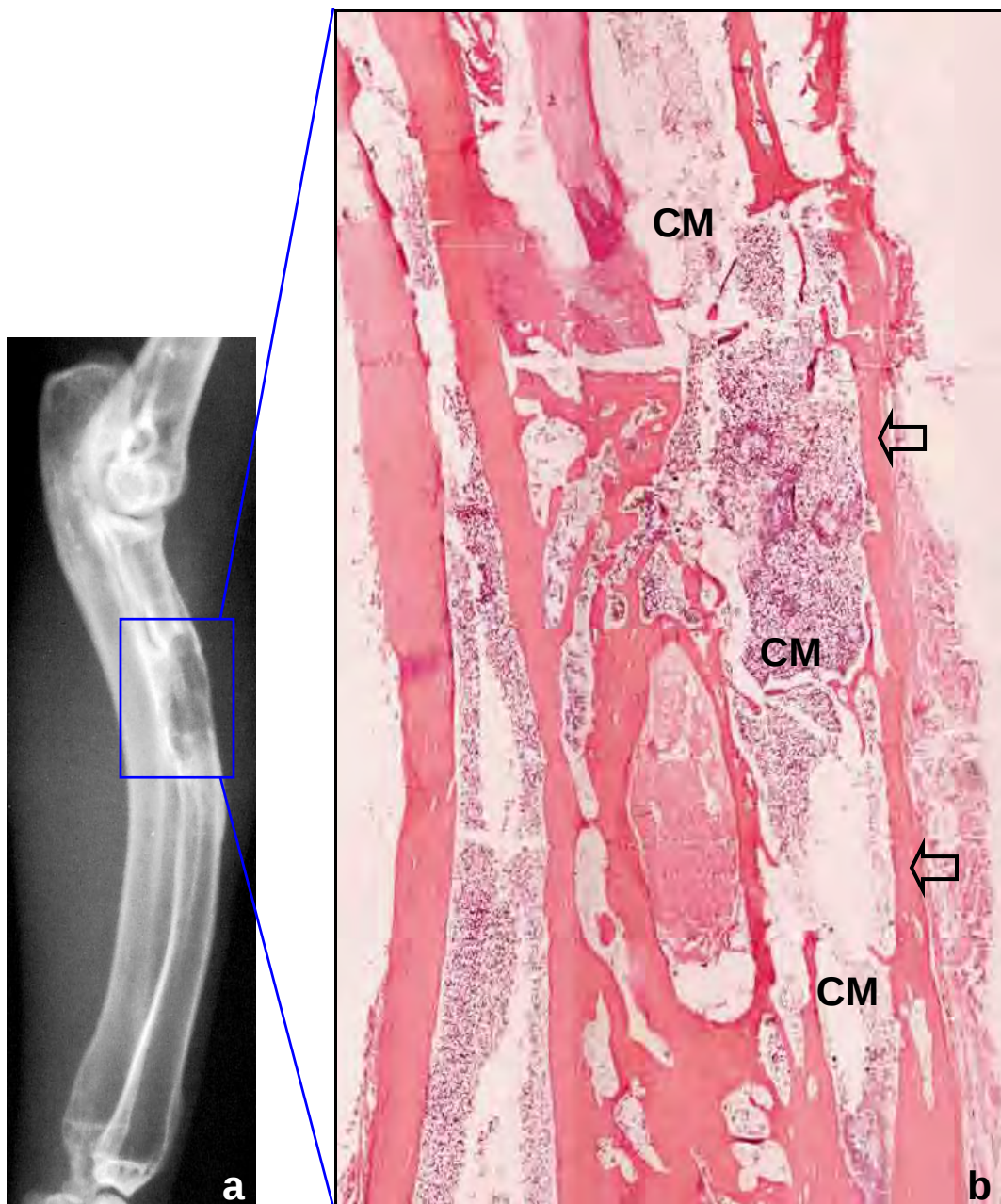


Figura 22 – Imagem radiográfica em posição lateral (a) e corte histológico longitudinal (b) de defeito ósseo tratado com auto-enxerto esponjoso aos 120 dias de pós-operatório (coelho nº 5). Observa-se no destaque da radiografia o tecido ósseo neoformado em fase de remodelação e ocupando toda área do defeito ósseo. No corte histológico correspondente, nota-se a formação de uma cortical óssea delgada (setas vazadas) e a formação do canal medular na região do defeito ósseo (CM).



Figura 23 – Defeito ósseo tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso aos 120 dias de pós-operatório. Verifica-se a remodelação óssea das trabéculas provenientes da ulna (U) para formação de canal medular (CM) na região central do defeito ósseo (HE – 5X).

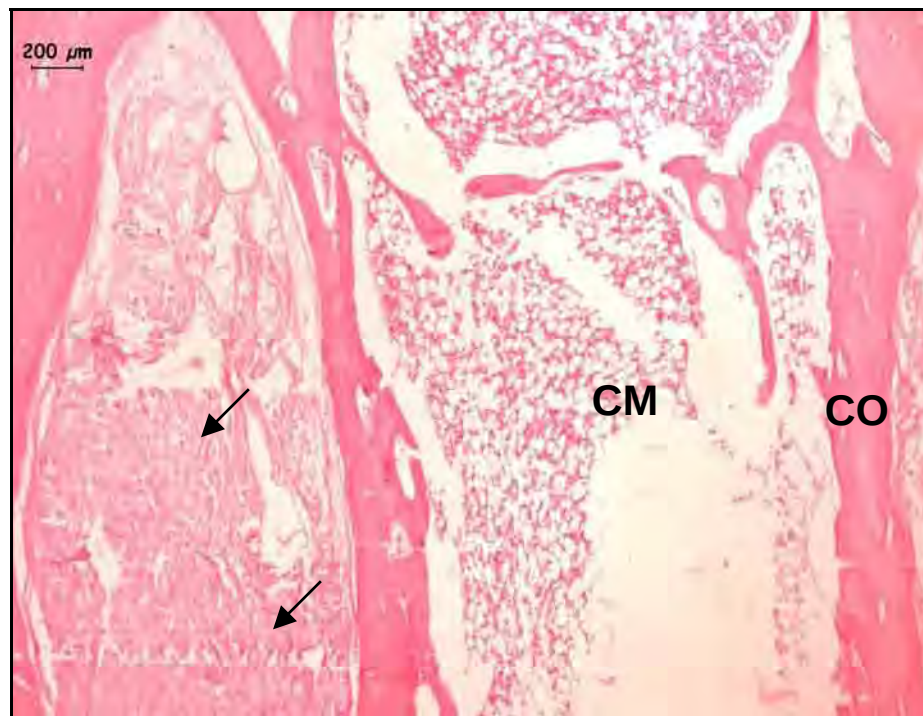


Figura 24 – Defeito ósseo tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso aos 120 dias de pós-operatório. Observa-se a formação do canal medular (CM) e de cortical óssea (CO) na região do defeito ósseo e a presença de feixes musculares (setas). (HE – 5X)

5.3.2 Membro tratado com polímero de mamona

Aos 15 dias de pós-operatório, notou-se formação de tecido cartilaginoso em regiões próximas à face ulnar ou às extremidades osteotomizadas do rádio. Nestas áreas foi também observado o processo de substituição do tecido cartilaginoso por tecido ósseo primário (trabéculas ósseas). Os grânulos de polímero de mamona foram facilmente identificados, embora não tenham sido evidenciados pela coloração da Hematoxilina-eosina. Estes se encontraram aglomerados no centro do defeito, envoltos por tecido conjuntivo fibroso. Os grânulos localizados mais periféricamente estavam em íntimo contato ou totalmente envoltos por tecido cartilaginoso ou por tecido ósseo primário. Havia ainda áreas de tecido conjuntivo na face cranial do defeito e áreas de tecido adiposo no centro deste.

Com 30 dias de pós-operatório notou-se diminuição na área de tecido cartilaginoso e aumento da área de trabéculas ósseas, quando comparado ao momento de observação anterior. O crescimento ósseo ocorreu a partir da face ulnar e das extremidades osteotomizadas do rádio. Os grânulos de polímero de mamona encontravam-se concentrados na face cranial do defeito (região oposta à ulna) e a maioria estava envolta por tecido conjuntivo. Os grânulos localizados mais periféricamente estavam em íntimo contato ou totalmente envoltos por tecido cartilaginoso ou por tecido ósseo primário.

Aos 60 dias de pós-operatório ocorreu total substituição do tecido cartilaginoso por tecido ósseo. A área de trabéculas ósseas sofreu pequena redução quando comparada com o período de observação anterior. O tecido ósseo neoformado encontrava-se mais compacto, especialmente nas regiões próximas à ulna. Observou-se formação de áreas de medula óssea próximas às extremidades osteotomizadas do rádio. Os grânulos de polímero de mamona não apresentavam sinais de reabsorção e encontravam-se envoltos por tecido conjuntivo, tecido ósseo ou medula óssea.

No período de 120 dias de pós-operatório detectou-se ausência de tecido cartilaginoso em toda extensão do defeito. Houve aumento da produção de tecido ósseo neoformado quando comparado aos 60 dias de pós-operatório, estando este com aspecto lamelar. Áreas de medula óssea apresentavam-se em maior

número no defeito. Os grânulos de polímero mais próximos à ulna encontravam-se totalmente envoltos por tecido ósseo e/ou medula óssea. Aqueles situados na face cranial do defeito encontravam-se envoltos por tecido conjuntivo. Em nenhum dos animais deste grupo ocorreu formação de cortical óssea externa.

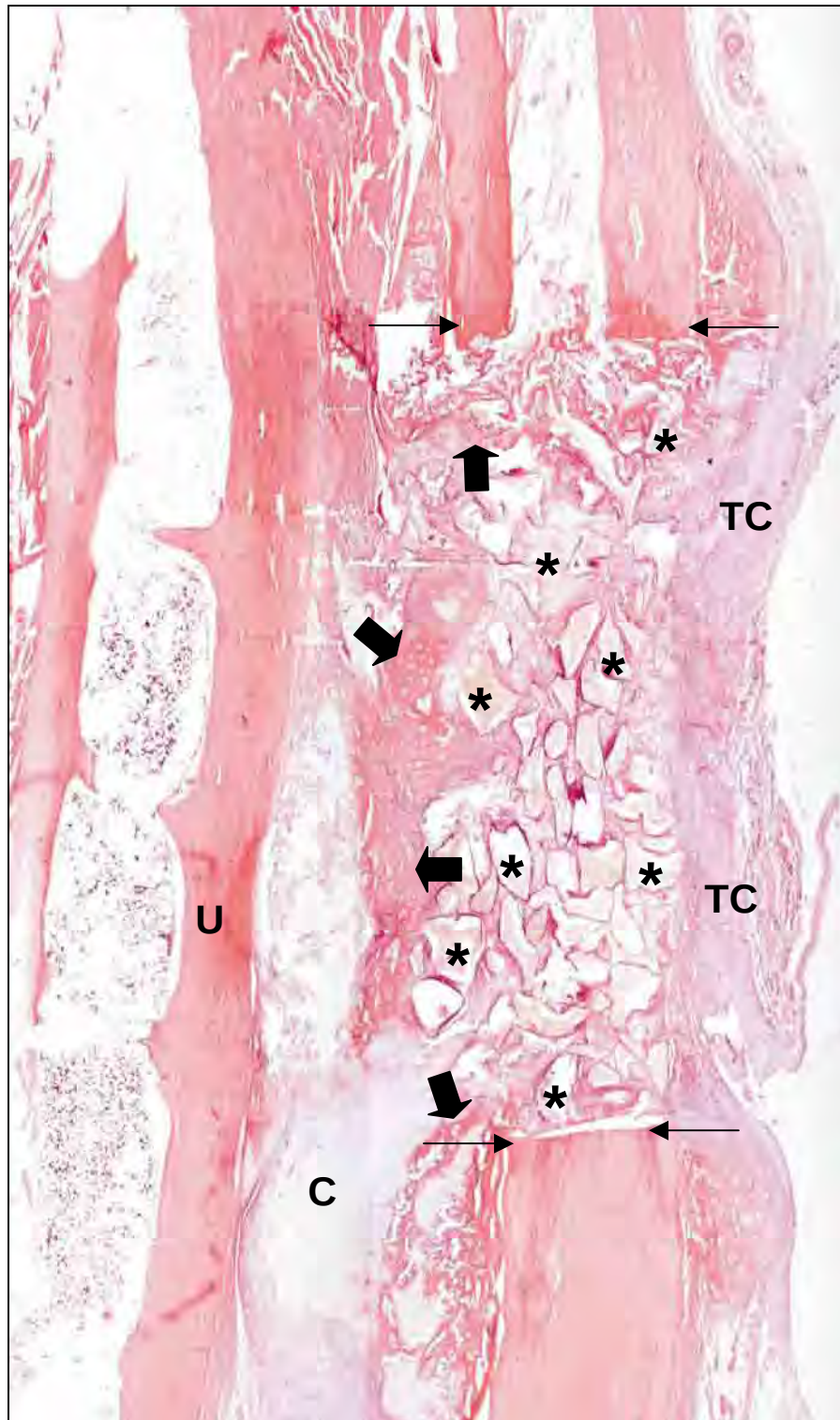


Figura 25 – Corte histológico longitudinal do defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 15 dias de pós-operatório. Verificam-se áreas de tecido cartilaginoso (C) próximas às extremidades osteotomizadas do rádio (setas). Observa-se intensa reação periosteal nas extremidades do rádio e formação de tecido ósseo trabecular (setas largas) a partir das bordas do defeito ósseo e a partir da face ulnar (U). No centro do defeito ósseo notam-se os grânulos de polímero (*) envoltos por tecido conjuntivo ou por tecido ósseo neoformado. Tecido conjuntivo (TC) derivado do periósteo recobre toda a região mais externa do defeito ósseo.

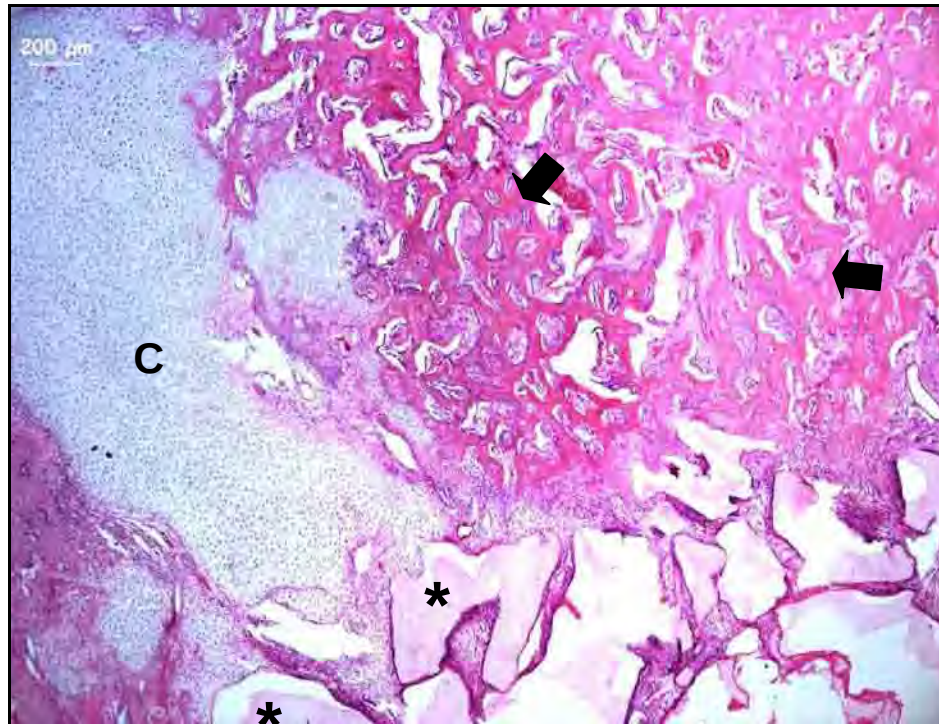


Figura 26 – Detalhe da região proximal do defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 15 dias de pós-operatório. Presença de formação óssea trabecular (setas cheias), tecido cartilaginoso (C) e grânulos de polímero (*) em contato íntimo com o tecido cartilaginoso. (HE – 5X)

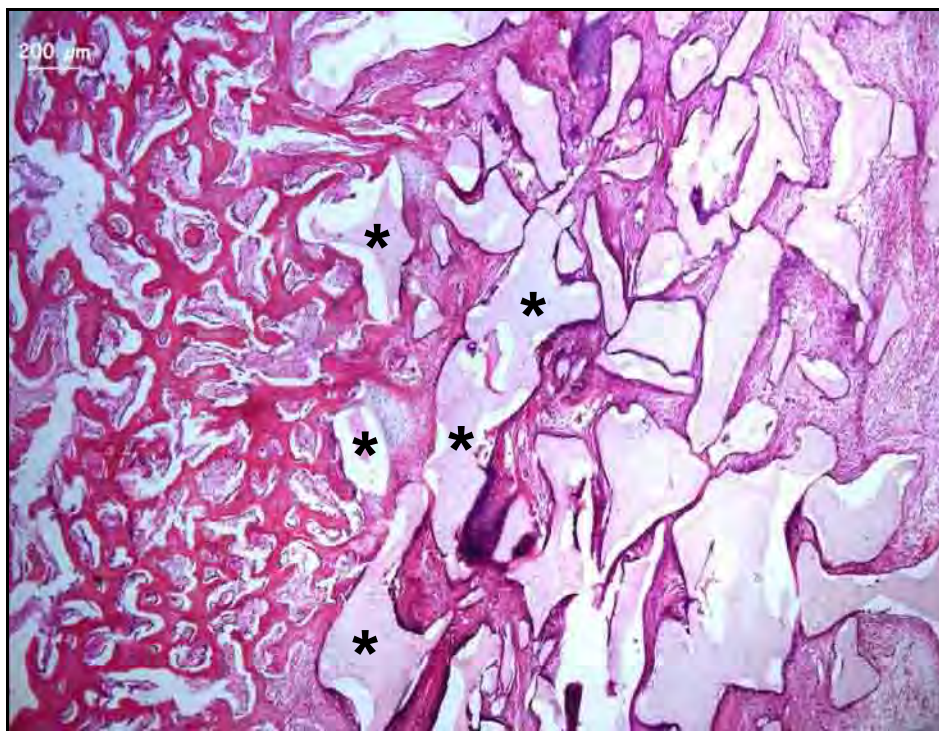


Figura 27 – Detalhe da região média do defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 15 dias de pós-operatório. Nota-se a presença de grânulos de polímero de mamona em contato com tecido ósseo neoformado (*). (HE – 5X)

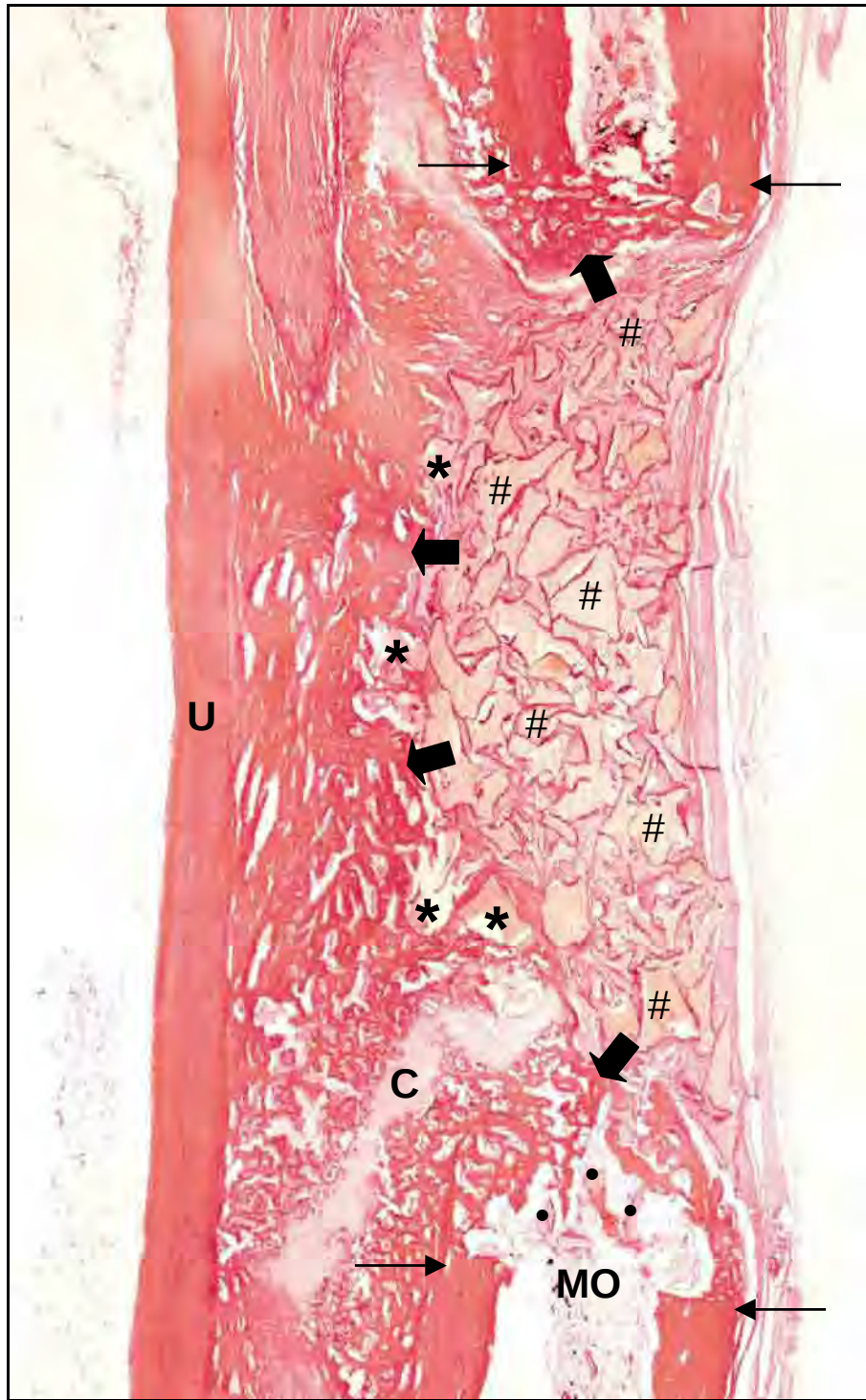


Figura 28 – Corte histológico longitudinal do defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 30 dias de pós-operatório. Nota-se proliferação de trabéculas ósseas (setas cheias) a partir das extremidades osteotomizadas do rádio (setas) e da face ulnar (U), além de tecido cartilaginoso (C) próximo à borda distal do rádio. Os grânulos de polímero próximos à ulna estão envolvidos por tecido ósseo neoformado (*), e os mais afastados permanecem circundados por tecido conjuntivo (#). Verifica-se a formação da medula óssea (MO) a partir do canal medular da extremidade distal do rádio. Alguns grânulos de polímero (•) encontram-se em contato íntimo com as células da medula óssea e tecido ósseo neoformado.

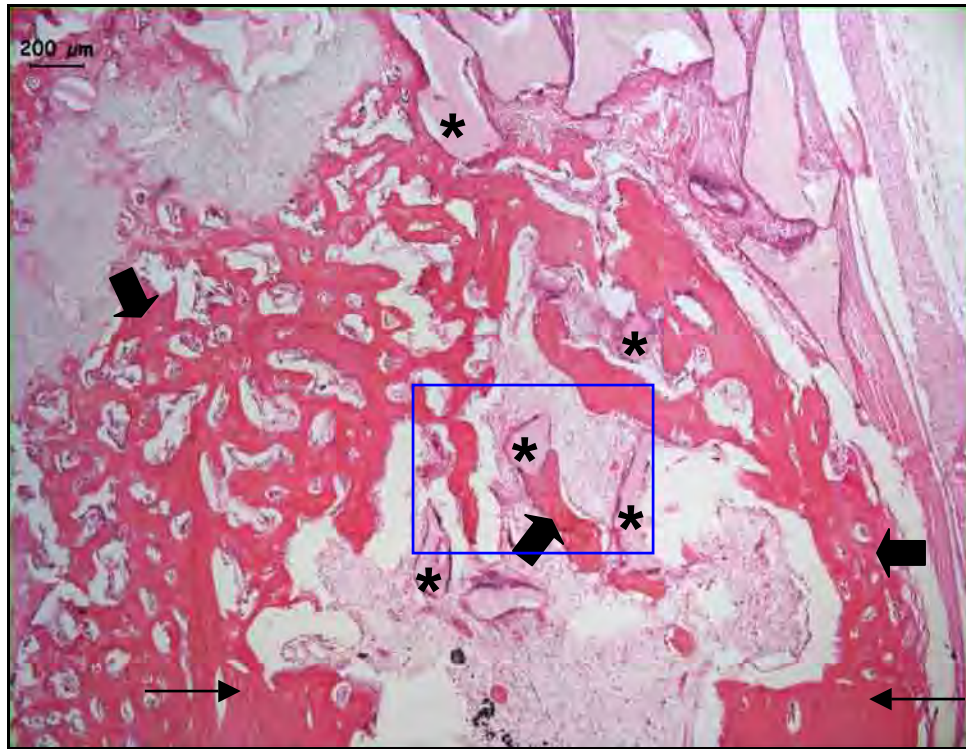


Figura 29 – Defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 30 dias de pós-operatório. Verifica-se a neoformação óssea (setas cheias) a partir da extremidade osteotomizada distal do rádio (setas) e os grânulos de polímero envoltos por tecido ósseo e células de medula óssea (*). (HE – 20X)

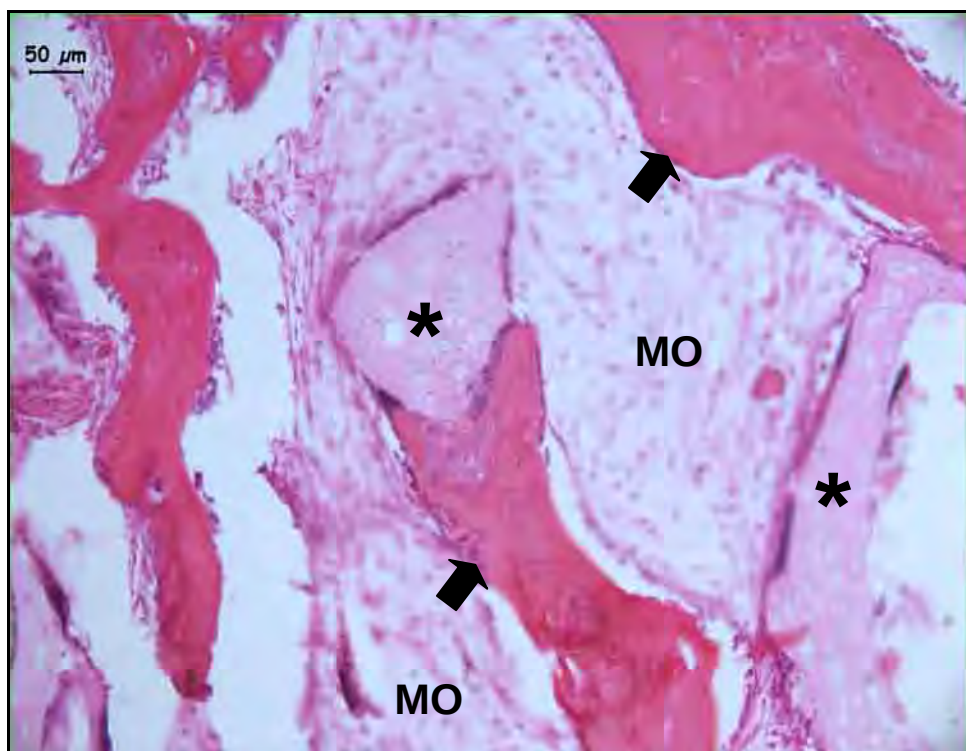


Figura 30 – Detalhe de grânulo de polímero de mamona (*) circundado por tecido ósseo neoformado (seta cheia) e medula óssea (MO). (HE – 40X)



Figura 31 – Corte histológico longitudinal do defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 60 dias de pós-operatório. Nota-se formação óssea (setas cheias) em forma de cunha a partir da extremidade osteotomizada proximal do rádio, face ulnar (U) e, em menor quantidade, a partir da extremidade osteotomizada distal do rádio. Os grânulos de polímero estão envolvidos por tecido ósseo neoformado (*) e grande quantidade de tecido conjuntivo (TC) derivado do periósteo na região da extremidade osteotomizada proximal do rádio.

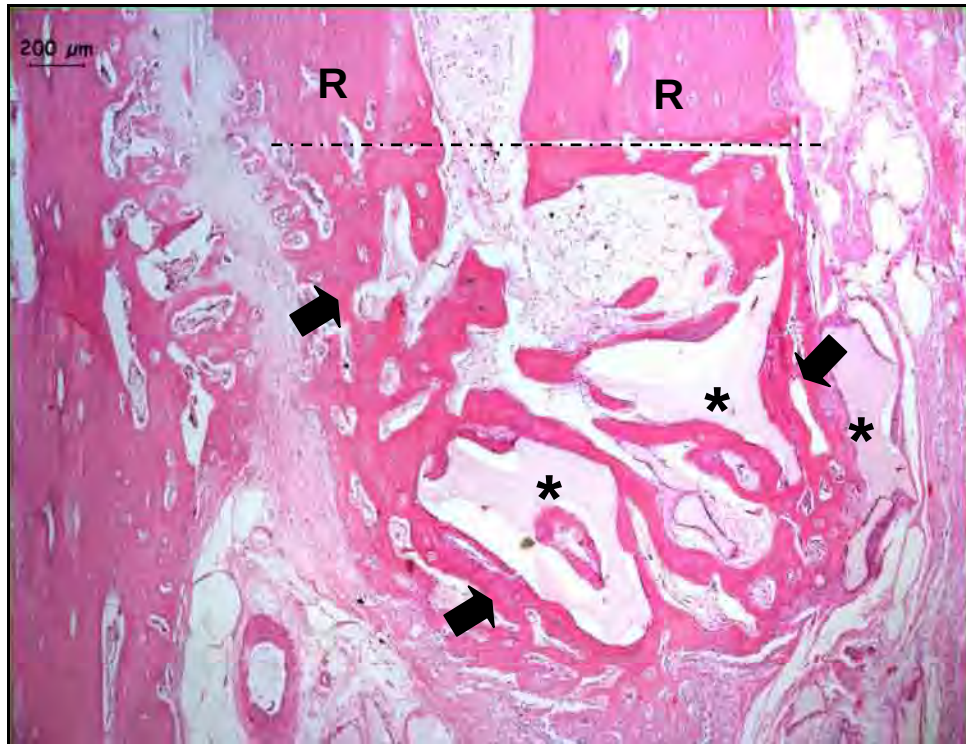


Figura 32 - Defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 60 dias de pós-operatório. Verifica-se a proliferação óssea (setas cheias) a partir da extremidade osteotomizada proximal (linha tracejada) do rádio (R) e grânulos de polímero (*) envoltos por tecido ósseo. (HE – 5X)

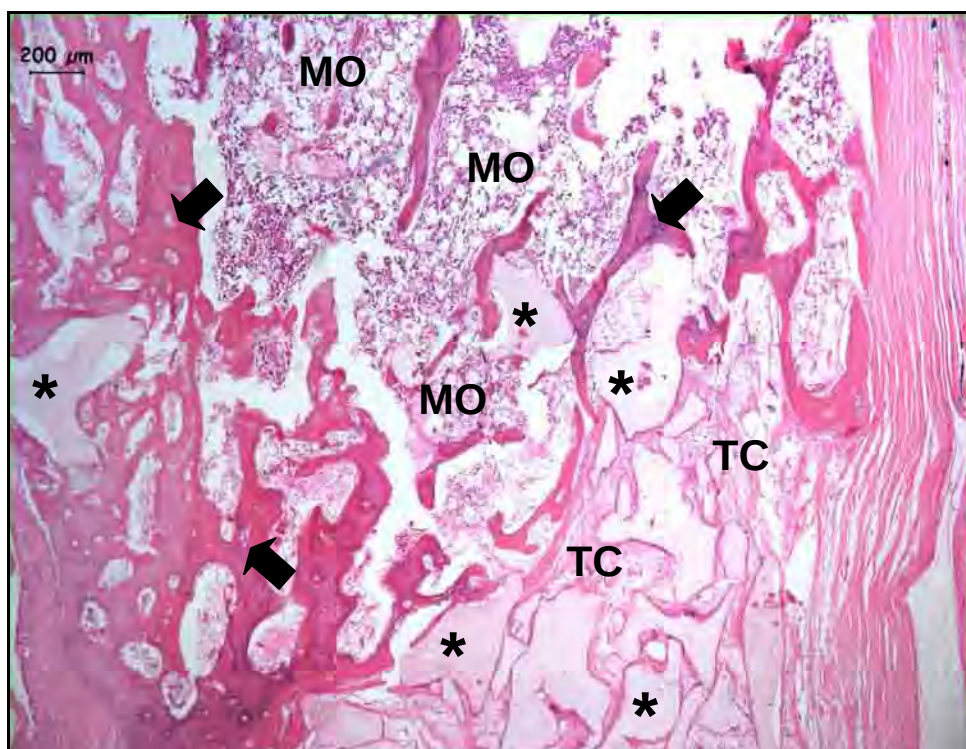


Figura 33 – Defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 60 dias de pós-operatório. Grânulos de polímero (*) estão envoltos por tecido ósseo (setas cheias), tecido conjuntivo (TC) e medula óssea (MO). (HE – 5X)

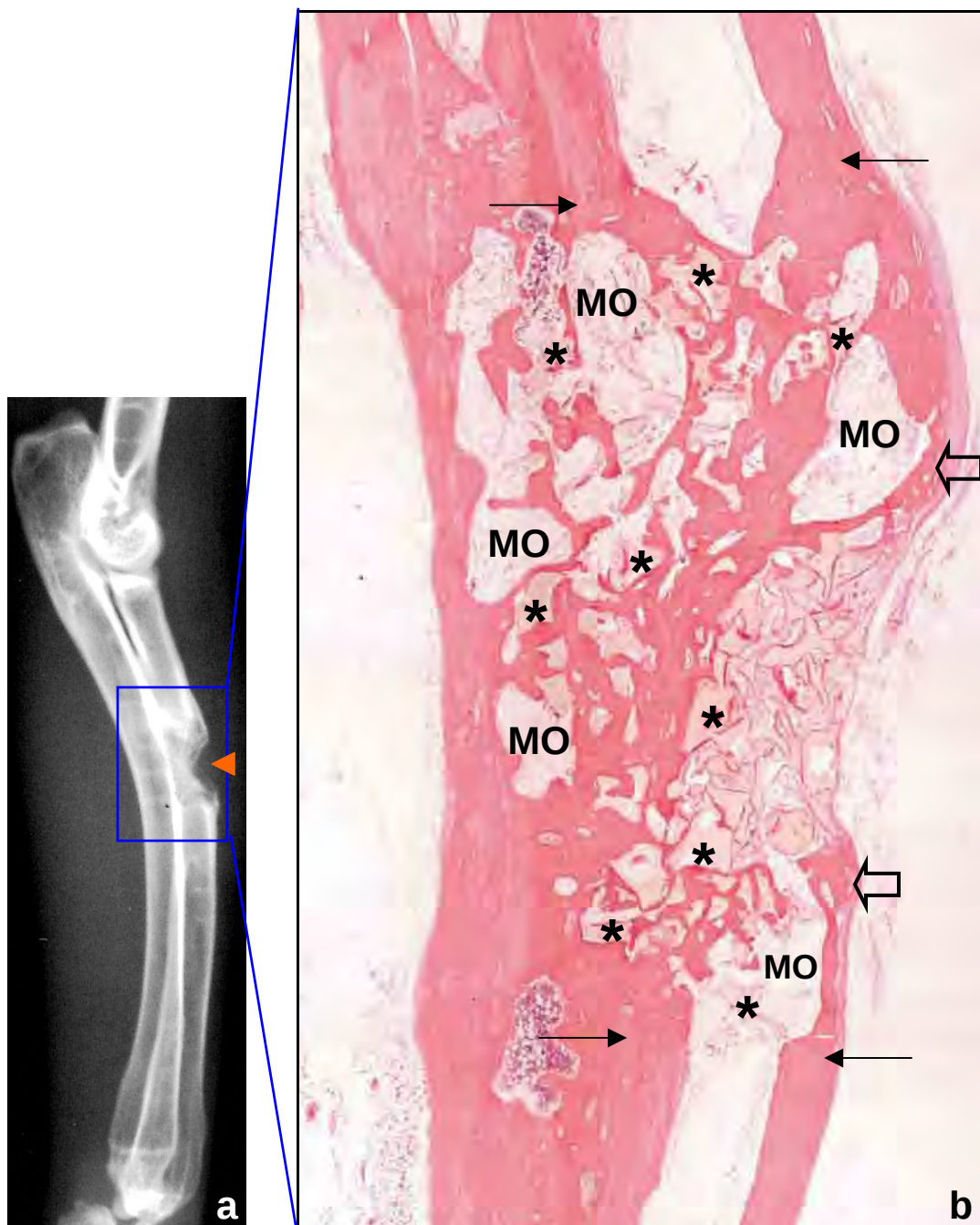


Figura 34 – Imagem radiográfica em posição lateral (a) e corte histológico longitudinal (b) de defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 120 dias de pós-operatório (animal nº 3). Observa-se no destaque da radiografia produção óssea unindo as extremidades osteotomizadas do rádio, mas permanecendo uma região radiotransparente na região central do defeito ósseo (cabeça de seta). No corte histológico correspondente, nota-se a formação óssea unindo ambas as extremidades osteotomizadas do rádio (setas), áreas de medula óssea (MO) sem canal medular evidente, grânulos de polímero envoltos por tecido ósseo e medula óssea (*), e o princípio de formação da cortical óssea na região do defeito ósseo em oposição à ulna (setas vazadas). A região radiotransparente da imagem radiográfica corresponde à região de concentração de grânulos de polímero no corte histológico.

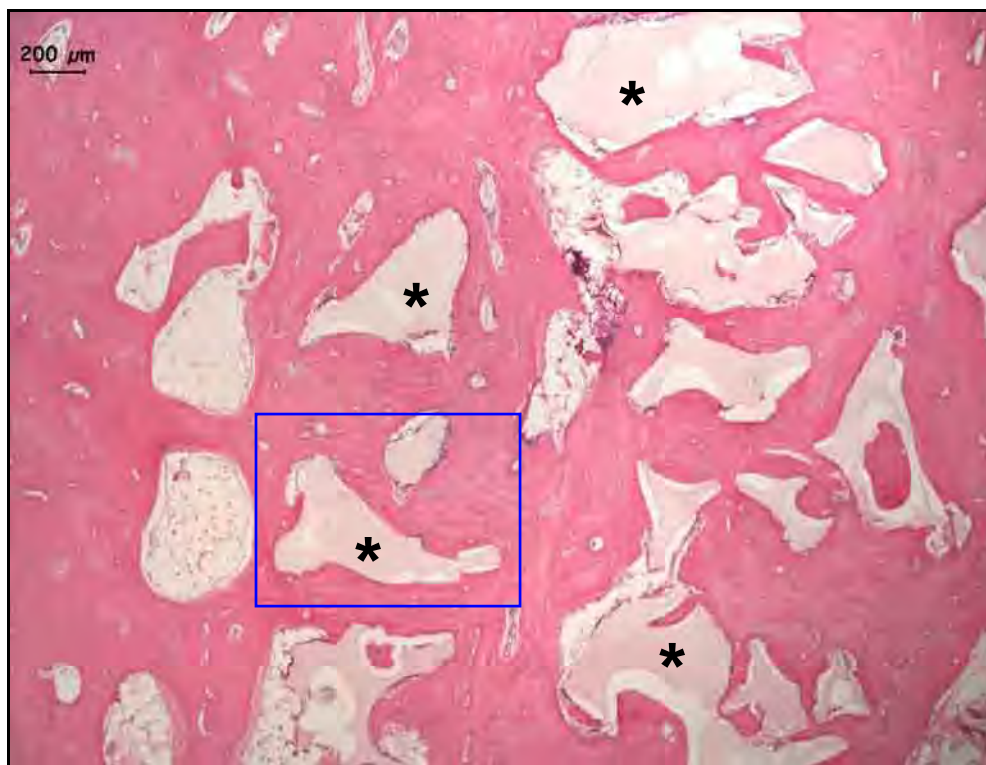


Figura 35 – Detalhe da região central do defeito ósseo tratado com polímero de mamona aos 120 dias de pós-operatório. Os grânulos de polímero (*) estão completamente envolvidos por tecido ósseo neoformado. (HE – 5X)

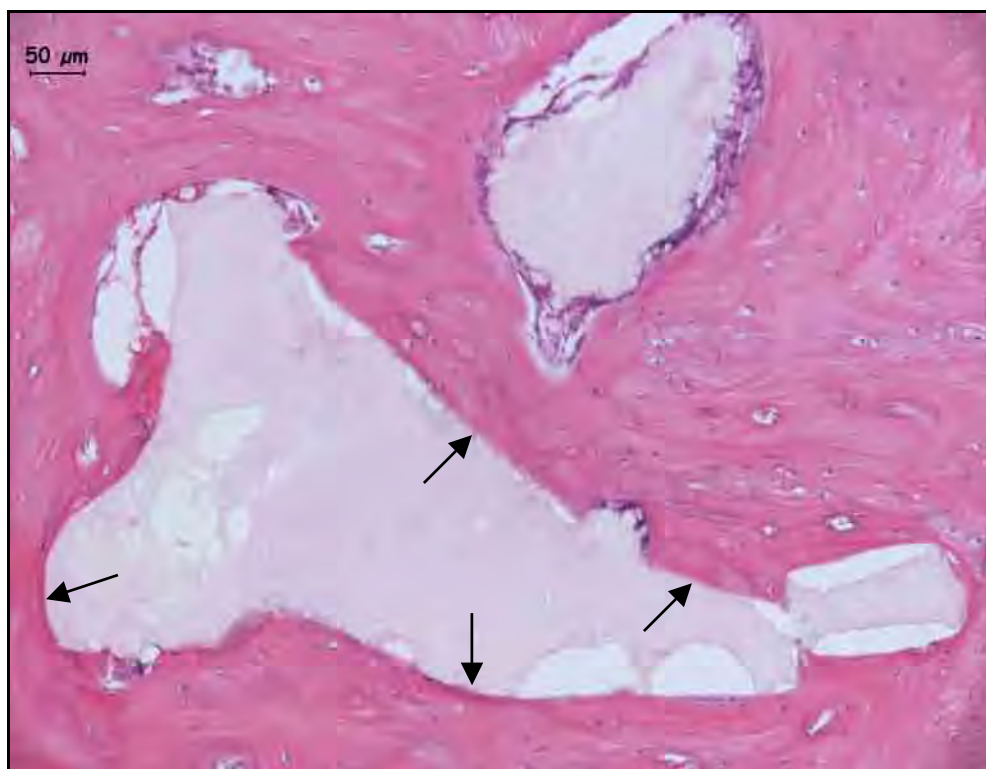


Figura 36 – Detalhe de grânulo de polímero integrado (setas) ao tecido ósseo neoformado. (HE – 20X)

5.4 Microscopia de Polarização

Pela microscopia de polarização detectou-se que, em todos os momentos de observação, o padrão de organização estrutural dos grânulos de polímero de mamona não sofreu alteração (Figura 37).

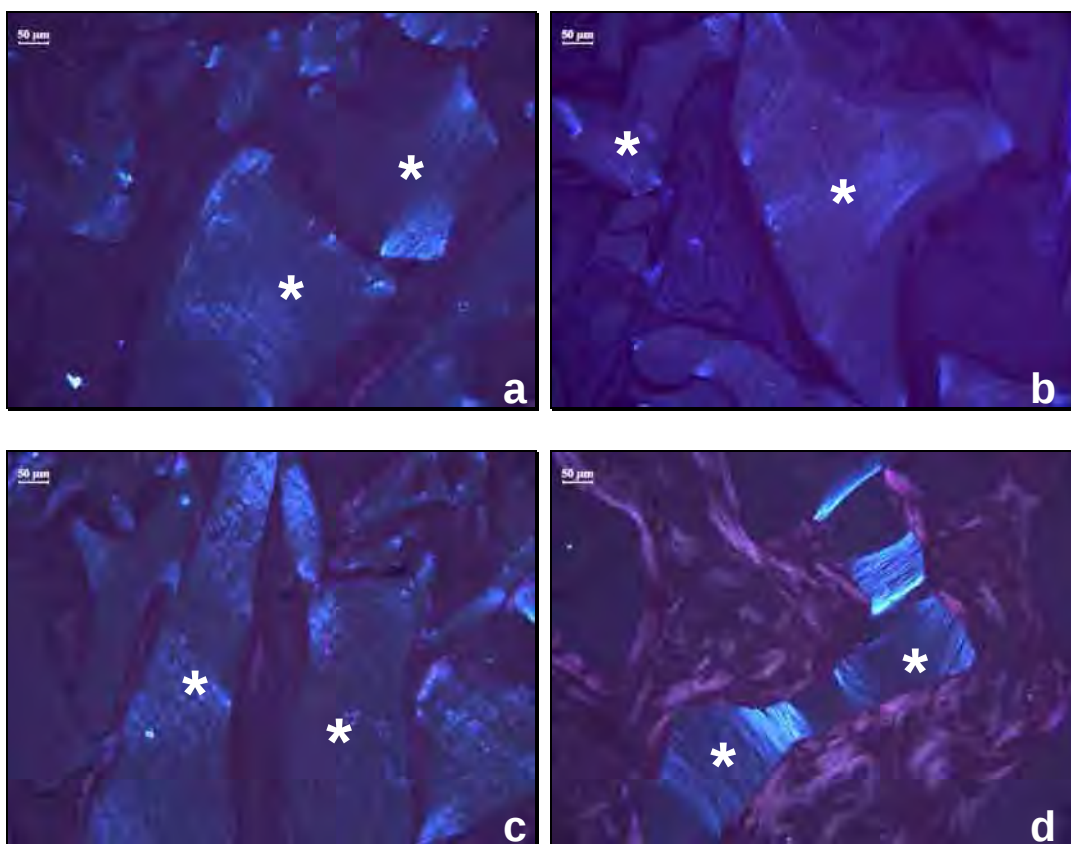


Figura 37 – Microscopia de polarização para observação da organização estrutural dos grânulos de polímero de mamona. Não há evidências de alterações na estrutura dos grânulos de polímero (*) aos 15 dias (a), 30 (b), 60 (c) e 120 dias (d), de pós-operatório. (HE – 20X)

5.5 Exame Morfométrico e Análise Estatística

Pela análise de variância das médias, não houve diferença estatística entre as áreas ocupadas por grânulos de polímero na falha segmentar, comparando-se os quatro momentos de observação (15, 30, 60 e 120 dias de pós-operatório) (Tabela 1).

Quanto à produção de tecido cartilaginoso no interior do defeito ósseo, houve diferença pelo teste “t” ($P < 0,05$) em função do tratamento, apenas aos 15 dias de pós-operatório, no qual a produção de tecido cartilaginoso no membro tratado com polímero de mamona foi significativamente menor que a produção no membro tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso (Tabela 2).

Com relação à produção de tecido ósseo na região do defeito segmentar induzido nos coelhos, houve diferença pelo teste “t” ($P < 0,05$) em função do tratamento apenas aos 30 dias de pós-operatório, no qual a produção de trabéculas ósseas neoformadas foi significativamente menor no membro tratado com o polímero de mamona, em relação ao membro tratado com auto-enxerto ósseo esponjoso (Tabela 3).

Os valores obtidos estão apresentados nas Tabelas de 1 a 3.

Tabela 1 – Valores médios (mm²) das áreas de grânulos de polímero de mamona encontrados no defeito ósseo induzido, em função do momento (dias de pós-operatório), e seus respectivos desvios padrões.

	Momentos			
	15	30	60	120
Áreas	9,207 ± 1,42	9,684 ± 0,64	7,909 ± 1,42	9,470 ± 2,39

A análise de variância (ANOVA) mostrou não haver diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$).

Tabela 2 – Valores médios (mm²) das áreas de produção de tecido cartilaginoso na região do defeito ósseo e seus respectivos desvios padrões, em função do tratamento (auto-enxerto esponjoso e polímero de mamona) e dos momentos de avaliação (dias de pós-operatório).

Tratamento	Momentos			
	15	30	60	120
Auto-enxerto	6,903 ± 2,98	2,040 ± 2,29	0,308 ± 0,48	0,040 ± 0,08
Polímero	1,332 ± 1,50*	0,866 ± 0,52	0,486 ± 0,37	0,000 ± 0,00

* $p < 0,05$ pelo teste “t” de *Student* em relação ao respectivo par, dentro do mesmo momento de avaliação.

Tabela 3 - Valores médios (mm²) das áreas de produção de tecido ósseo na região do defeito ósseo e seus respectivos desvios padrões, em função do tratamento (auto-enxerto esponjoso e polímero de mamona) e dos momentos de avaliação (dias de pós-operatório).

Tratamento	Momento			
	15	30	60	120
Auto-enxerto	8,156 ± 5,12	25,741 ± 7,70	15,790 ± 2,45	14,063 ± 3,50
Polímero	11,019 ± 6,52	13,582 ± 8,66*	12,133 ± 3,78	17,394 ± 4,46

* $p < 0,05$ pelo teste “t” de *Student* em relação ao respectivo par, dentro do mesmo momento de avaliação’.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O local padronizado para realização do defeito segmentar foi o mesmo utilizado por Ciani (2004), visto permitir rápida sustentação do membro sem perigo de colapso, fato verificado no presente experimento. Defeitos de 1cm de comprimento induzidos no rádio de coelhos não podem ser considerados críticos (Ciani, 2004), por apresentarem capacidade de regeneração. No entanto, o osso regenerado ocorre sem retorno à estrutura original do defeito, mesmo com períodos de observação máximo de 12 semanas (Zellin & Linde, 1997) ou de aproximadamente 20 semanas (Ciani, 2004). Sendo assim, materiais testados neste tipo de defeito, para serem efetivos, deverão promover total regeneração óssea, ou seja, a neoformação óssea em 100% da lesão, fato detectado apenas no grupo tratado com auto-enxerto esponjoso, cujo último momento de avaliação correspondia a aproximadamente 17 semanas de pós-operatório.

O auto-enxerto esponjoso obtido da porção proximal do úmero, além de fornecer volume suficiente para o preenchimento do defeito radial, foi de fácil acesso cirúrgico e não exigiu mudança no posicionamento do animal, como citado por outros pesquisadores (Perry, 1999; Finkemeier, 2002). Entre as desvantagens relacionadas a este tipo de enxerto (Pinto-Júnior, 1990; Arrington et al., 1996; Fitch et al., 1997; Itho et al., 1998; Moore, 2001), a principal verificada no experimento foi o aumento do tempo cirúrgico.

Optou-se pelo emprego do polímero de mamona na forma de grãos e não em blocos pré-moldados (Ignácio, 1996; Maria et al., 2003; DelCarlo et al., 2003) visando simular, em termos de colocação e manipulação, as características intrínsecas do enxerto esponjoso. Vale referir que o uso de sangue autólogo foi um fator importante para a melhor agregação do produto no momento da aplicação. Sem a inclusão de sangue poderia haver dispersão dos grânulos. Embora não tenha sido empregado qualquer tipo de barreira, como por exemplo, membranas osteopromotivas (Zellin & Linde, 1996), o biomaterial manteve-se concentrado na falha segmentar, verificado pelos exames radiográfico e histológico.

A análise radiográfica permitiu, em ambos os grupos, o estudo evolutivo da regeneração óssea na falha segmentar, porém não foi adequada para avaliar a presença e modificações dos grânulos de polímero devido à baixa radiopacidade dos mesmos. Isso difere de Silva et al. (1997), que citaram serem as radiografias convencionais excelentes meios para exame do comportamento biológico do tecido ósseo frente a implantes com materiais aloplásticos. A radiopacidade do polímero está associada à quantidade de carbonato de cálcio, em geral na proporção média de 34% a 40% (DelCarlo et al., 2003; Bioosteo, 2004), cuja função seria o fornecimento de íons cálcio, que estimulariam o aparecimento de células osteogênicas (Teixeira & Ramalho, 1995) e melhorariam as propriedades de integração com o tecido ósseo (Ignácio, 1999). Em termos de compatibilidade, Mastrantonio & Ramalho (2003) não verificaram diferenças, ao implantarem discos de poliuretana de mamona acrescidos ou não de carbonato de cálcio no tecido subcutâneo de camundongos.

Os resultados dos exames radiográficos mostraram, nos diferentes momentos de avaliação, que a regeneração óssea foi mais evidente e acelerada no membro tratado com auto-enxerto esponjoso. No último momento de avaliação, aos 120 dias de pós-operatório, o defeito tratado com auto-enxerto esponjoso estava totalmente reconstituído e em fase de remodelação, ao passo que o tratado com polímero apresentava sinais de remodelação, mas com 79% de neoformação óssea, confirmando ser o enxerto ósseo esponjoso autógeno ainda o melhor estimulador da regeneração óssea, como referido por outros autores (Lane, 1999; Moore, 2001).

Os achados da análise histológica auxiliaram na interpretação e comprovação dos resultados radiográficos. A quantidade de trabéculas ósseas foi maior, estatisticamente, no grupo tratado com auto-enxerto esponjoso apenas aos 30 dias de pós-operatório, indicando um processo evolutivo mais acelerado em relação ao grupo tratado com polímero de mamona. Devido ao processo de reabsorção e remodelação ósseas no grupo tratado com auto-enxerto esponjoso, houve uma diminuição da área de trabéculas ósseas aos 60 e 120 dias de pós-operatório, o que justificou a semelhança estatística entre os tratamentos nestes momentos. Vale salientar que em todos os animais deste grupo o canal medular do rádio já estava completamente reconstituído aos 120 dias de pós-operatório. De forma similar, Oliveira et al. (1995), ao promoverem defeitos de 5mm de diâmetro na calota craniana de coelhos, detectaram ausência de reação inflamatória e formação

parcial de tecido ósseo naqueles tratados com polímero de mamona em contraste aos tratados com enxerto ósseo autógeno, que se apresentavam incorporados em fase de remodelação.

Na análise histológica aos 15 dias de pós-operatório o auto-enxerto esponjoso não foi identificado; no entanto, já se evidenciava a formação de tecido cartilaginoso e áreas de neoformação óssea do tipo trabecular. Isto está associado às afirmações de Bauer (2000) de que a maioria das células do auto-enxerto ósseo esponjoso morre como resultado de isquemia após o transplante para o leito receptor, porém as mais resistentes, células mesenquimais primitivas e progenitoras de células endoteliais, proliferam e estimulam a produção óssea.

Embora nos demais momentos de observação tenha havido progressiva maturação no osso neoformado, a formação óssea com presença de tecido cartilaginoso é indicativa de algum grau de instabilidade. Por sua vez, Miclau et al. (1996) ao estudarem a evolução do auto-enxertos esponjosos, implantados em defeitos de 4,5 cm de diâmetro promovidos na diáfise femoral de cães adultos, notaram ausência de tecido cartilaginoso durante a incorporação. Como referido por Bauer (2000), a mecânica no ambiente do enxerto tem profundo efeito na revascularização e na diferenciação celular.

Em nenhum dos momentos de avaliação do defeito tratado com polímero de mamona, detectaram-se sinais de reação inflamatória com presença de células gigantes ou do tipo corpo-estranho, indicando biocompatibilidade do biomaterial. Resultados similares foram verificados por outros autores que empregaram outras formulações do biomaterial em defeitos circulares induzidos no côndilo medial de coelhos (Ohara et al., 1995), calota craniana de coelhos (Oliveira et al., 1995), mandíbula de ratos (Teixeira & Ramalho, 1995) e tíbia de ratos (Mendoza-Barrera et al., 2004); e defeitos segmentares realizados no rádio de coelhos (Ignácio, 1995) e arco zigomático de ratos (Leonel et al., 2004). Por sua vez, embora Calixto et al. (2001) tenham detectado presença de células gigantes tipo corpo estranho quando o biomaterial foi implantado em alvéolo dental de ratos, estas não foram consideradas como sinal de incompatibilidade por causa da discreta ocorrência.

Na medida em que havia proliferação óssea a partir da ulna e das extremidades osteotomizadas do rádio, os grânulos de polímero concentravam-se

no centro do defeito e eram progressivamente envoltos por trabéculas ósseas. No último período de avaliação ainda se verificavam alguns grânulos de polímero envoltos por tecido conjuntivo. Esses achados sugerem que o biomaterial possa ter capacidade de osteointegração, que é caracterizada pela ancoragem direta de um implante devido à formação de tecido ósseo ao seu redor, sem o crescimento de tecido fibroso na interface osso-implante (Merck, 2005). De modo similar, Calixto et al. (2001), ao implantarem flocos de resina de formato irregular e tamanho variável (700 a 1200µm) no alvéolo dental de ratos, detectaram quantidade progressivamente maior de tecido ósseo em maturação entre e ao redor dos flocos, no geral com interposição de tecido conjuntivo. Contrariamente, Ignácio (1999), Maria et al. (2003) e Ziliotto et al. (2003) quando empregaram o biomaterial em cães, respectivamente, no formato de cilindro poroso ou compacto, pino e como cimento ósseo, concluíram ser este não osteointegrável, uma vez que detectaram formação de cápsula fibrosa ao redor do implante.

Por definição, osteocondução refere-se a um arcabouço receptivo que facilita a formação óssea (Bauer & Smith, 2002), pela incursão de vasos sangüíneos e osso neoformado para o seu interior (Greenwald et al., 2001). No presente estudo o crescimento ósseo foi detectado entre os grânulos do polímero de mamona, porém não no interior de seu arcabouço. Desta maneira, não foi possível confirmar o potencial osteocondutor deste biomaterial na forma de grânulos, diferente do observado por outros autores que o empregaram nas formas de blocos, cilindros e flocos (Ignácio, 1995; Ohara et al., 1995; DelCarlo et al., 2003; Figueiredo et al., 2004; Leonel et al., 2004).

Ohara et al. (1995) e Leonel et al. (2003) observaram em seus experimentos neoformação tecidual em meio aos poros do biomaterial, quando aplicados no côndilo medial do fêmur de coelhos e na substituição de segmento do arco zigomático em ratos, respectivamente. Isto não pôde ser verificado no presente estudo, apesar da afirmação da existência de poros no material ora utilizado, os quais seriam de aproximadamente 1 a 2 µm de diâmetro, de acordo com o fabricante (Bioosteo, 2004). Vale salientar que, em estudos *in vitro*, o tamanho mínimo de um poro para facilitar a penetração celular é 20 µm, porém estes devem ser maiores que 50 µm para favorecer a formação de novo osso dentro dos poros (Lu et al., 1999). O diâmetro dos poros no polímero de mamona pode variar de acordo com a sua

apresentação (em forma de biomassa ou pré-moldada) e também de acordo com a concentração de carbonato de cálcio utilizada na sua preparação, uma vez que este preenche os poros existentes no corpo do polímero (Bioosteo, 2004).

Histologicamente não se constatarem sinais de reabsorção dos grânulos do polímero e, estatisticamente, não houve variação entre os diferentes momentos de observação na área média ocupada pelos grânulos. Além do mais, a microscopia de polarização não mostrou alteração na organização estrutural dos grânulos, indicando a capacidade do material como um preenchedor de espaço. Resultados semelhantes foram referidos por Ohara et al (1995), quando implantaram o biomaterial no formato de cilindros no côndilo de coelhos, verificando, pela análise histológica, não haver qualquer agressão do osso à resina poliuretana de mamona, seja reabsorvendo ou substituindo o material. Por sua vez, Mendoza-Barrera et al. (2004) citaram uma mínima reabsorção do biomaterial, por ação celular, quando injetado em defeitos de 1mm, na tíbia de ratos. Estes resultados contrapõem-se ao de Leonel et al. (2004), que relataram reabsorção do polímero de mamona pela ação de macrófagos e posterior substituição por tecido ósseo, quando este foi aplicado na forma de blocos para a reconstrução de defeito segmentar de 2mm no arco zigomático de ratos. Também Caruzo & Roslindo (1995) ao implantarem o biomaterial no arco zigomático de ratos sugeriram ser a presença de células multinucleadas indícios de reabsorção, as quais não foram observadas em nenhum momento no presente estudo.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado este trabalho e baseando-se nos resultados obtidos, conclui-se que:

1. O auto-enxerto esponjoso apresenta maior capacidade de regeneração óssea quando comparado ao polímero de mamona, pelos exames radiográficos e histológicos;
2. Pela avaliação histológica o polímero de mamona na forma de grânulos atua como preenchedor de espaço sem sinais indicativos de degradação, além de ser biocompatível e osteointegrável.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS *

ALEXANDER, J.W. Bone grafting. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.17, n.4, p.811-819, 1987.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Poliquil*. 2005. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=17062>>. Acesso em: 19 jun. 2005.

ARRINGTON, E.D.; SMITH, W.J.; CHAMBERS, H.G.; BUCKNELL, A.L.; DAVINO, N.A. Complications of Iliac Crest Bone Graft Harvesting. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v.329, p.300-309, 1996.

BAUER, T.W.; MUSCHLER, G.F. Bone Graft Materials: an Overview of the Basic Science. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v.1, n.371, p.10-27, 2000.

BAUER, T.W.; SMITH, S.T. Bioactive Materials in Orthopaedic Surgery: Overview and Regulatory Considerations. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, n.395, p.11-22, 2002.

BELOTI, M.M.; HIRAKI, K.R.; BARROS, V.M.; ROSA, A.L. Effect of the chemical composition of *Ricinus communis* polyurethane on rat bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.64, n.1, p.171-176, 2003.

BIOOSTEO. *Bioosteo*. 2004. Disponível em: <<http://www.biomecanica.com.br>>. Acesso em: 10 abril 2004.

BUCHOLZ, R.W. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, n.395, p.44-52, 2002.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6023: informação e documentação - Referências - Elaboração*. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. *Serial sources for the BIOSIS preview database*. Philadelphia, 1996. 468p.

CALIXTO, R.F.E.; TEÓFILO, J.M.; BRENTGANI, L.G.; CARVALHO, T.LL. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. *Pesqui. Odontol. Bras.*, v.15, n.3, p.257-262, 2001.

CARUZO, S.L.; ROSLINDO, N.C. Implantes de resina poliuretana vegetal em arco zigomático de ratos. Estudo histológico. In: JORNADA ACADÊMICA DE ARARAQUARA, 9., 1995, Araraquara. *Anais...* Araraquara: UNESP, 1995. p.116.

CIANI, R.B. *Defeito ósseo segmentar em rádio de coelhos tratado com mistura de proteínas morfogenéticas ósseas, hidroxiapatita, osso inorgânico e colágeno envolta por membrana de pericárdio bovino*. 2004. 94f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

DeLCARLO, R.J.; KAWATA, D.; VILORIA, M.I.V.; OLIVEIRA, D.R.; SILVA, A.S.; MARCHESI, D.R.; GALVÃO, S.R.; AZEVEDO, P.; MONTEIRO, B.S. Polímero de mamona acrescido de cálcio, associado ou não à medula óssea autógena na reparação de falhas ósseas. *Ciênc. Rural*, v.33, n.6, p.1081-1088, 2003.

ERENO, D. Engenharia de materiais - próteses de mamona. *Pesqui. Fapesp*, n.91, p.66-71, 2003.

FERGUSON, J.F. Fracture of the humerus after cancellous bone graft harvesting in a dog. *J. Small Anim. Pract.*, v.37, p.232-234, 1996.

FERREIRA, C.M.; ROSA, O.P.S.; TORRES, S.A.; FERREIRA, F.B.A.; BERNARDINELLI, N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz. Dent. J.*, v.13, n.2, p.118-122, 2002.

FIGUEIREDO, A.S.; FAGUNDES, D.J.; NOVO, N.F.; INOUE, C.M.; TAKITA, L.C.; SASSIOTO, M.C.P. Osteointegração de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita de coral, poliuretana de mamona e enxerto autógeno em coelhos. *Acta Cir. Bras.*, v.19, n.4, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/acb>>. Acesso em: 16 jun. 2005.

FINKEMEIER, C.G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *Bone Joint Surg. Am. Vol.*, v.84, n.3, p.454-464, 2002.

FITCH, R.; KERWIN, S.; SINIBALDI, K.R.; NEWMAN-GAGE, H. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v. 19, n. 5, p. 558-578, 1997.

GLIMCHER, M.J. On the form and function of bone: From molecules to organs. In: VEIS, A. (Ed.) *The Chemistry and Biology of mineralized connective tissues*. New York: Elsevier, 1982. p.617.

GOLDBERG, V.; STEVENSON, S. Natural history of autografts and allografts. *Clin. Orthop.*, v. 225, p. 7-16, 1987.

GREENWALD, A.; BODEN, S.D.; GOLDBERG, V.M.; KHAN, Y.; LAURENCIN, C.T.; ROSIER, R.N. Bone-Graft Substitutes: Facts, Fictions, and Applications. *Bone Joint Surg. Am. Vol.*, v.83, suppl., p.98S-103S, 2001.

HARASEN, G. Repair of comminuted femoral fracture in a cat using cortical and cancellous bone grafting techniques. *Can. Vet. J.*, v. 38, n. 9, p. 574-575, 1997.

IAMAGUTI, P.; INOE, A. P.; DEL CARLO, R. J.; MUNIZ, L. M. R.; MAMPRIM, M. J.; DAL PAI, V. Autogenous cancellous bone graft for treatment of radial fracture: a experimental study in rabbits. *Vet. Zootec.*, São Paulo, v. 7, p. 49 – 61, 1995.

IGNÁCIO, H. *Utilização do cimento derivado do polímero da mamona no preenchimento de falha óssea*. Estudo experimental em coelhos. 1995. 89f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

IGNÁCIO, H.; MAZZER, N.; BARBIERI, C.H.; CHIERICI, G. Estudos sobre a aplicabilidade médica da poliuretana derivada da mamona. *Res. Ortop.*, v.6, p.10-12, 1996.

IGNÁCIO, H. *Avaliação da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento da falha óssea*. Estudo experimental em cães. 1999. 92f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ITHO, T.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; MATSUNAGA, S.; KADOSAWA, T.; KOKUBO, S.; YOKOTA, S.; SASAKI, N. Repair of ulnar segmental defect by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, v.60, p. 451-458, 1998.

JOHNSON, K.A. Cancellous bone graft collection from the tibia in dogs. *Vet. Surg.*, v.15, n.4, p.334-338, 1986.

KHARMANDAYAN, P. *Estudo da interface de contato entre osso e implante de poliuretana com ou sem carbonato de cálcio, empregando microscopia de luz e eletrônica de varredura, em coelhos*. 1997. 175f. Tese (Doutorado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

KEATING, J.F. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *Bone Joint Surg. Br. Vol.*, v. 83, n.1, p.3-8, 2001.

LANE, J.M.; TOMIN, E.B.S.; BOSTROM, M.P.G. Biosynthetic bone grafting. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v.367, suppl., p.107S-117S, 1999.

LARANJEIRA, M.G.; REZENDE, C.M.F.; SÁ, M.J.C.; SILVA, C.M. Implantes de resina de poliuretana vegetal (*Ricinus communis*) na tração linear, fixação e fusão vertebral no cão. Estudo experimental. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.5, p.602-609, 2004.

LEONEL, E.C.F.; MANGILLI, P.D.; RAMALHO, L.T.O.; ANDRADE SOBRINHO, J. A importância da porosidade interna do polímero de mamona durante a neoformação óssea. Estudo em ratos. *Cienc. Odontol. Bras.*, v. 6, n.3, p.19-25, 2003.

LEONEL, E.C.F.; ANDRADE SOBRINHO, J.; OLIVEIRA RAMALHO, L.T.; PORCIÚNA, H.F.; MANGILLI, R. A ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. *Acta Cir. Bras.*, v.19, n.4, p.342-350, 2004.

LU, J.X.; FLAUTRE, B.; ANSELME, K.; HARDOUIN, P.; GALLUR, A.; DESCAMPS, M.; THIERRY, B. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v.10, n.2, p.111-120, 1999.

LU, L.; CURRIER, B.L.; YASZEMSKI, M.J. Synthetic bone substitutes. *Curr. Opin. Orthop.*, v.11, p.383-390, 2000.

MARIA, P.P.; PADILHA FILHO, J.G.; CASTRO, M.B. Análise macroscópica e histological do emprego da poliuretana derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*) aplicada na tíbia de cães em fase de crescimento. *Acta Cir. Bras.*, v.18, n.4, p.332-336, 2003.

MARIA, P.P.; PADILHA FILHO, J.G.; CANOLA, J.C.; CASTRO, M.B. Poliuretana de mamona (*Ricinus communis*) para desvio da crista tibial no cão. *Cienc. Rural.*, v.34, n.3. p.821-827, 2004.

MASTRANTONIO, S.D.S.; RAMALHO, L.T.O. Resposta do tecido conjuntivo de camundongo ao poliuretano vegetal de óleo de mamona. *Rev. Odontol. UNESP*, v.32, n.1, p-31-37, 2003.

MENDOZA-BARRERA, C.; MELÉNDEZ-LIRA, M.; ALTUZAR, V.; TOMÁS, S. A. *Ricinus communis*-based biopolymer and epidermal growth factor Regulations on bone defect repair: A rat tibia model. *Rev. Sci. Instrum.*, v.74, n.1, p.390-392, 2003.

MENDOZA-BARRERA, C.; MELÉNDEZ-LIRA, M.; GARCÍA-LÓPEZ, E.; HERNÁNDEZ-FLORES, C. Caracterización estructural y biointegración del substituto óseo BioOsteo®. *Rev. Mex. Fís.*, v.50, n.1, p.19-23, 2004.

MERCK. Merck Source – Health Information. *Osseointegration*. 2005. Disponível em: < http://www.mercksource.com/pp/us/cns/cns_home.jsp>. Acesso em: 25 jul. 2005.

MICLAU, T.; LINDSEY, R.W.; PROBE, R.; RAHN, B.A.; PERREN, S.M. Autogenous cancellous bone graft incorporation in a gap defect in the canine femur. *J. Orthop. Trauma*, v.10, n.2, p.108-113, 1996.

MOORE, W.R.; GRAVES, S.E.; BAIN, G.I. Synthetic bone graft substitutes. *Anz J. Surg.*, v. 71, p. 354-361, 2001.

OHARA, G.H.; KOJIMA, K.E.; ROSSI, J.C.; TELLES, M.; SOARES, T.V.C.; SALOMÃO, C.; SANDA, M. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretano da mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos. *Acta Ortop. Bras.*, v.3, n.2, p.62-68, 1995.

OLIVEIRA, M.F.; UEDA, J.K; RESENDE, D.; SCARSO FILHO, J. Estudo comparativo entre a reparação de um biomaterial baseado em poliuretano derivado do óleo de mamona e do osso autógeno implantados em sítios realizados na calvária de coelhos. Análise histológica. In: JORNADA ACADÊMICA DE ARARAQUARA, 9., 1995, Araraquara. *Anais...Araraquara*: UNESP, 1995. p.74.

PEREIRA, M. M.; ORÉFICE, R. L.; MANSUR, H. S.; LOPES, M. T. P.; TURCHETTI-MAIA, R. M. M. Preparation and Biocompatibility of Poly (Methyl Methacrylate) Reinforced with Bioactive Particles. *Mat. Res.*, v.6, n.3, p.311-315, 2003.

PERRY, C.R. Bone Repair Techniques, Bone Graft, and Bone Graft Substitutes. *Clin. Orthop. Relat Res.*, n.360, p.71-86, 1999.

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. Bone grafting. In: _____. *Small animal orthopedics and fracture repair*. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1997. Chap.3, p.147-153.

PINTO JÚNIOR, H. S. *Utilização de enxertos ósseos homólogos preservados na reparação de fraturas cominutivas de ossos longos de cães*. 1990. 55f. Dissertação

(Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

REZENDE, C.M.F.; SILVA, M.C.; LARANJEIRA, M.G.; BORGES, A.B.B. Estudo experimental do poliuretano de mamona (*Ricinus communis*) como substituto parcial do tendão calcâneo comum em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.53, n.6. p.695-700, 2001.

SCHENA III, C. J. The procurement of cancellous bone for grafting in small animal orthopedic surgery: a review of instrumentation, technique, and pathophysiology. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 19, p. 695-701, 1983.

SIDDARAMAIAH, M. B. Synthesis and characterization of polyurethane/ polybutyl methacrylate interpenetrating polymer networks. *J. Mater. Sci.*, v.39, p.4615-4623, 2004.

SILVA, M.J.A.; TAVANO, O.; GUIMARÃES, S.A.C.; GOMES, M.F. Estudo do comportamento do tecido ósseo frente ao implante do polímero de mamona em raios de coelhos, pela análise quantitativa das radiopacidades nas imagens radiográficas convencionais. *Rev. FOB.*, v.5, n.3/4, p.69-77, 1997.

SLATTER, D. H. *Manual de cirurgia de pequenos animais*. São Paulo: Manole, 2000. v. 2, cap. 127, p. 2006- 2015.

TEIXEIRA, H. M.; RAMALHO, L.T.O. Reação a resina vegetal de mamona durante o processo de reparo em defeitos ósseos induzidos no corpo da mandíbula. In: JORNADA ACADÊMICA DE ARARAQUARA, 9, 1995, Araraquara. *Anais...Araraquara: UNESP*, 1995. p.117.

ZELLIN, G.; LINDE, A. Effects of different osteopromotive membrane porosities on experimental bone neogenesis in rats. *Biomaterials*, v. 17, p. 695-702, 1996.

ZELLIN, G.; LINDE, A. Treatment of segmental defects in long bones using osteopromotive membranes and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg.*, v. 31, p. 97-104, 1997.

ZILIOTTO, L.; FANTINATTI, A.P.; DALECK, C.R.; PADILHA FILHO, J.G.; SOUZA, A.P.; DINIZ, P.P.V.P. A limb sparing surgery with the use of a cortical allograft preserved in glicerín: an experimental study in dogs. *Acta Cir. Bras.*, v.18, n.2, p.107-115, 2003.