

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MATRIZ ÓSSEA DESMINERALIZADA CAPRINA
(MOD_c) NA REPARAÇÃO DE FALHAS ÓSSEAS NÃO-
CRÍTICAS EM TÍBIAS DE COELHOS**

**Felipe Rocha dos Santos
Médico Veterinário**

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MATRIZ ÓSSEA DESMINERALIZADA (MOD) CAPRINA
NA REPARAÇÃO DE FALHAS ÓSSEAS NÃO-CRÍTICAS EM
TÍBIAS DE COELHOS**

**Discente: Felipe Rocha dos Santos
Orientador: Prof. Assoc. Bruno Watanabe Minto**

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Campus de
Jaboticabal, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Cirurgia Veterinária**

2019

S237m Santos, Felipe Rocha dos
Matriz Óssea Desmineralizada caprina (MODc) na
reparação de falhas ósseas não-críticas em tíbias de
coelhos / Felipe Rocha dos Santos. -- Jaboticabal, 2019
39 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal
Orientador: Bruno Watanabe Minto

1. Microtomografia por raios-X. 2. Ortopedia. 3.
Rejeição de enxerto. 4. Xenoenxerto. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos
pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

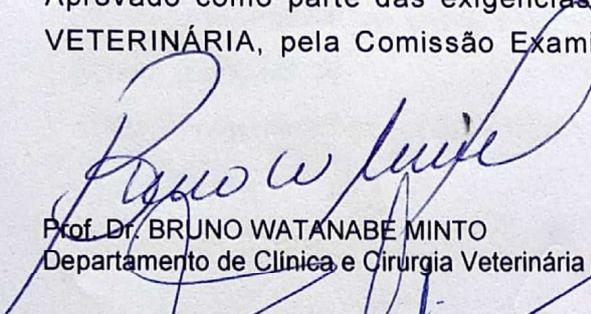
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: MATRIZ ÓSSEA DESMINERALIZADA (MOD) CAPRINA NA REPARAÇÃO DE FALHAS ÓSSEAS NÃO CRÍTICAS EM TÍBIA DE COELHOS

AUTOR: FELIPE ROCHA DOS SANTOS

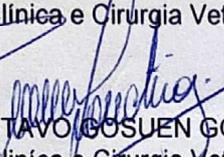
ORIENTADOR: BRUNO WATANABE MINTO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:



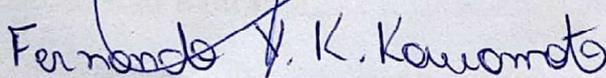
Prof. Dr. BRUNO WATANABE MINTO

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. LUIS GUSTAVO COSUEN GONÇALVES DIAS

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. FERNANDO YOITI KITAMURA KAWAMOTO

Departamento de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Lavras / Lavras/MG

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FELIPE ROCHA DOS SANTOS nasceu na cidade de Sobral - CE, no dia 10 de março do ano de 1989, filho de Manoel Cardoso dos Santos e Glaucivane Rocha dos Santos. Em agosto de 2014, graduou-se em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Kursou o Programa de Aprimoramento em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animas na União Metropolitana para o desenvolvimento da educação e cultura - UNIME (Lauro de Freitas - BA), no período de março de 2015 a março de 2017. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, curso de Mestrado, Universidade Estadual Paulista FCAV – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, em março de 2017, sob orientação do Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto. Durante o curso de Mestrado, foi bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) no período de 01/03/2017 a 30/11/2017 e bolsista FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) no período de 01/12/2017 a 28/02/2019.

EPÍGRAFE

" O cansaço físico, mesmo que suportado forçosamente, não prejudica o corpo, enquanto o conhecimento imposto à força não pode permanecer na alma por muito tempo."

(Platão)

DEDICATÓRIA

A meu Pai Manoel Cardozo dos Santos, que é para mim o maior exemplo de força, superação, humildade e Amor incondicional pela família.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Glaucivane e Manoel Cardozo, que apesar do momento difícil, nunca mediram esforços para me apoiar em minhas decisões, e em meus sonhos. Vocês são minha inspiração de vida.

Aos meus irmãos que apesar da distância, sempre torceram por mim, e me deram força nessa longa trajetória longe de casa.

A toda minha família, pelo apoio e torcida em cada etapa vencida.

A minha companheira de vida Carolina Coltro, por aguentar e dividir minhas dificuldades durante todo esse processo, por seu carinho nos dias de estresse extremo, pela paciência nos surtos, quando desandava o experimento. Enfim, por ser parte importante da minha força nesses dois anos.

Ao meu orientador professor Dr. Bruno Watanabe Minto, por todo o conhecimento agregado desde a época de estágio, assim como as inúmeras oportunidades de crescimento profissional proporcionadas ao longo do mestrado.

Ao professor Dr. Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias, por toda a experiência profissional e humana compartilhada ao longo desses dois anos de convivência harmônica e engrandecedora.

A todos os professores da UNESP – Jaboticabal, por todo o conhecimento compartilhado. Devo muito do meu conhecimento a cada um de vocês.

A todo o grupo de pesquisa em ortopedia e neurocirurgia da UNESP – Jaboticabal, por toda a ajuda e parceria, seja nos projetos ou problemas pessoais.

Aos meus amigos Rafael (frango), Carol, Papa, Matheus e Pedro, por todos as cirurgias, cursos, churrascos e risadas que compartilhamos nesse período. Conviver com vocês foi sensacional e vai deixar saudades.

Ao grande mestre e irmão Thiago (Aladim) por toda a importância que ele teve nesses dois anos de convivência. Conviver com você me fez ver a vida de outra forma. Obrigado por ser essa pessoa humilde e autêntica, capaz de melhorar meu dia com uma conversa rápida, entre um café e outro. Maior satisfação ter você como amigo.

Aos residentes do hospital veterinário, pela amizade, troca de experiências e casos compartilhados.

A Livia Coelho, pela ajuda com os coelhos desde a minha entrada na UNESP, além de fazer comigo toda a parte prática do meu experimento. Sem sua ajuda a dor de cabeça seria bem maior.

A Karina e Adrielly pela ajuda no cuidado dos coelhos, e toda a trabalhadeira que vem junto.

A todos os funcionários do hospital veterinário da UNESP – Jaboticabal, por toda a ajuda, seja na limpeza, no cafezinho, nos chás de final de semana de curso, ou só pela conversa rápida no corredor. Sem vocês nada acontece.

Aos meus irmãos de República (Antro do HV), por serem minha família longe de casa e compartilharem das dores e felicidades que tivemos nesses dois anos de convívio. Não vou citar nomes, porque cometeria injustiça com alguns. Sem vocês, o mestrado não seria a mesma coisa.

Aos animais utilizados no meu trabalho. Que sua breve passagem por esse mundo sirva para melhorar a vida de muitos outros.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo: 2017/09563-9), pelo financiamento da pesquisa. Sem a bolsa concedida o estudo não poderia ser realizado.

Ao professor Mário Taba Júnior pela parceria e disponibilidade de utilização das dependências do Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos e Biomateriais (LAB 3D BIO) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP).

A Adriana Luisa Gonçalves de Almeida por toda a paciência, disponibilidade e conhecimento passado durante o período de análise das amostras, junto ao Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos e Biomateriais (LAB 3D BIO) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), sem você esse trabalho não seria possível.

A todos os animais, que me inspiram e estimulam a evoluir cada vez mais nessa missão de vida que escolhi seguir. Sem os animais o mundo não teria a menor graça.

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho faz parte das obrigações para obtenção do título de mestre em Cirurgia Veterinária pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp – Campus de Jaboticabal – SP. Ele está dividido em capítulos para melhor compreensão e apresentação dos resultados, no qual o capítulo 1 (um) são as considerações gerais, contendo introdução e revisão de literatura e o capítulo 2 (dois) é o artigo científico.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	1
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	1
3 - REFERÊNCIAS	5
CAPÍTULO 2	9
1 - INTRODUÇÃO	10
2 - MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1. Princípios éticos.....	12
2.2. Animais e delineamento experimental.....	12
2.3. Coleta e preparo da Matriz Óssea Desmineralizada caprina (MODc).....	12
2.4. Implante da Matriz Óssea Desmineralizada Caprina (MODc)	13
2.5. Coleta das amostras.....	15
2.6. Avaliação por Microtomografia Computadorizada de raios-X.....	16
2.7. Medidas Volumétricas.....	16
2.8. Análise Estatística.....	18
3 - RESULTADOS	18
3.1. Análise Microtomográfica	19
3.2. Medidas Volumétricas.....	23
4 - DISCUSSÃO	29
5 - CONCLUSÃO	34
6 - REFERÊNCIAS	35

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da matriz óssea desmineralizada (MOD) caprina na reparação de falhas ósseas em coelhos, por meio da microtomografia computadorizada", protocolo nº 007310/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 01 de junho de 2017.

Vigência do Projeto	01/06/2017 a 06/03/2019
Espécie / Linhagem	Coelhos / Nova Zelândia
Nº de animais	15 Machos – 15 Fêmeas
Peso / Idade	4 Kg
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Biotério / Universidade Estadual Paulista / Câmpus de Jaboticabal.

Jaboticabal, 01 de junho de 2017.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS

μ A - Microamper

μ TC – Microtomografia computadorizada

3D – três dimensões

BMPs – Proteína morfogenética óssea

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

cm - Centímetros

TC – Tomografia computadorizada

FORP – Faculdade de odontologia de Ribeirão Preto

GC – Grupo controle

GM – Grupo Matriz

HCl – Ácido Clorídrico

IM – Intramuscular

KCl – Cloreto de potássio

kg – Quilograma

KV - Quilovolt

LAB 3D BIO – Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos e Biomateriais

ME – Microscopia eletrônica

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mm³ - Milímetro cúbico

MOD – Matriz óssea desmineralizada

MODc – Matriz óssea desmineralizada caprina

Mp - Megapixel

NaCl – Cloreto de sódio

°C – Graus Celsius

pH – Potencial hidrogeniônico

ROI – Região de interesse

SC – Subcutâneo

TGF- β - Fator de crescimento transformador beta

TPLO – Osteotomia de nivelamento do platô tibial

UNESP – Universidade Estadual Paulista

US - Ultrassonografia

USP – Universidade de São Paulo

VO: Volume ósseo

VOI – Volume de interesse

VT: Volume total

VO/VT: Relação entre volume ósseo e volume total

SO/VT: Relação entre superfície óssea e volume total

Tb.N: Número de trabéculas

Tb.Th: Espessura trabecular

Tb.Sp: Separação trabecular

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Médias e desvios-padrão dos parâmetros volumétricos (Volume Ósseo, Relação entre Volume Ósseo e Volume Total, Superfície Óssea, Relação entre Superfície Óssea e Volume Total, Número de Trabéculas, Espessura Trabecular e Separação Trabecular) de amostras de tíbia proximal de coelhos da raça Nova Zelândia, adultos nos tempos de eutanásia de 15, 30, 60 e 90 dias.....	24

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1 - Imagens fotográficas demonstrando sequência cirúrgica de perfuração e aplicação da Matriz Óssea Desmineralizada caprina (MODc) em região proximal de tíbia em coelhos adultos da raça Nova Zelândia. A) Aspecto final da falha óssea de 6 mm de diâmetro em tíbia direita. B) Agregado entre Matriz Óssea Desmineralizada caprina e sangue medular previamente à sua aplicação em tíbia esquerda (círculo). C) Preenchimento da falha óssea com o agregado de Matriz Óssea Desmineralizada caprina (MODc) e sangue medular em tíbia esquerda. Jaboticabal – SP, 2019.....</p>	15
<p>Figura 2 - Imagens microtomográficas obtidas aos 15 dias pós-operatórios, por meio do software Data Viewer®, em três eixos (sagital, coronal e transaxial - respectivamente) de amostra óssea proximal de tíbia de coelho, adulto da raça Nova Zelândia do grupo controle (A, B e C), notar fragmentos ósseos radiopacos, oriundos da perfuração cirúrgica, presentes no centro da falha óssea (setas) e do grupo matriz, (D, E e F) com centro da falha óssea radioluscente, devido a presença da MODc (cabeças de seta). Jaboticabal – SP, 2019.....</p>	20
<p>Figura 3 - Imagens microtomográficas obtidas aos 15 dias pós-operatórios, por meio do software Data Viewer®, em três eixos (sagital, coronal e transaxial - respectivamente) de amostra óssea proximal de tíbia de coelho, adulto da raça Nova Zelândia do grupo controle (A, B e C) e do grupo matriz, (D, E e F). É observado início do reparo ósseo, orientado das margens para o centro da falha óssea em ambos os grupos (setas). Jaboticabal – SP, 2019.....</p>	21
<p>Figura 4 - Imagens microtomográficas obtidas aos 60 dias pós-operatórios, por meio do software Data Viewer®, em três eixos (sagital, coronal e transaxial - respectivamente) de amostra óssea proximal de tíbia de coelho, adulto da raça Nova Zelândia do grupo controle (A, B e C) e do grupo matriz, (D, E e F). Visibilizado preenchimento ósseo parcial às três projeções, com maior proliferação óssea, nas amostras do grupo controle, quando comparado ao grupo com presença de MODc. Jaboticabal – SP, 2019.....</p>	22
<p>Figura 5 – Imagens microtomográficas obtidas aos 90 dias pós-operatórios, por meio do software Data Viewer®, em três eixos (sagital, coronal e transaxial - respectivamente) de amostra óssea proximal de tíbia de coelho, adulto da raça Nova Zelândia do grupo controle (A, B e C) e do grupo matriz, (D, E e F). Notar preenchimento subtotal da falha óssea em ambos os grupos, e tecido de reparo em ponte com densidade similar à cortical original, porém de menor espessura (setas) Jaboticabal – SP, 2019.....</p>	23

- Figura 6 –** Representação gráfica dos Valores das médias de Volume Ósseo (mm^3) das amostras de tíbia proximal dos grupos controle (GC) e matriz (GM) nos respectivos tempos de eutanásia (15, 30, 60 e 90 dias). Letras diferentes entre animais do grupo controle e grupo matriz nos mesmos tempos de eutanásia (ex: GC15 – GM15) indicam significância estatística entre as médias pelo teste T Student ($P < 0,05$). Jaboticabal, SP – 2019..... **25**
- Figura 7 –** Representação gráfica dos Valores da relação entre Volume Ósseo e Volume Total (%) dos grupos controle (GC) e matriz (GM) nos respectivos períodos de eutanásia (15, 30, 60 e 90 dias). Letras diferentes entre animais do grupo controle e grupo matriz nos mesmos tempos de eutanásia (ex: GC15 – GM15) indicam significância estatística entre as médias pelo teste T Student ($P < 0,05$). Jaboticabal, SP – 2019..... **26**
- Figura 8 –** Representação gráfica dos Valores de Superfície Óssea (mm^2) dos grupos controle (GC) e matriz (GM) nos respectivos períodos de eutanásia (15, 30, 60 e 90 dias). Letras diferentes entre animais do grupo controle e grupo matriz nos mesmos tempos de eutanásia (ex: GC15 – GM15) indicam significância estatística entre as médias pelo teste T Student ($P < 0,05$). Jaboticabal, SP – 2019..... **27**
- Figura 9 –** Representação gráfica dos Valores da relação entre Superfície Óssea e Volume Total (mm) dos grupos controle (GC) e matriz (GM) nos respectivos períodos de eutanásia (15, 30, 60 e 90 dias). Letras diferentes entre animais do grupo controle e grupo matriz nos mesmos tempos de eutanásia (ex: GC15 – GM15) indicam significância estatística entre as médias pelo teste T Student ($P < 0,05$). Jaboticabal, SP – 2019..... **28**
- Figura 10 -** Representação gráfica dos Valores do Número de Trabéculas (mm) dos grupos controle (GC) e matriz (GM) nos respectivos períodos de eutanásia (15, 30, 60 e 90 dias). Letras diferentes entre animais do grupo controle e grupo matriz nos mesmos tempos de eutanásia (ex: GC15 – GM15) indicam significância estatística entre as médias pelo teste T Student ($P < 0,05$). Jaboticabal, SP – 2019..... **29**

MATRIZ ÓSSEA DESMINERALIZADA CAPRINA (MOD_c) NA REPARAÇÃO DE FALHAS ÓSSEAS NÃO-CRÍTICAS EM TÍBIAS DE COELHOS

RESUMO – Objetivou-se neste estudo avaliar a matriz óssea desmineralizada caprina como xenoenxerto em falhas ósseas tibiais de coelhos. Foram utilizados 24 coelhos fêmeas, adultos da raça Nova Zelândia. Uma falha circular monocortical de 6 mm de diâmetro foi criada em ambas as tíbias, no terço proximal da superfície medial. A lesão da tibia esquerda foi preenchida com 70mg de matriz óssea desmineralizada caprina, enquanto que a direita correspondeu ao controle. Nos períodos pós-operatórios de 15, 30, 60 e 90 dias, os 6 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia e amostras de tibia proximal foram coletadas. As amostras foram escaneadas por meio de microtomografia computadorizada helicoidal. Analisou-se as características macroscópicas do reparo ósseo, o padrão de preenchimento trabecular e formação de tecido ósseo intralesional. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, para os parâmetros volume ósseo e na relação entre volume ósseo e volume total nos tempos 15, 30 e 90 dias, com maior produção óssea obtida do grupo controle. Evidenciou-se também superioridade estatística do grupo controle em relação ao grupo matriz, para as variáveis superfície óssea, relação entre superfície óssea e superfície total e número de trabéculas, nos tempos 15 e 90 dias, indicando maior superfície óssea do tecido de reparo no grupo controle. A matriz óssea desmineralizada caprina demonstrou ser biotolerável e segura em coelhos, durante 90 dias, comprovando por meio de microtomografia computadorizada, o início da reparação óssea em 30 dias após implantação, bem como a formação de ponte óssea aos 60 dias.

Palavras-Chave: Microtomografia por raios-X, Ortopedia, Rejeição de enxerto, Xenoenxerto

CAPRINE DEMINERALIZED BONE MATRIX (MODC) IN THE REPAIR OF NON-CRITICAL BONE DEFECTS IN RABBIT TIBIA

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the demineralized goat bone matrix as xenograft in tibial bone defects of rabbits. Twenty-four female rabbits, New Zealand adults, were used. A circular monocortical defect of 6 mm in diameter was created in the form of tibias, without proximal third of the medial surface. The case of the boundary case of the case of the demineralized caprine, while a corresponding right to control. On the postoperative days of 15, 30, 60 and 90 days, the six animals were submitted to euthanasia and proximal tibia samples were collected. The samples were scanned by computerized helical microtomography. Analyzed as macroscopic of bone repair, trabecular filling pattern and intralesional bone formation. Statistically significant differences were observed between the groups, so that the volumes were adjusted to the variable between volume and total volume at times 15, 30 and 90 days, with higher bone production in the control group. It was also evidenced the statistical superiority of the control group in relation to the set of matrices, such as the temperature in bone ground, the relation between the bone surface and the total surface and the number of trabeculae, in the 15 and 90 days, control. The demineralized bone matrix demonstrated to be biotolerable and safe in systems, during 90 days, proved by computer microtomography, the beginning of the system installation in 30 days after implantation, as well as a bone bridge formation at 60 days.

Key words: Graft rejection, Heterograft, Orthopedics, X-ray Microtomography

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

A bioengenharia tecidual vem ganhando destaque no campo das cirurgias reparadoras, como a ortopedia e a odontologia. Consiste na aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos defeituosos ou danificados (Tabata, 2009). Objetiva-se, essencialmente, a criação e melhoramento de novas terapias, assim como a produção de biomateriais capazes de restituir, melhorar ou impedir o agravamento da lesão tecidual (Kaigler; Mooney, 2001; Sachlos; Czernuszka, 2003).

Para que ocorra reparação do tecido ósseo, há necessidade de atender condições como bom suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica e presença de estrutura tridimensional de suporte. Em defeitos extensos e/ou críticos, a capacidade de regeneração fisiológica fica debilitada havendo, dessa forma, cicatrização por deposição de tecido fibroso, potencialmente disfuncional (Kim et al., 2006).

O estudo e o desenvolvimento de biomateriais e substitutos ósseos tem despertado grande interesse, tendo em vista a real necessidade de sua utilização na rotina clínica ortopédica, como alternativa ao enxerto esponjoso autógeno e o alto custo dos materiais disponíveis comercialmente.

Esse trabalho tem por objetivo central avaliar, de forma inédita, o comportamento da matriz óssea desmineralizada caprina como xenoenxerto, em coelhos, para posterior aplicação em estudos sobre regeneração óssea e aplicabilidade em outras espécies.

2. Revisão de literatura

A enxertia óssea é parte fundamental do tratamento cirúrgico de diversas afecções ortopédicas, odontológicas e neurocirúrgicas. As principais indicações são uniões retardadas, não-uniões, osteotomias e artrodeses, reposição de segmentos

corticais perdidos após exérese de neoplasias ou preenchimento de cavidades císticas (Piermattei et al., 2006; Dias et al., 2013).

O padrão ouro para enxertos é o osso esponjoso autógeno, porém, este é associado a índices importantes de morbidade, tais como dor no local de coleta, formação de hematomas e lesões vasculares. Adicionalmente, há limitações quanto à disponibilidade (Moraes, 2002; Lee et al., 2011). Apesar de ser considerado o enxerto ósseo de primeira escolha, por conter propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras, o osso esponjoso autógeno apresenta algumas desvantagens, como o aumento no tempo de cirurgia e anestesia, morbidade do sítio doador e quantidade insuficiente de enxerto (Innes e Myint, 2010; Borie et al., 2011).

Os aloenxertos de osso cortical proporcionam estrutura tridimensional osteocondutora e suporte estrutural mecânico imediato, favorecendo restabelecimento precoce à função do membro afetado (Dias et al., 2013), porém, devido a transferência de tecidos entre animais distintos, eleva-se o risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas e rejeição por parte do organismo receptor (Tomford, 2000).

É importante ressaltar que um substituto ósseo ideal deve conter células osteogênicas, fatores osteoindutores e matriz osteocondutora, que atua como estrutura para o crescimento interno de tecido ósseo novo e suporte estrutural para a coluna óssea (Albrektsson; Johansson, 2001; Walsh et al., 2008). Nesse contexto a matriz óssea desmineralizada (MOD), resultado da extração mineral ácida de ossos corticais, é considerada como potencial substituto ósseo, sendo composta por colágeno, fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas ósseas (Giannoudis et al., 2005; Hoffer et al., 2008).

Um estudo pioneiro que demonstrou a capacidade da MOD em induzir a formação de cartilagem e osso, quando aplicada em sítios extra esqueléticos, foi realizado por Urist (1965). Trabalho este que levou à descoberta de componentes proteicos, presentes na MOD, que estimulam a formação óssea (osteoindução), hoje conhecidas como proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), membros da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- β). A MOD é osteoindutora e revasculariza-se rapidamente, mas não proporciona sustentação estrutural a menos que seja parcialmente desmineralizada (Innes e Myint, 2010).

A maior parte da MOD (aproximadamente 93%) é composta por colágenos, responsáveis pela estrutura tridimensional osteocondutora da mesma, onde cerca de 90% é representado por colágeno tipo I e o restante, pelos tipos III, V e demais fibrilas heterotípicas. As proteínas não colágenas, como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) e as de crescimento sinérgico (TGF- β , fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento semelhante à insulina, fator de crescimento de fibroblastos) perfazem cerca de 5% da MOD, e os 2% restantes são oriundos da matriz mineralizada residual após o processo de desmineralização (Kale e Di Cesare, 1995).

Para a obtenção da matriz óssea desmineralizada bovina, Bigham et al. (2009) utilizaram diáfises de ossos longos de vaca holandesa de 2 anos de idade, obtidos em abatedouro local. Os ossos foram coletados assepticamente e os tecidos moles removidos. Após a remoção da fáscia, era cortado em pedaços de 1 cm com serra oscilatória ortopédica sob constante irrigação com solução fisiológica. As peças ósseas foram armazenadas a -70 °C até uso posterior. O descongelamento era realizado em etanol absoluto e secas ao ar. Todo o osso foi moído e então descalcificado em HCl 0,6 N durante 8 dias sob agitação constante.

A confirmação da eficácia no processo de desmineralização é obtida por meio de radiografia e análise do percentual de cálcio (Vail et al., 1994). A perda de densidade radiográfica é utilizada de forma subjetiva para constatação da desmineralização óssea. Para a análise de cálcio, uma amostra do material é submetida a temperatura de 600°C durante 24 horas e o material remanescente é analisado por meio de espectrofotometria, indicando o percentual de cálcio por grama de matéria seca (Forell et al., 1993). O material pode ser considerado desmineralizado quando obtido percentual de cálcio menor que 1% (Urist e Strakes, 1970)

A MOD não possui efeito osteogênico, devido ao seu processamento e eliminação das células vivas, porém as funções de osteoindução e osteocondução permanecem presentes, sendo considerada bom agente osteoindutor (Zimmermann e Moghaddam, 2011).

Como uma das primeiras alternativas comercialmente disponíveis para os enxertos ósseos autógenos em humanos (Kinney et al., 2010), a matriz óssea desmineralizada tem sido usada como material de enxertia para defeitos esqueléticos estáveis, como cistos e cavidades ósseas (Killian et al., 1998), defeitos na união de

ossos longos (Ziran et al., 2005), defeitos ósseos agudos provocados por fraturas (Newman et al., 2008), correção de grandes defeitos ósseos causados pela retirada de tumores malignos (Jin, 1991), intervenções cirúrgicas na coluna vertebral (Morone e Boden, 1998), falhas ósseas relacionadas à implantodontia (Kim et al., 2009) e aumento do seio maxilar (Sohn et al., 2009).

De acordo com estudo controlado realizado em cães por Hoffer et al. (2008), a MOD apresentou resultados similares aos do enxerto de osso esponjoso autólogo, para a técnica de osteotomia de nivelamento do platô tibial, em que foi observado retorno à função em até duas semanas antes que o grupo controle. As taxas de complicações cirúrgicas nos animais que receberam a MOD, foram similares aos já publicados para procedimentos similares, na qual o biomaterial não era utilizado, sugerindo que sua aplicação nesse tipo de cirurgia não eleva as taxas de complicações (Hoffer et al., 2008).

O monitoramento e acompanhamento de fraturas experimentais, no intuito de desenvolver novas técnicas para o reparo de falhas ósseas, geralmente é realizado por meio de exames radiográficos, os quais proporcionam avaliação unicamente bidimensional do calo ósseo, que possui originalmente estrutura tridimensional (Morgan, 2009).

A tomografia computadorizada (TC) proporciona imagens tridimensionais e medidas quantitativas da estrutura e mineralização do calo ósseo, dados estes relacionados à sua rigidez e resistência. As análises obtidas pela TC são de grande valor, pois possibilitam a correlação entre os aspectos biológicos e mecânicos da fratura, de maneira confiável e não-invasiva. Devido à sua maior resolução, quando comparada à TC, a microtomografia (μ TC) vem sendo bastante utilizada em estudos experimentais de avaliação do reparo de fraturas em pequenos animais (Introini, 2011).

A microtomografia computadorizada é uma técnica não destrutiva, capaz de reconstruir e modelar interiores de amostras em escala micrométrica, obtendo informações sobre sua geometria tridimensional e propriedades do material estudado. O conceito básico desse processamento de imagem prova que um objeto tridimensional pode ser reconstruído através de suas projeções bidimensionais (Argenta et al., 2016). A natureza não destrutiva do micro-TC é uma das suas principais vantagens. O osso pode ser analisado após dissecação post-mortem de

pequenos animais (ratos, camundongos, coelhos) ou após extração por biópsia de paciente humano. Após a análise por micro-TC, as amostras podem então ser processadas e analisadas por histologia ou sujeitas às análises químicas, bioquímicas ou outros (Audran et al., 2001).

A avaliação por micro-TC permite a obtenção de imagens durante todo o processo de regeneração óssea, permitindo análises mais específicas como resistência óssea, correlação entre área e volume ósseo, assim como a densidade mineral óssea, fornecendo características estruturais e mecânicas das alterações decorrentes de intervenções terapêuticas, como a utilização de ultrassonografia (US) e Laser para favorecer a consolidação óssea (Freeman et al., 2009; Paolillo, 2013). De acordo com Bouxsein et al. (2010) em roedores é possível obter parâmetros volumétricos relacionados à quantidade do tecido ósseo (volume e porcentagem do volume ósseo) e relacionados à morfometria do tecido ósseo trabecular (espessura das trabéculas; número das trabéculas; separação entre as trabéculas e porosidade total).

3. Referências

Albrektsson T, Johansson C (2001) Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal** 10:96-101.

Argenta MA, Buriol TM, Hecke MB. Metodologia para obtenção de parâmetros físicos e geométricos do osso trabecular função de imagens de micro tomografia. Disponível em: <http://www.grupo.bioengenharia.ufpr.br> Acesso em: 15/11/2016.

Audran M, Chappard D, Legrand E, Libouban H, Basle MF (2001) Bone microarchitecture and bone fragility in men: DXA and histomorphometry in humans and in the orchidectomized rat model. **Calcified Tissue International** 69:214-217.

Bigham AS, Dehghani SN, Shafiei Z, Torabi SN (2009) Experimental bone defect healing with xenogenic demineralized bone matrix and bovine fetal growth plate as a new xenograft: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. **Cell and Tissue Banking** 10(1):33.

Borie E, Fuentes R, del Sol M, Oporto G, Engelke W (2011) The influence of FDDBA and autogenous bone particles on regeneration of calvaria defects in the rabbit: A pilot study. **Annals of Anatomy** 193(5):412-417.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research** 25(7):1468-86.

Dias MIR, de Sousa CMP, de Carvalho PMP, Lempek MR, Viegas CAA, de Azevedo JMT (2013) Enxertos e substitutos ósseos em cirurgia ortopédica reconstrutiva nos animais de companhia - Uma breve revisão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 35(4):339-350.

Forell EB, Straw RC, Powers BE, Johnson J, Cooper MF, Withrow StJ (1993) Evaluation of the osteoinductive capacity of canine demineralized bone matrix in heterotopic muscle sites of athymic rats. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology** 6:21–28.

Freeman TA, Patel P, Parvizi J, Antoci VJr, Shapiro IM (2009) Micro-CT analysis with multiple thresholds allows detection of bone formation and resorption during ultrasound-treated fracture healing. **Journal of Orthopaedic Research** 27(5):673-679.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005) Bone substitutes: an update. **Injury** 36(3):20-27.

Hoffer MJ, Griffon DJ, Schaeffer DJ, Johnson AL, Thomas MW (2008) clinical applications of demineralized bone matrix: a retrospective and case-matched study of seventy-five dogs. **Veterinary Surgery** 37:639–647

Innes JF, Myint P (2010) Demineralised bone matrix in veterinary orthopaedics: A review. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology** 23(6):393-399.

Introini SO (2011) Avaliação do Reparo Tecidual em Defeito Ósseo por Microtomografia Tridimensional por Raio X. Dissertação. Universidade de São Paulo.

Jin, DD (1991) Bone matrix gelatin. Clinical application in 38 cases. **Zhonghua Wai Ke Za Zhi** 29(5):312-4.

Kaigler D, Mooney D (2001) Tissue engineering's impact on dentistry. **Journal of Dental Education** 65(5):456-462.

Kale AA, di Cesare PE (1995) Osteoinductive agents. Basic science and clinical applications. **The American Journal of Orthopaedics** 24:752-761.

Killian JT, Wilkinson L, White S, Brassard M (1998) Treatment of unicameral bone cyst with demineralized bone matrix. **Journal of Pediatric Orthopaedics** 18(5):621-4.

Kim S-S, Park MS, Jeon O, Choi CY, Kim B-S (2006) Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials** 27(8):1399-1409.

Kim YK, Yun PY, Kim SG, Kim BS, Ong JL (2009) Evaluation of sinus bone resorption and marginal bone loss after sinus bone grafting and implant placement. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**.

Kinney RC, Ziran BH, Hirshorn K, Schlatterer D, Ganey T (2010) Demineralized bone matrix for fracture healing: fact or fiction? **Journal of Orthopaedic Trauma** 24(1):52-55.

Lee JH, Lee K, Baek HR, Jang SJ (2011) Combined effects of porous hydroxyapatite and demineralized bone matrix on bone induction: in vitro and in vivo study using a nude rat model. **Biomedical materials** 6(1):1-7.

Moraes PC (2002) **Biocompatibilidade e comportamento do cimento de fosfato de cálcio, reforçado com diferentes tipos de fibras, implantado no rádio de coelhos**. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal, 73p.

Morgan EF (2009) Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. **Bone** 44(2):335-344.

Morone MA, Boden SD (1998) Experimental posterolateral lumbar spinal fusion with a demineralized bone matrix gel. **Spine** 23(2):159-67.

Newman JT, Smith WR, Ziran BH, Hasenboehler EA, Stahel PF, Morgan SJ (2008) Efficacy of composite allograft and demineralized bone matrix graft in treating tibial plateau fractures with bone loss. **Orthopedics** 31(7):649.

Paolillo AR (2013) **Avaliação por microtomografia de raio-x do reparo ósseo em osteotomia completa de tibia em ratos após tratamento com ultrassom de baixa intensidade e laser de baixa potência**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Piermattei DL, Flo GL, DeCamp CE (2006) Bone grafting, In: Brinker WO, Piermattei DL, Flo GL (Eds.), **Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair**. 4th ed. Saunders Elsevier, St. Louis, MO. p.160-167.

Sachlos E, Czernuszka JT (2003) Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **European cells & materials** 5:29-40.

Sohn DS, Bae MS, Choi BJ, An KM, Shin HI (2009) Efficacy of demineralized bone matrix paste for maxillary sinus augmentation: A histologic and clinical study in humans. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology** 108(5):30-5.

Tabata Y (2009) Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of the Royal Society Interface** 6:311-324.

Tomford WW (2000) Bone allografts: past, present and future. **Cell and tissue bank** 1:105-109.

Vail TB, Trotter GW, Powers BE (1994) Equine demineralized bone matrix: relationship between particle size and osteoinduction. **Veterinary Surgery** 23:386-395.

Urist MR (1965) Bone: Formation by Autoinduction, **Science** 150(3698):893-899.

Urist MR, Strakes BS (1970) Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix. **Clinical Orthopaedics and Related Research** 71:271-278.

Walsh WR, Vizesi F, Michael D, Auld J, Langdown A, Oliver R, Yu Y, Irie H, Bruce W (2008) β -TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. **Biomaterials** 29(3):266-271.

Zimmermann G, Moghaddam A (2011) Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. **Injury** 42:16-21.

Ziran B, Cheung S, Smith W, Westerheide K (2005) Comparative efficacy of 2 different demineralized bone matrix allografts in treating long-bone nonunions in heavy tobacco smokers. **American Journal of Orthopedics** 34(7):329-332.

CAPÍTULO 2 – Matriz óssea desmineralizada caprina (MODc) na reparação de falhas ósseas não críticas da tíbias de coelhos

RESUMO – Objetivou-se neste estudo avaliar a matriz óssea desmineralizada caprina como xenoenxerto em falhas ósseas tibiais de coelhos. Foram utilizados 24 coelhos fêmeas, adultos da raça Nova Zelândia. Uma falha circular monocortical de 6 mm de diâmetro foi criada em ambas as tíbias, no terço proximal da superfície medial. A lesão da tíbia esquerda foi preenchida com 70mg de matriz óssea desmineralizada caprina, enquanto que a direita correspondeu ao controle. Nos períodos pós-operatórios de 15, 30, 60 e 90 dias, os 6 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia e amostras de tíbia proximal foram coletadas. As amostras foram escaneadas por meio de microtomografia computadorizada helicoidal. Analisou-se as características macroscópicas do reparo ósseo, o padrão de preenchimento trabecular e formação de tecido ósseo intralesional. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, para os parâmetros volume ósseo e na relação entre volume ósseo e volume total nos tempos 15, 30 e 90 dias, com maior produção óssea obtida do grupo controle. Evidenciou-se também superioridade estatística do grupo controle em relação ao grupo matriz, para as variáveis superfície óssea, relação entre superfície óssea e superfície total e número de trabéculas, nos tempos 15 e 90 dias, indicando maior superfície óssea do tecido de reparo no grupo controle. A matriz óssea desmineralizada caprina demonstrou ser biotolerável e segura em coelhos, durante 90 dias, comprovando por meio de microtomografia computadorizada, o início da reparação óssea em 30 dias após implantação, bem como a formação de ponte óssea aos 60 dias.

PALAVRAS-CHAVE: microtomografia por raio-x, ortopedia, rejeição de enxerto, xenoenxerto,

1. Introdução

A enxertia óssea é parte fundamental dentre as variadas modalidades de cirurgias reparadoras. Devido à constante busca por resultados mais satisfatórios, cresce a demanda por substitutos ósseos ideais, capazes de diminuir o tempo de consolidação óssea ou melhorar a qualidade do processo reparador (Gruskin et al., 2012).

O enxerto ósseo esponjoso autólogo, considerado padrão ouro, apresenta vantagens em relação aos demais biomateriais, visto que fornece células osteoprogenitoras viáveis (osteogenicidade), arcabouço tridimensional de suporte (osteocondução) e induz a formação de células da linhagem óssea a partir de células mesenquimais indiferenciadas dos tecidos adjacentes (osteoindução) (Albrektsson e Johansson, 2001; Precheur, 2007). Apesar de reconhecida eficácia clínica e segurança, o incremento no tempo cirúrgico e anestésico para a coleta no sítio doador, a morbidade associada a esse procedimento e a quantidade potencialmente insuficiente de tecido disponível em alguns pacientes têm estimulado a pesquisa e busca por substitutos ósseos que supram esses fatores negativos.

Os aloenxertos de osso cortical proporcionam estrutura osteocondutiva e suporte estrutural mecânico imediato, favorecendo restabelecimento precoce à função do membro afetado (Dias et al., 2013), porém, devido a transferência de tecidos entre animais distintos, existe a possibilidade de transmissão de doenças infecto-contagiosas e rejeição por parte do organismo receptor (Tomford, 1995), o que não é observado na enxertia de tecido autólogo (Albrektsson e Johansson, 2001).

Xenoenxerto é caracterizado como um material de substituição, proveniente de uma espécie animal diferente do receptor, capaz de fornecer uma matriz natural e estável que permita suportar e guiar a proliferação de células da linhagem osteoblástica do hospedeiro (Alcaides, 2012). Derivados de matriz óssea de origem bovina, suína, equina e de algumas espécies de coral marinho já foram testados com resultados satisfatórios para reposição de tecido ósseo (Ramirez-Fernandez et al., 2011).

A matriz óssea desmineralizada (MOD), é o resultado da extração mineral ácida de ossos corticais, sendo constituída em sua maior parte por matriz colagenosa, e em menor proporção, por fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas ósseas

(Giannoudis et al., 2005; Hoffer et al., 2008). É considerada como importante opção terapêutica para lesões ósseas apendiculares, axiais e craniofaciais, possuindo propriedades osteocondutoras e osteoindutoras que promovem a regeneração óssea (Gruskin et al., 2012).

Os substitutos ósseos, para além de serem considerados alógenos, xenógenos ou sintéticos, devem ser sempre biocompatíveis, isentos de capacidade antigênica, e passíveis de esterilização, mantendo-se fáceis de manusear (Baldini et al., 2011).

É sabido que o processo de desmineralização é responsável pela destruição dos materiais antigênicos do osso e, por essa razão, a MOD é considerada menos imunogênica do que o osso homólogo mineralizado (Guizzardi et al., 1992). Assim, a matriz óssea desmineralizada caprina, aparece como potencial substituto ósseo, que apesar de sua origem xenogênica, oferece baixo risco de reação imunológica, com a vantagem de um único doador fornecer quantidade significativa de tecido ósseo, possibilitando a constituição de banco de ossos apropriado para o fornecimento de enxertos ósseos (Melo et al., 1998; Alievi et al., 2007).

Tendo em vista essas características, cresce a demanda por substitutos ósseos que possuam viabilidade na rotina clínico-cirúrgica de pequenos animais, apresentando baixo custo, fácil produção e armazenamento. Acreditamos que a MODc seja biocompatível quando submetida ao processo de desmineralização ácida, atuando como potencial substituto ósseo no reparo de lesões ortopédicas.

Este trabalho tem por objetivos, avaliar a resposta inflamatória macroscópica nas feridas cirúrgicas de coelhos, após a implantação de MODc em falhas tibiais induzidas, observar o preenchimento ósseo das falhas produzidas, com e sem a presença do biomaterial, analisar o padrão de preenchimento trabecular e a produção de tecido ósseo por meio da microtomografia computadorizada helicoidal de alta definição.

2. Material e métodos

2.1. Princípios éticos

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/Jaboticabal, sob o protocolo de número 019170/2016.

2.2. Animais e delineamento experimental

Foram utilizadas no estudo, 48 tíbias de 24 coelhos adultos da raça Nova Zelândia, fêmeas, provenientes do Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, acondicionados em gaiolas individuais nas dependências do hospital veterinário da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

Antes do início do período experimental, todos os animais foram submetidos a exame físico geral, não sendo observadas quaisquer alterações dignas de nota, sendo estes então incluídos no estudo. Os indivíduos foram distribuídos em 4 grupos com 6 animais em cada grupo, separados de acordo com o período de análise correspondente (15, 30, 60 e 90 dias pós-cirúrgico) e subdivididos em GM (grupo matriz), representando o membro que recebeu o implante de MODc (tíbias esquerdas) e GC (grupo controle) relativo as tíbias direitas, as quais não recebiam o biomaterial, por exemplo: GM15 = grupo com implante de MODc aos 15 dias pós-cirúrgicos.

2.3. Coleta e preparo da Matriz Óssea Desmineralizada caprina (MODc)

Foram utilizados caprinos clinicamente hígidos, provenientes de abates periódicos. O processo de desmineralização óssea seguiu o protocolo descrito por Bigham et al. (2009). Os fragmentos da diáfise de ossos longos, como úmero, rádio, fêmur e tíbia, foram coletados de forma asséptica, os tecidos moles retirados e as epífises removidas para limpeza do canal medular para posterior estocagem em freezer a -20°C . Os ossos foram seccionados em fragmentos de 1 cm de comprimento com auxílio de serra cirúrgica sob constante irrigação com solução salina (NaCl 0,9%), sendo então estocados em freezer -20°C para posterior desmineralização ácida.

Os fragmentos ósseos foram lavados com solução de etanol absoluto¹ e secas ao ar ambiente, e então triturados com auxílio de um particulador ósseo. O tecido triturado foi imerso em solução de HCl² 0,6 N durante oito dias, sob constante agitação suave. Após o processo de desmineralização, o pH da MODc foi ajustado para 7,3.

Para determinar a quantidade de biomaterial a ser implantado por falha óssea, em momento pré-cirúrgico foi modelado e posteriormente impresso em nylon, por meio de impressora 3D, um cilindro com 6 mm de diâmetro por 3 mm de profundidade, representando a área do defeito da tibia utilizada no estudo em questão. O cilindro foi preenchido com MODc particulada e em seguida, foi adicionado sangue em quantidade suficiente para agregar os grânulos do biomaterial. Após a coagulação do sangue, o material depositado no cilindro foi removido e pesado em balança de precisão. Por meio dessa técnica, foi estabelecida a dose individual de 70 mg de MODc, para preenchimento das falhas ósseas experimentais. Todas as doses a serem utilizadas no estudo foram então pesadas e separadas individualmente e posteriormente submetidas a esterilização por óxido de etileno.

2.4. Implante da Matriz Óssea Desmineralizada Caprina (MODc)

Os coelhos foram pré-anestesiados com associação de acepromazina³ (0,1 mg/kg IM) e tramadol⁴ (5 mg/kg IM) e, após 15 minutos, anestesiados com a associação de tiletamina/zolazepam⁵ (20 mg/Kg IM), seguida por bloqueio local infiltrativo com lidocaína⁶ 2,0%, no local da incisão de pele.

Após ampla tricotomia de ambos os membros pélvicos, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, para exposição da face medial de ambas as tíbias. As extremidades distais dos membros pélvicos foram cobertas com luvas estéreis, sendo aplicado clorexidine degermante⁷ 2%, seguido por clorexidine alcoólico⁸ 0,5%,

¹ Etanol absoluto para análises, EMSURE®, Alemanha

² Ácido Clorídrico 33%, Solvay, Chapecó – SC, Brasil

³ Apromazin, Syntec, Santana de Parnaíba – SP, Brasil.

⁴ Tramal®, Pfizer, Guarulhos – SP, Brasil.

⁵ Zoletil® 50, Virbac, Jurubatuba – SP, Brasil.

⁶ Lidovet, Bravet, Rio de Janeiro – RJ, Brasil

⁷ RIOHEX® 2% - Solução degermante - Indústria Farmacêutica RIOQUÍMICA LTDA – São José do Rio Preto - SP

⁸ RIOHEX® 0,5% - Solução alcoólica - Indústria Farmacêutica RIOQUÍMICA LTDA – São José do Rio Preto - SP

como protocolo de antissepsia do sítio cirúrgico. Em ato contínuo, foram corretamente posicionados campos cirúrgicos estéreis cobrindo toda a superfície corporal do animal, ficando expostos somente os sítios cirúrgicos.

Foi realizada incisão de pele de aproximadamente 2 centímetros em região próximo-medial das tíbias direita e esquerda. Logo abaixo da pele, foi seccionada fáscia muscular e em seguida foi identificado o periósteo, sendo submetido à incisão e rebatido com auxílio de elevador de Freer, expondo a cortical medial da tíbia proximal.

Utilizando o ligamento colateral medial como referência anatômica, foi selecionado um ponto equidistante entre a borda cranial da crista da tíbia e o limite cranial do referido ligamento como ponto de perfuração padrão para todos os animais. Devido ao alto calibre da broca utilizada (6 mm), em relação ao diâmetro do osso a ser perfurado, realizou-se pré-perfuração inicial de menor diâmetro na cortical “cis”, no intuito de limitar movimentação exacerbada na broca, assim como evitar fraturas iatrogênicas.

Com utilização de perfuradora elétrica e broca de 6 mm foram induzidas falhas ósseas circulares monocorticais de mesmo diâmetro em ambas as tíbias. Para as tíbias esquerdas (GM), com seringa estéril foi coletado de cada defeito, amostra de sangue medular em quantidade suficiente para umedecer a dose de MODc particulada a ser implantada, auxiliando na agregação e manipulação da mesma.

Nos animais de cada grupo, o defeito realizado na tíbia esquerda recebeu a matriz óssea desmineralizada caprina, aplicada por meio de preenchimento. No membro contralateral não foi implantado o xenoenxerto, permanecendo como controle. Após o correto posicionamento do biomaterial testado, a fáscia muscular foi suturada com material absorvível monofilamentar sintético 4-0⁹ em padrão simples contínuo e em seguida procedeu-se a dermorráfia com utilização de fio inabsorvível monofilamentar sintético 4-0¹⁰ em padrão de Wolf (Figura 1).

⁹ Caprofyl 4-0, Johnson & Johnson do Brasil indústria e comércio de produtos para saúde Ltda – Brasil

¹⁰ Mononylon 4-0, Johnson & Johnson do Brasil indústria e comércio de produtos para saúde Ltda – Brasil

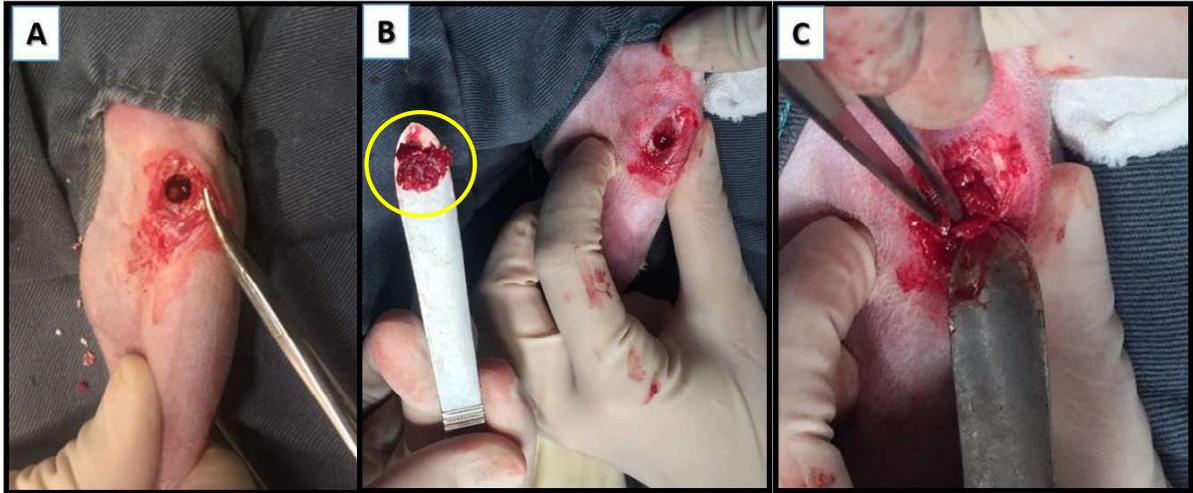


Figura 1 – Imagens fotográficas demonstrando sequência cirúrgica de perfuração e aplicação da Matriz Óssea Desmineralizada caprina (MODc) em região proximal de tíbia em coelhos adultos da raça Nova Zelândia. A) Aspecto final da falha óssea de 6 mm de diâmetro em tíbia direita. B) Agregado entre Matriz Óssea Desmineralizada caprina e sangue medular previamente à sua aplicação em tíbia esquerda (círculo). C) Preenchimento da falha óssea com o agregado de Matriz Óssea Desmineralizada caprina (MODc) e sangue medular em tíbia esquerda. Jaboticabal – SP, 2019.

Todos os animais foram medicados no período pós-operatório com antimicrobiano (Enrofloxacina¹¹ - 10 mg/kg SC) a cada 24 horas, durante 5 dias, analgésico (Cloridrato de tramadol¹² – 4 mg/kg IM) a cada 12 horas, durante 5 dias e anti-inflamatório (Flunixin meglumine¹³ - 1,1 mg/kg IM) a cada 24 horas, durante 3 dias. As feridas cirúrgicas foram limpas uma vez ao dia com solução salina estéril 0,9% e observadas quanto a evolução de cicatrização e possíveis complicações.

2.5. Coleta das Amostras

Para a coleta das amostras, cada grupo (6 animais) foi submetido à eutanásia nos períodos pré-estabelecidos de 15, 30, 60 e 90 dias de pós-operatório, por meio de sedação por cloridrato de xilazina¹⁴ (2 mg/kg IM), indução anestésica com

¹¹ Flotril 2,5%, Intervet Schering - Plough, Rio de Janeiro - RJ, Brasil

¹² Tramal®/Grünenthal do Brasil Farmacêutica Ltda. – São Paulo – SP, Brasil

¹³ Banamine pet, Intervet Schering - Plough, Rio de Janeiro - RJ, Brasil

¹⁴ Xilazin®/ Syntec do Brasil LTDA - Hortolândia- SP

propofol¹⁵ (dose-efeito), por via intravenosa, seguido por aplicação de cloreto de potássio¹⁶ (KCl), também por via intravenosa, até ser constatada parada cardíaca.

Todas as tíbias foram desarticuladas na articulação fêmoro-tíbio-patelar e dissecadas, afim de preservar o calo ósseo formado (se presente) e remover os tecidos moles adjacentes (músculos, fáscia e pele) à região da falha óssea induzida. Com utilização de serra manual, foi seccionado fragmento de aproximadamente 2 cm de comprimento, incluindo a área de interesse do estudo. As amostras de tíbia proximal foram logo em seguida, acondicionadas em frascos coletores, contendo formol tamponado a 10%, por 48 horas, para fixação, sendo transferidas para recipientes contendo álcool 70 e identificados individualmente, por período de análise e aplicação ou não da MODc.

2.6. Avaliação por Microtomografia Computadorizada de raios-X

As avaliações dos reparos dos defeitos ósseos em ambas as tíbias foram realizadas no Laboratório Multiusuário para Análises de Imagens Tridimensionais de Tecidos Biológicos e Biomateriais (LAB 3D BIO), nas dependências do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP USP – Ribeirão Preto. Foram utilizados o microtomógrafo modelo 1172 (SkyScan®, Bélgica)¹⁷ e os softwares NRecon®¹⁸, Dataviewer®¹⁹ e CT- Analyser®²⁰, fornecidos pelos fabricantes do microtomógrafo.

2.7. Medidas Volumétricas

No presente estudo, foram avaliados os parâmetros volumétricos: Volume ósseo, relação entre volume ósseo e volume total, superfície óssea, relação entre superfície óssea e volume total, número de trabéculas, espessura trabecular e

¹⁵ Propovan®/ Cristália – Itapira-SP

¹⁶ Solução de cloreto de potássio 19,1% - Indústria Farmacêutica EQUIPLEX®- Goiânia

¹⁷ Microtomógrafo SkyScan® 1172, Bruker, Bélgica

¹⁸ Software NRecon®, Bruker, Bélgica

¹⁹ Software Data Viewer®, Bruker, Bélgica

²⁰ Software CT-Analyser®, Bruker, Bélgica

separação trabecular. A análise dessas medidas tem por objetivo, quantificar o volume ósseo produzido no tecido de reparo, assim como características estruturais do osso trabecular neoformado.

Para as análises volumétricas, foi escolhido um eixo de interesse (sagital) e utilizado um programa específico de análise 3D (CTAnalyser®). Por meio do software CT-Analyser®, a figura geométrica de uma circunferência foi escolhida para representar a região a ser analisada; região de interesse (ROI). Esta forma geométrica foi sobreposta à área circunferencial da falha óssea e as secções bidimensionais foram interpoladas, gerando o volume de interesse (VOI). Assim, o ROI compreende a região selecionada de uma única seção transversal 2D. O VOI refere-se à soma de todos os ROIs coletivos, representando um volume 3D selecionado.

Foram realizados os seguintes procedimentos para segmentação e visualização do reparo ósseo das falhas nas tíbias proximais analisadas:

- 1) Escaneamento microtomográfico dos fragmentos de tíbia proximal excisados com os parâmetros: fonte de raios-X operando com 100 KV e 100 μ A, filtro de alumínio de 0,5 mm de espessura, rotação de 180° com incremento angular de 0,4°, aquisição de imagens com câmara Hamamatsu 9300 de 10 Mp e resolução de 8,7 μ m.
- 2) Reconstrução microtomográfica das amostras ósseas pelo software Nrecon®, através do algoritmo de Feldkamp et al. (1984).
- 3) O software Data Viewer® foi utilizado para visualização e avaliação bidimensional (2D) das imagens microtomográficas nos eixos sagital, coronal e transaxial (SkyScan®, Versão 1.4.4 64-bit). O posicionamento e área de falha óssea padrão de todas as amostras
- 4) Seleção do VOI ("volume of interest") nas amostras, contendo a área circular do defeito ósseo. Foram selecionadas 225 secções circulares bidimensionais (ROI="region of interest") compreendendo a área do defeito e em seguida realizada a interpolação dessas secções, dando origem ao VOI. O software CTAnalyser® analisou e mediu a área de falha óssea de acordo com escalas de cinza (threshold). O threshold utilizado na análise foi de 70-255 tons de cinza, possibilitando a

obtenção do volume de osso formado no tecido de reparação (Ramalho-Ferreira et al., 2015).

A partir das imagens geradas, o software CT-Analyser® disponibilizou em arquivo de texto os resultados do padrão de preenchimento trabecular ósseo (número, espessura e separação das trabéculas) nas falhas tibiais, a produção de tecido ósseo (volume ósseo, superfície óssea e porcentagem de volume ósseo formado), com e sem a aplicação do xenoenxerto, possibilitando determinar a relação entre a aplicação da matriz óssea desmineralizada caprina e a proliferação óssea em coelhos da raça Nova Zelândia.

2.8. Análise Estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa R²¹. Para a seleção do teste estatístico mais adequado, foram realizados os testes de homocedasticidade (teste de Levene) e normalidade (teste de Cramer-von Mises). A análise estatística foi realizada por meio da aplicação de testes paramétricos. Para a comparação entre os resultados obtidos no grupo controle (GC), no grupo matriz (GM) e nos diferentes tempos de eutanásia (15, 30, 60 e 90 dias) foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA. As médias entre grupo controle e matriz em cada tempo de eutanásia foram então comparadas através do teste T student, considerando um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

O período experimental em que houve utilização animal, transcorreu sem maiores intercorrências. Em avaliação clínico-cirúrgica, todos os animais apresentaram deambulação e suporte de peso normal em ambos os membros operados, imediatamente após o retorno anestésico. As feridas cirúrgicas de ambas as tíbias apresentaram selamento da pele aos 10 dias de pós-operatório, sem sinais

²¹ Software R – versão 3.5.1, GNU Project

de inflamação, automutilação, seroma ou demais secreções que indicassem infecção do sítio cirúrgico e/ou rejeição ao enxerto. Os pontos de pele foram removidos e as avaliações subsequentes, até o período de eutanásia de cada grupo, permaneceram sem alterações dignas de nota.

3.1. Análise Microtomográfica

As imagens tridimensionais obtidas após o escaneamento das amostras de tíbia proximal foram analisadas por meio do software Data Viewer®, disponibilizado pela empresa fabricante do microtomógrafo utilizado.

Devido à possibilidade de visualização das amostras virtuais nos planos sagital, coronal e transaxial, foi possível acompanhar o processo de reparação do defeito ósseo induzido, com riqueza de detalhes (Figuras 2 – 5).

Analisando as imagens microtomográficas das amostras do grupo controle aos quinze dias de pós-operatório (Figura 2) é possível notar fragmentos ósseos radiopacos, oriundos da perfuração cirúrgica, presentes no centro da falha óssea. Já nas imagens do grupo que recebeu o biomaterial, no mesmo tempo experimental, o centro da falha óssea permanece radioluscente, devido a presença da matriz desmineralizada recém implantada. Nesse período ainda não era possível observar proliferação óssea significativa em nenhum dos grupos.

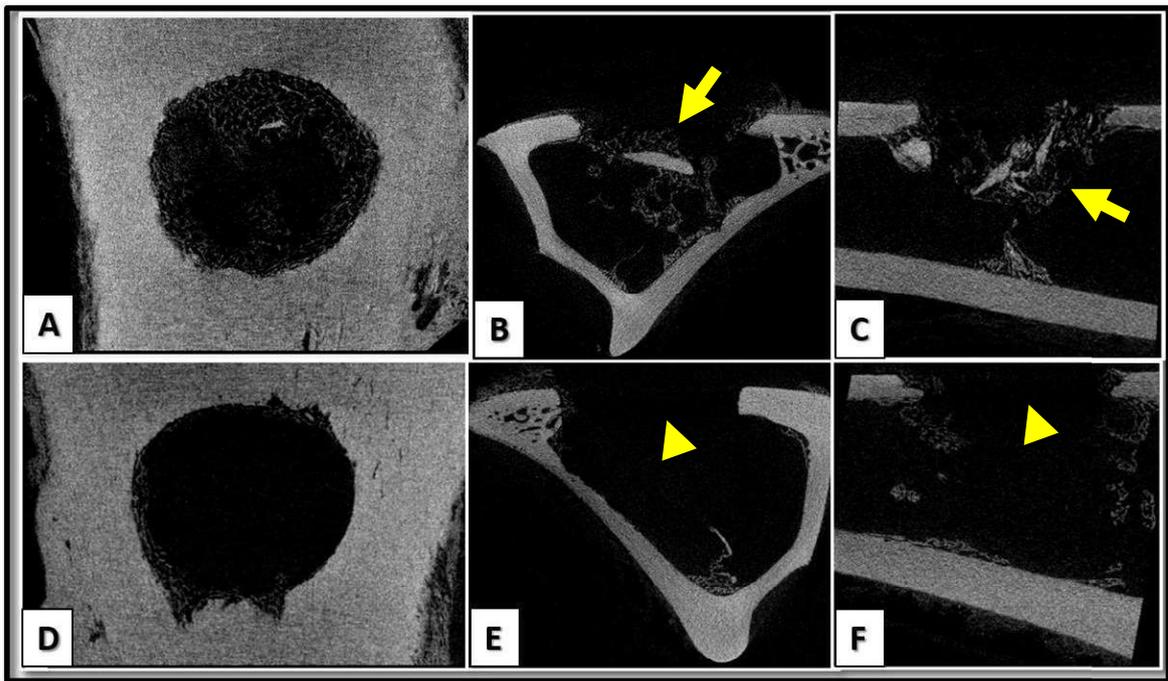


Figura 1 – Imagens microtomográficas obtidas aos 15 dias pós-operatórios, por meio do software Data Viewer®, em três eixos (sagital, coronal e transaxial - respectivamente) de amostra óssea proximal de tibia de coelho, adulto da raça Nova Zelândia do grupo controle (A, B e C), notar fragmentos ósseos radiopacos, oriundos da perfuração cirúrgica, presentes no centro da falha óssea (setas) e do grupo matriz, (D, E e F) com centro da falha óssea radioluscente, devido a presença da MODc (cabeças de seta). Jaboticabal – SP, 2019.

As imagens microtomográficas das amostras tibiais no tempo experimental de trinta dias (Figura 3), demonstraram radiolucência no centro do defeito de ambos os grupos, quando observado o eixo sagital da amostra. Já nos eixos coronal e transaxial, foi visibilizado início do reparo ósseo, seguindo das margens para o centro da falha óssea. É notável a atividade óssea em ambos os grupos, porém com maior intensidade proliferativa nas amostras do grupo controle. A radiopacidade do tecido ósseo neoformado é menos intensa, quando comparado à cortical original adjacente, que compreende as bordas do defeito analisado.

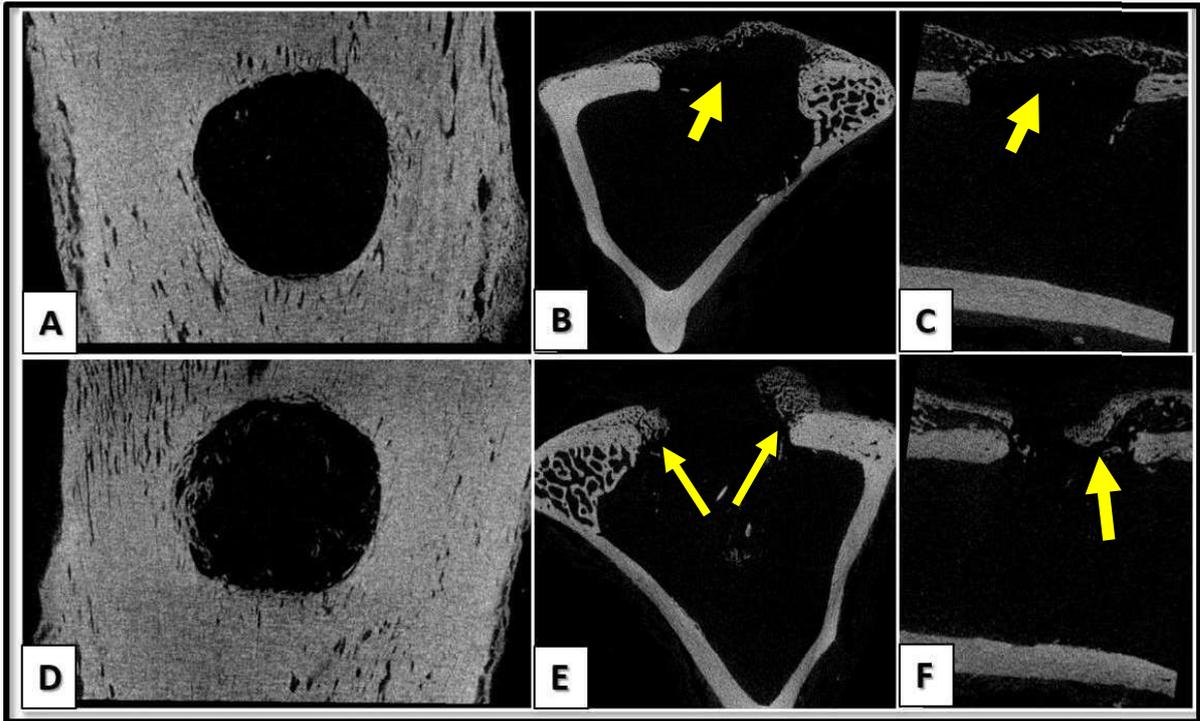


Figura 2 - Imagens microtomográficas obtidas aos 15 dias pós-operatórios, por meio do software Data Viewer®, em três eixos (sagital, coronal e transaxial - respectivamente) de amostra óssea proximal de tíbia de coelho, adulto da raça Nova Zelândia do grupo controle (A, B e C) e do grupo matriz, (D, E e F). É observado início do reparo ósseo, orientado das margens para o centro da falha óssea em ambos os grupos (setas). Jaboticabal – SP, 2019.

Aos sessenta dias pós-operatórios (Figura 4) foi observado preenchimento ósseo parcial às três projeções, com maior proliferação óssea, nas amostras do grupo controle, quando comparado ao grupo com presença de MODc. O reparo tecidual em ponte observado, possuía aspecto mais radiopaco, em comparação ao observado no tempo experimental de trinta dias, aproximando-se da densidade óssea original.

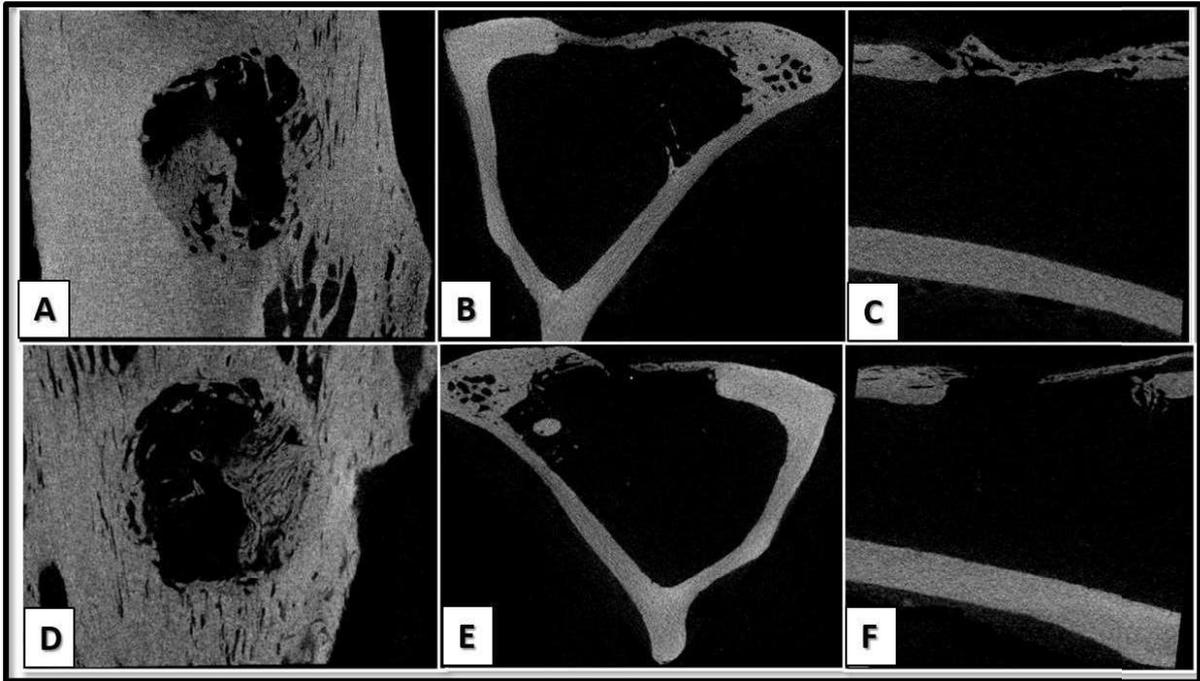


Figura 3 - Imagens microtomográficas obtidas aos 60 dias pós-operatórios, por meio do software Data Viewer®, em três eixos (sagital, coronal e transaxial - respectivamente) de amostra óssea proximal de tibia de coelho, adulto da raça Nova Zelândia do grupo controle (A, B e C) e do grupo matriz, (D, E e F). Visibilizado preenchimento ósseo parcial às três projeções, com maior proliferação óssea, nas amostras do grupo controle, quando comparado ao grupo com presença de MODc. Jaboticabal – SP, 2019.

A análise das imagens microtomográficas obtidas no tempo experimental de noventa dias (Figura 5), demonstrou fechamento quase completo das falhas ósseas em ambos os grupos, nos três eixos analisados. Foi possível visibilizar a formação de ponte óssea de maior espessura e radiopacidade, quando comparado aos tempos experimentais anteriores.

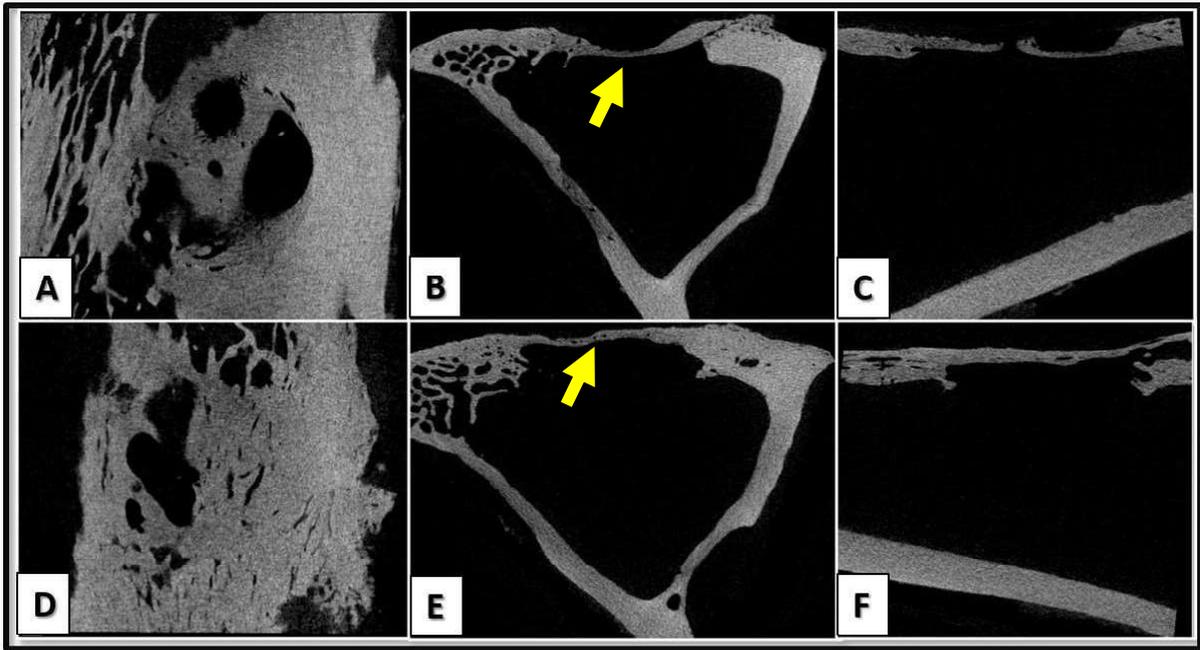


Figura 4 - Imagens microtomográficas obtidas aos 90 dias pós-operatórios, por meio do software Data Viewer®, em três eixos (sagital, coronal e transaxial - respectivamente) de amostra óssea proximal de tibia de coelho, adulto da raça Nova Zelândia do grupo controle (A, B e C) e do grupo matriz, (D, E e F). Notar preenchimento subtotal da falha óssea em ambos os grupos, e tecido de reparo em ponte com densidade similar à cortical original, porém de menor espessura (setas) Jaboticabal – SP, 2019.

3.2. Medidas Volumétricas

Para melhor compreensão dos resultados, os valores numéricos das variáveis analisadas (Volume Ósseo, Relação entre Volume Ósseo e Volume Total, Superfície Óssea, Relação entre Superfície Óssea e Volume Total, Número de Trabéculas, Espessura Trabecular e Separação Trabecular) foram distribuídos na Tabela 1 e para melhor visualização, foram utilizados gráficos para cada parâmetro tridimensional avaliado.

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão dos parâmetros volumétricos (Volume Ósseo, Relação entre Volume Ósseo e Volume Total, Superfície Óssea, Relação entre Superfície Óssea e Volume Total, Número de Trabéculas, Espessura Trabecular e Separação Trabecular) de amostras de tíbia proximal de coelhos da raça Nova Zelândia, adultos nos tempos de eutanásia de 15, 30, 60 e 90 dias.

Grupos	Volume ósseo (VO, mm ³)	VO/VT (%)	Superfície óssea (SO, mm ²)	SO/VT (mm)	Número de trabéculas (Tb.N, mm)	Espessura trabecular (Tb.Th, mm)	Separação trabecular (Tb.Sp, mm)
GC15	2,65 ± 1,56 a	5,39 ± 3,18 a	193,28 ± 55,79 a	3,92 ± 1,14 a	0,73 ± 0,23 a	0,06 ± 0,03	0,54 ± 0,11
GM15	0,56 ± 0,46 b	1,14 ± 0,94 b	37,05 ± 18,19 b	0,74 ± 0,37 b	0,11 ± 0,07 b	0,07 ± 0,06	0,66 ± 0,19
GC30	5,6 ± 2,54 a	11,39 ± 5,15 a	242,64 ± 92,83	5,02 ± 1,88	1,39 ± 0,52	0,07 ± 0,02	0,6 ± 0,24
GM30	3,37 ± 2,56 b	6,87 ± 5,21 b	169,28 ± 89,96	3,43 ± 1,83	0,87 ± 0,57	0,06 ± 0,05	0,56 ± 0,25
GC60	6,27 ± 2,17	12,76 ± 4,42	196,02 ± 81,05	3,97 ± 1,64	1,29 ± 0,52	0,09 ± 0,03	0,95 ± 0,35
GM60	5,1 ± 2,01	10,38 ± 4,10	158,29 ± 63,03	3,21 ± 1,28	0,99 ± 0,45	0,08 ± 0,05	0,89 ± 0,15
GC90	10,45 ± 2,30 a	21,25 ± 4,67 a	188,82 ± 28,18 a	3,83 ± 0,57 a	1,49 ± 0,32 a	0,13 ± 0,03	0,89 ± 0,12
GM90	7,08 ± 2,25 b	14,39 ± 4,57 b	130,76 ± 48,06 b	2,65 ± 0,98 b	0,94 ± 0,44 b	0,15 ± 0,03	0,97 ± 0,22

Letras diferentes entre animais do grupo controle e grupo matriz nos mesmos tempos de eutanásia (ex: GC15 – GM15) indicam significância estatística entre as médias pelo teste T Student (P<0,05). Jaboticabal, SP – 2019.

VO: Volume ósseo

VT: Volume total

VO/VT: Relação entre volume ósseo e volume total

SO/VT: Relação entre superfície óssea e volume total

Tb.N: Número de trabéculas

Tb.Th: Espessura trabecular

Tb.Sp: Separação trabecular

Em relação ao Volume Ósseo, em mm³, o grupo controle de 15, 30, 60 e 90 dias apresentou médias e desvios-padrão de 2,65 ± 1,56; 5,6 ± 2,54; 6,27 ± 2,17; 10,45 ± 2,30, respectivamente. No grupo matriz de 15, 30, 60 e 90 dias os valores foram 0,56 ± 0,46; 3,37 ± 2,56; 5,1 ± 2,01; 7,08 ± 2,25, respectivamente, demonstrando diferença estatisticamente significativa entre as médias, nos dias 15, 30 e 90 (Figura 6).

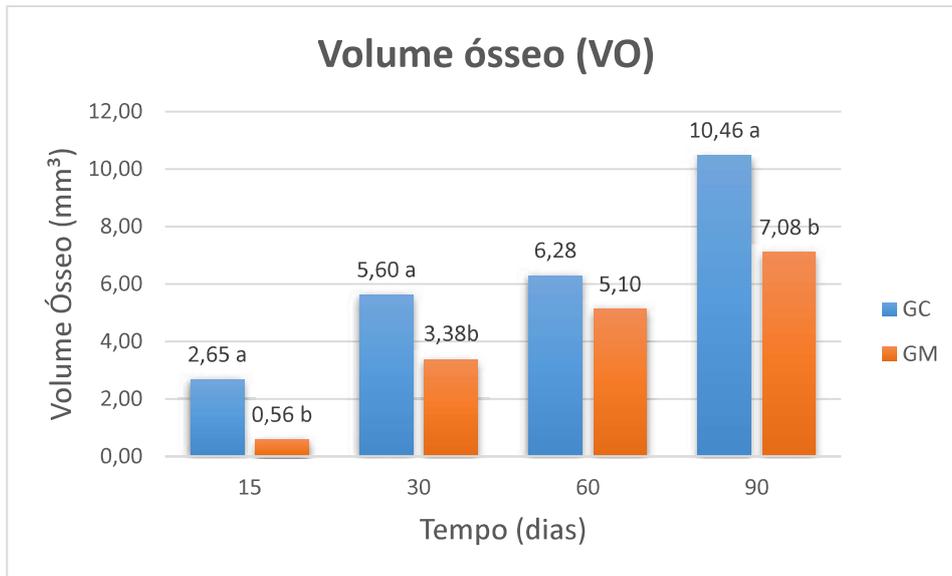


Figura 6 - Representação gráfica dos Valores das médias de Volume Ósseo (mm³) das amostras de tíbia proximal dos grupos controle (GC) e matriz (GM) nos respectivos tempos de eutanásia (15, 30, 60 e 90 dias). Letras diferentes entre animais do grupo controle e grupo matriz nos mesmos tempos de eutanásia (ex: GC15 – GM15) indicam significância estatística entre as médias pelo teste T Student (P<0,05). Jaboticabal, SP – 2019.

Referente aos valores da relação entre Volume Ósseo e Volume Total, expresso em percentual, os valores das médias e desvios-padrão do grupo controle de 15, 30, 60 e 90 dias foram $5,39 \pm 3,18$; $11,39 \pm 5,15$; $12,76 \pm 4,42$; $21,25 \pm 4,67$, respectivamente. Já as médias e desvios-padrão dos grupos matriz de 15, 30, 60 e 90 dias foram $1,14 \pm 0,94$; $6,87 \pm 5,21$; $10,38 \pm 4,10$; $14,39 \pm 4,57$, respectivamente, caracterizando diferenças estatisticamente relevantes nos tempos de 15, 30 e 90 dias pós-operatórios (Figura 7).

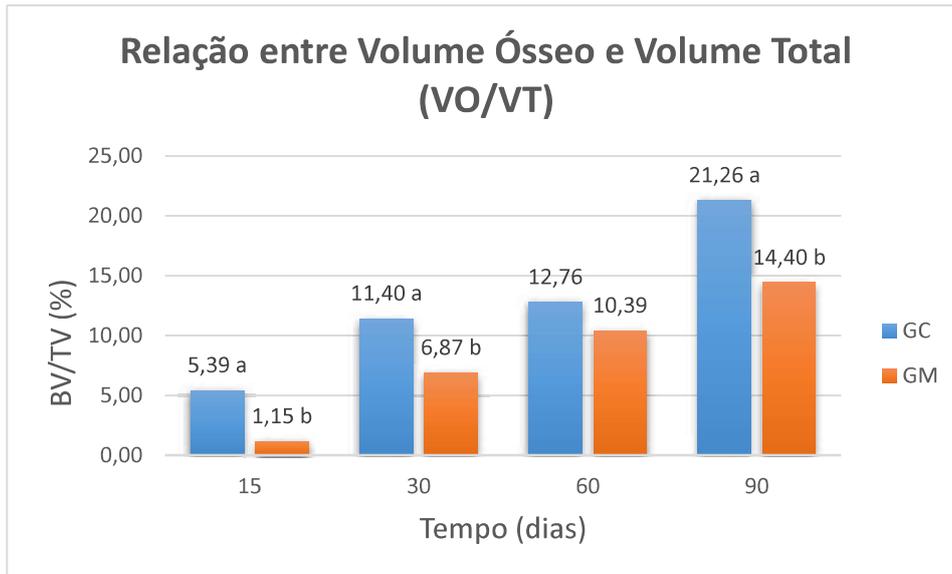


Figura 7 - Representação gráfica dos Valores da relação entre Volume Ósseo e Volume Total (%) dos grupos controle (GC) e matriz (GM) nos respectivos períodos de eutanásia (15, 30, 60 e 90 dias). Letras diferentes entre animais do grupo controle e grupo matriz nos mesmos tempos de eutanásia (ex: GC15 – GM15) indicam significância estatística entre as médias pelo teste T Student ($P < 0,05$). Jaboticabal, SP – 2019.

Houve diferença estatística entre os grupos controle e matriz, para a variável Superfície Óssea (mm^2), nos tempos de 15 e 90 dias pós-operatórios, obtida através da correlação entre as médias pelo teste T student ($P < 0,05$). Os valores das médias e desvios-padrão dos grupos controle (GC15, GC30, GC60 e GC90) foram $193,28 \pm 55,79$; $242,64 \pm 92,83$; $196,02 \pm 81,05$; $188,82 \pm 28,18$ respectivamente. Para os grupos matriz (GM15, GM30, GM60 e GM90), as médias e desvios-padrão foram $37,05 \pm 18,19$; $169,28 \pm 89,96$; $158,29 \pm 63,03$; $130,76 \pm 48,06$, respectivamente (Figura 8).

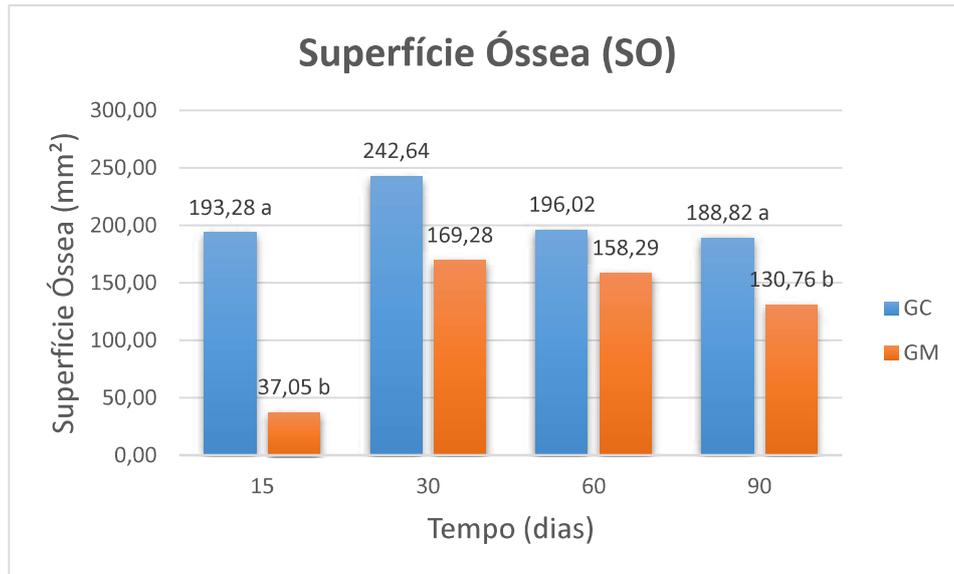


Figura 8 - Representação gráfica dos Valores de Superfície Óssea (mm²) dos grupos controle (GC) e matriz (GM) nos respectivos períodos de eutanásia (15, 30, 60 e 90 dias). Letras diferentes entre animais do grupo controle e grupo matriz nos mesmos tempos de eutanásia (ex: GC15 – GM15) indicam significância estatística entre as médias pelo teste T Student (P<0,05). Jaboticabal, SP – 2019.

A relação entre a Superfície Óssea e Volume Total (mm), apresentou diferença estatisticamente significativa nos tempos de eutanásia de 15 e 90 dias, com as médias e desvios-padrão dos grupos controle (GC15, GC30, GC60 e GC90) em $3,92 \pm 1,14$; $5,02 \pm 1,88$; $3,97 \pm 1,6$; $3,83 \pm 0,57$, respectivamente. Os valores obtidos dos grupos matriz (GM15, GM30, GM60 e GM90) foram $0,74 \pm 0,37$; $3,43 \pm 1,83$; $3,21 \pm 1,28$; $2,65 \pm 0,98$, respectivamente (Figura 9).

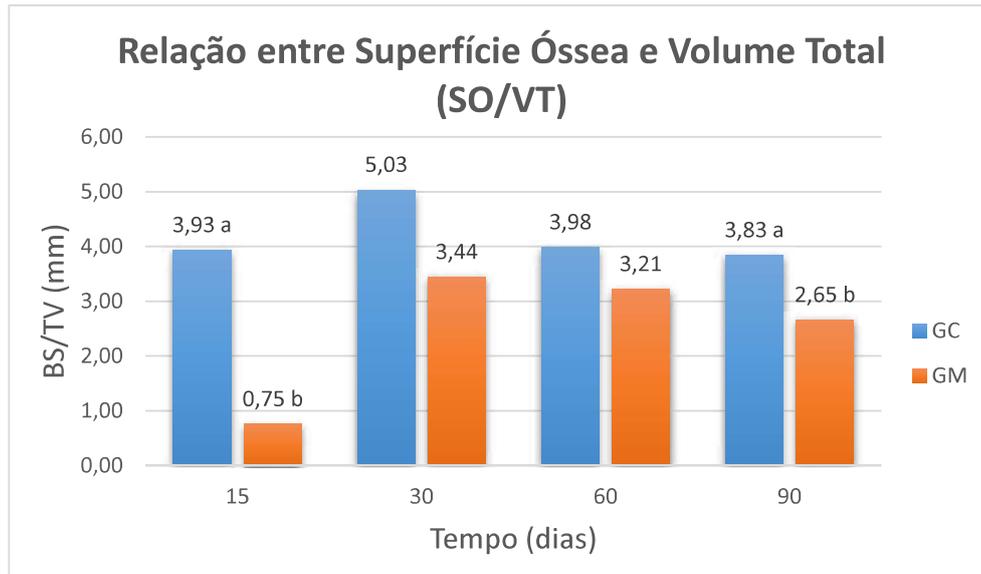


Figura 9 - Representação gráfica dos Valores da relação entre Superfície Óssea e Volume Total (mm) dos grupos controle (GC) e matriz (GM) nos respectivos períodos de eutanásia (15, 30, 60 e 90 dias). Letras diferentes entre animais do grupo controle e grupo matriz nos mesmos tempos de eutanásia (ex: GC15 – GM15) indicam significância estatística entre as médias pelo teste T Student ($P < 0,05$). Jaboticabal, SP – 2019.

Em relação ao parâmetro Número de Trabéculas (mm), os valores das médias e desvios-padrão observados nos grupos controle (GC15, GC30, GC60 e GC90) foram $0,73 \pm 0,23$; $1,39 \pm 0,52$; $1,29 \pm 0,52$; $1,49 \pm 0,32$, respectivamente. Já os valores das médias e desvios-padrão dos grupos matriz (GM15, GM30, GM60 e GM90) foram $0,11 \pm 0,07$; $0,87 \pm 0,57$; $0,99 \pm 0,45$; $0,94 \pm 0,44$, respectivamente. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e matriz, nos tempos de 15 e 90 dias (Figura 10).

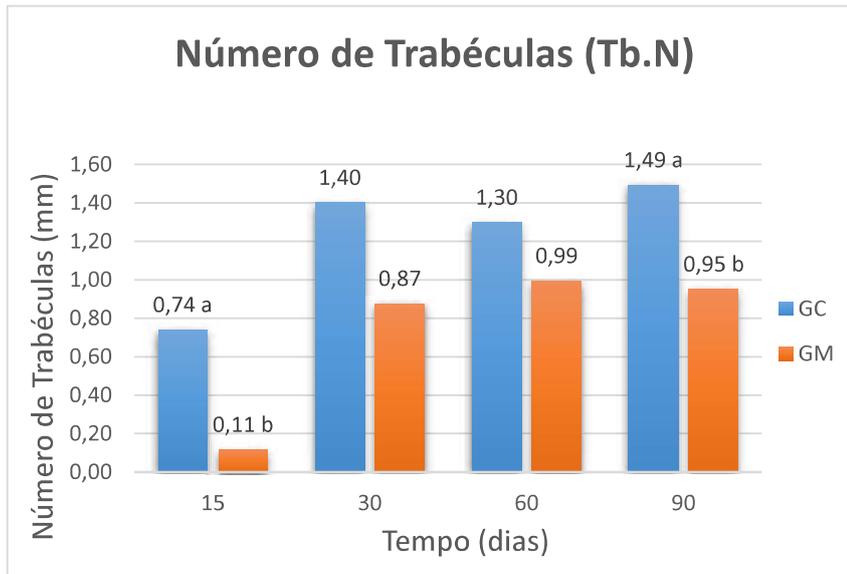


Figura 10 - Representação gráfica dos Valores do Número de Trabéculas (mm) dos grupos controle (GC) e matriz (GM) nos respectivos períodos de eutanásia (15, 30, 60 e 90 dias). Letras diferentes entre animais do grupo controle e grupo matriz nos mesmos tempos de eutanásia (ex: GC15 – GM15) indicam significância estatística entre as médias pelo teste T Student ($P < 0,05$). Jaboticabal, SP – 2019.

As variáveis tridimensionais de Espessura Trabecular (mm) e Separação Trabecular (mm), não apresentaram diferenças estatísticas (Tabela 1) para os valores das médias entre os grupos controle e matriz nos referidos tempos de eutanásia (15, 30, 60 e 90 dias).

4. DISCUSSÃO

Diversos animais, principalmente roedores e pequenos mamíferos são utilizados como modelos experimentais em estudos de reparo ósseo e desenvolvimento de biomateriais. Neste trabalho o coelho foi escolhido como modelo experimental, tendo em vista seu fácil manejo, temperamento calmo e por seu maior tamanho, quando comparado com outros roedores utilizados em pesquisas, como ratos, camundongos, hamsters e cobaias, permitindo fácil acesso cirúrgico e confecção de defeitos maiores. Além desses fatores, algumas semelhanças já foram relatadas quanto à composição óssea, remodelação e densidade entre modelos animais e seres humanos (Pearce et al., 2007). Por exemplo, a densidade óssea e resistência a fraturas são muito semelhantes em coelhos e humanos (Wang et al.,

1998). A elaboração de duas falhas ósseas por animal, possibilitou a comparação direta entre as unidades experimentais, com redução da variabilidade individual e a consequente necessidade de um menor número de animais, assim como descrito em diversos estudos (Guerra, 2003; Matos, 2008; Martins, 2009 e Palma, 2009)

A matriz óssea desmineralizada (MOD) é um biomaterial que se encontra em pleno desenvolvimento e pesquisa, por suas propriedades de osteocondução e osteoindução decorrentes de estrutura tridimensional colagenosa e da liberação de proteínas morfogenéticas ósseas e fatores de crescimento, outrora retidos na matriz óssea mineral (Giannoudis et al., 2005; Hoffer et al., 2008; Introini, 2011).

O processo de desmineralização óssea com ácido clorídrico (HCl) utilizado em nosso estudo é embasado pelos resultados de Nade e Burwel (1977), que testaram diversos ácidos, porém, a maioria deles afetava as propriedades químicas e bioquímicas da matriz, além de promoverem a formação de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho; diversamente, nos desmineralizados em HCl, não houve formação dessas células.

Schwartz et al. (1998) constataram que a matriz óssea desmineralizada obtida de doadores mais jovens apresentam capacidade osteoindutiva superior, quando comparado àquelas oriundas de pacientes mais velhos, não sendo observada diferença em relação ao sexo do doador. Devido à origem do tecido ósseo utilizado para produção da MOD desta pesquisa ser proveniente de abates periódicos de caprinos para o consumo humano, não foi possível estabelecer a idade e sexo dos animais doadores, porém, de acordo com Madruga et al. (1999), no Brasil o abate desses animais ocorre principalmente entre 8 e 12 semanas de vida. Estudos com ratos, apresentam resultados conflitantes, onde Syftestad e Urist (1982) encontraram maior osteoindução utilizando ossos de doadores jovens em relação a ossos de animais mais velhos, já Jergensen et al. (1991) obtiveram resultados opostos, em que a matriz óssea obtida de animais mais maduros apresentou maior atividade osteoindutiva quando comparada à proveniente de ratos pré-pubescentes ou jovens, permanecendo essa variável ainda não completamente elucidada.

Frequentemente a matriz óssea desmineralizada humana é combinada com outros componentes, no intuito de facilitar sua manipulação e aplicação no sítio receptor, transformando-a em pasta ou massa. Esses carreadores devem ser

biocompatíveis (osteocompatível), não reduzir a osteocondutividade da MOD e manter o enxerto estável durante seu posicionamento (Gruskin et al., 2012). No presente estudo, foi utilizado o biomaterial particulado puro, no intuito de evitar interferências externas de qualquer substância que originasse respostas do tipo corpo estranho, resultando em inibição/desativação ou rejeição do biomaterial (Han et al., 2005). A ausência de carreador foi fator inconveniente durante os procedimentos cirúrgicos, tornando a manipulação do biomaterial mais difícil e conseqüentemente aumentando o tempo cirúrgico necessário à implantação, assim como a possibilidade de perda de parte do material para o canal medular, corroborando informações obtidas por Gruskin et al. (2012).

Outras propriedades desejáveis dos enxertos de matriz óssea desmineralizada é um sistema de aplicação minimamente invasiva e sem problemas especiais de manejo como refrigeração ou aquecimento (Lee et al., 2011). A matriz óssea desmineralizada utilizada no estudo em questão, foi conservada pura e seca, em envelopes esterilizados por óxido de etileno à temperatura ambiente, de acordo com as recomendações de Han et al. (2005) onde afirmam que quando conservada seca, a MOD pode preservar sua atividade osteoindutora até a temperatura de 65°C, mas na presença de umidade, a atividade diminui com o tempo de incubação, perdendo cerca de 90% de sua atividade quando mantida por 5 semanas a 65°C ou em temperaturas mais elevadas.

A grande maioria das preparações comerciais a base de MOD fornece osteoindução e osteocondução, porém, não apresentam propriedades mecânicas substanciais referente a estabilização, sendo preferencialmente utilizadas em sítios receptores estáveis e livre de contaminação (Iwata et al., 2002), assim como o realizado nesse estudo, em que, devido à falha óssea circular monocortical escolhida, não foi necessário a utilização de implantes exógenos para estabilizar o sítio receptor (An e Friedman, 1999).

A MOD fragmentada utilizada no presente experimento, por ser particulada, não oferecia estabilidade mecânica ao sítio de implantação. Porém, como o intuito do trabalho foi observar inicialmente o comportamento do biomaterial *in-situ*, o defeito circular de 6 mm, realizado em concordância ao estudo de Freitas et al. (2006),

mostrou-se adequado, pois devido sua estabilidade, não conferia movimentação na interface osso-MOD, não havendo interferência no processo de produção óssea.

A escolha de uma substância para ser usada como biomaterial depende da análise de requisitos, como a biocompatibilidade (efeito do ambiente orgânico no material e efeito do material no organismo), a biodegradabilidade (fenômeno em que o material é degradado ou solubilizado em fluidos orgânicos, sumindo do sítio de implantação), assim como a velocidade de degradação do material (Tabata, 2009). A matriz óssea desmineralizada caprina, apesar de sua origem xenógena, apresentou biotolerância em coelhos, não demonstrando causar rejeição ou resposta inflamatória exacerbada no local de implantação durante os noventa dias experimentais.

Segundo Albrektsson e Johansson (2001) a utilização de enxertos ósseos alógenos e xenógenos apresentam maiores chances de rejeição do material implantado devido a resposta imunológica do organismo receptor, assim como a possibilidade de disseminação de doenças infecciosas. Esta constatação não foi observada em nossa pesquisa, onde de acordo com as avaliações clínico-cirúrgicas realizadas do período pós-operatório imediato até o tempo de eutanásia, todos os animais do estudo permaneceram clinicamente hígidos e sem sinais de alterações sistêmicas ou no sítio de implantação da MOD, assim como descrito por Moraes et al. (2005), quando utilizaram enxerto xenógeno na reparação de fraturas. Atribuímos a inocuidade da MOD caprina ao processamento ácido ao qual foi submetida, eliminando potenciais agentes infecciosos, além de reduzir seu potencial antigênico, considerado mais elevado em ossos mineralizados (Gruskin et al., 2012). Não ficou evidenciada também, diferença macroscópica entre os membros direito (controle) e esquerdo (MOD), demonstrando técnica asséptica, método de esterilização/conservação do enxerto, manejo da ferida e terapia antimicrobiana adequados (Iamaguti et al., 1995).

A microscopia eletrônica (ME) permite a visualização de arcações porosos, possibilitando, inclusive, observar as interconexões entre os poros (Osathanon et al., 2008; Yu et al., 2008); visualizar a interface entre materiais bioativos e o osso (NI et al., 2006); observar a proliferação endotelial (Yu et al., 2009); visualizar a morfologia de superfície, antes e após a implantação no sítio receptor (Yu et al., 2008; Malafaya e Reis, 2009); assim como a observação de pequenos defeitos estruturais, como a

presença de microfissuras (Cardoso et al., 2006). Apesar da sua grande aplicação clínica, esse método de análise possui algumas limitações, uma vez que fornece informações apenas em duas dimensões. A microtomografia computadorizada, método utilizado na pesquisa em questão, soluciona essa limitação da ME, além de permitir a quantificação das propriedades estruturais dos tecidos duros (Klein et al., 2009). Outra limitação da ME está relacionada ao fato de ser um método invasivo, envolvendo a destruição da estrutura tridimensional original da amostra, para confecção de lâminas de microscopia, enquanto μ -CT é um método não-invasivo de análise estrutural em três dimensões (Cooper et al., 2004). Em contrapartida, a ME permite a visualização dos componentes celulares envolvidos no processo de regeneração do tecido ósseo, característica que a μ -CT não possui. Dessa forma, podemos considerar que ambos os exames de imagem fornecem informações complementares ao pesquisador, e quando possível, devem ser associados para resultados mais fidedignos.

As imagens microtomográficas demonstraram detalhadamente a progressão do reparo ósseo, ao longo do tempo, em ambos os grupos, assim como citado por Morgan (2009). A taxa de formação de reparo tecidual foi crescente nos tempos experimentais (15, 30, 60 e 90 dias). Apesar da semelhança estrutural visualizada nas reconstruções tridimensionais e na macroscopia, entre os grupos, houve produção óssea acentuada no grupo controle, de acordo com os dados volumétricos obtidos pelo software CTAnalyser (Tabela 1). No tempo experimental de quinze dias, houve maior discrepância dos valores de produção de tecido de reparo entre os grupos (GC e GM). Acreditamos que essa diferença seja devido à permanência de tecido cortico-esponjoso autógeno no local da falha óssea, logo após a perfuração das tíbias do grupo controle, sendo estes fragmentos contabilizados como tecido de reparo pelo software utilizado, o que não ocorreu nas tíbias com implante de MOD, devido ao acomodamento do biomaterial radioluscente no espaço do defeito ósseo.

Aos sessenta dias de pós-operatório, foi observado crescimento ósseo em ponte entre as margens da falha óssea, em ambos os grupos, corroborando os resultados de Zhukauskas et al. (2010), que realizaram experimento em modelo similar, encontrando formação óssea em ponte, seis semanas após a aplicação de

MOD humana em tibia de coelhos. Segundo os mesmos autores, após 12 semanas de implantação, a MOD havia sido completamente reabsorvida e repostada por osso neoformado, semelhante aos resultados do nosso trabalho, em que aos 90 dias, a falha óssea demonstrou preenchimento parcial por novo tecido ósseo, em ambos os grupos. Stubbs et al. (2004), avaliando aplicação de hidroxiapatita em defeitos tibiais de coelhos, também obtiveram tempos de reparo ósseo similares ao presente trabalho, em que após 6 semanas de implantação dos biomateriais, o reparo cortical ainda não era visível radiograficamente. Após 12 semanas foi notado início de formação óssea cortical, com crescimento ósseo orientado das extremidades para o centro do defeito, completando o reparo após 24 semanas. Contudo, segundo Walsh et al. (2003) esse modelo experimental apresenta limitações, pois mesmo os defeitos ósseos que não receberam biomaterial, apresentaram reparo completo em 24 semanas, assim como o observado em nossos resultados.

É provável que a maior produção óssea observada no grupo controle seja decorrente das propriedades osteogênica, osteocondutora e osteoindutora, presentes no osso esponjoso autógeno, considerado como padrão ouro na enxertia óssea (Albrektsson; Johansson, 2001; Precheur, 2007), mantido no defeito ósseo após a perfuração. Fatores relacionados ao biomaterial também podem explicar a menor taxa de produção óssea observada nas tíbias que receberam a MOD caprina, como a ausência de carreador adequado, a granulometria e o potencial osteoindutor, não estabelecidos, dos animais doadores da MOD utilizada (Gruskin et al., 2012).

Devido à natureza não destrutiva das análises realizadas, após o escaneamento microtomográfico, as amostras foram acondicionadas em recipientes com álcool 70, possibilitando futuros estudos complementares a este, incluindo avaliação histológica e imunohistoquímica, agregando informações qualitativas do processo biológico envolvido com inflamação e alterações teciduais (Lindhe et al., 2003; Molinaro et al., 2010).

5. Conclusão

Os presentes resultados indicaram que a matriz óssea desmineralizada caprina demonstrou ser biotolerável e segura, comprovando por meio de microtomografia computadorizada, o início da reparação óssea em 30 dias após implantação, bem

como a formação de ponte óssea aos 60 dias. A MOD de caprinos foi eficaz no reparo de falhas ósseas em coelhos, quando seguido o descrito protocolo. Contudo, são necessários estudos futuros, para o estabelecimento do início da remodelação óssea, assim como de características como a granulometria, carreador ideal e possíveis associações da MOD caprina com outros materiais.

6. Referências

Albrektsson T, Johansson C (2001) Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal** 10:96-101.

Alcaides FG (2012) A utilização de xenoenxertos na implantologia. Dissertação de Mestrado. Mestrado Integrado de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC).

Alievi MM, Schossler JEW, Guimaraes LD, Oliveira ANC, Traeslel CK, Ferreira PA (2007) Implante ósseo cortical alógeno conservado em mel na reconstrução de falha óssea diafisária em fêmur de cães: avaliação clínica e radiográfica. **Ciência Rural** 37(2):450-457.

An YH, Friedman RJ (1999) Animal models in orthopedic research. **CRC Press Inc**, Boca Raton Florida.

Baldini N, De Sanctis M, Ferrari M (2011) Deproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery. **Dental Materials** 27(1):61-70.

Bigham AS, Dehghani SN, Shafiei, Z, Torabi, SN (2009) Experimental bone defect healing with xenogenic demineralized bone matrix and bovine fetal growth plate as a new xenograft: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. **Cell and Tissue Banking** 10(1):33.

Cardoso AK, Barbosa AJr, Miguel FB, Marcantonio EJr, Farina M, Soares GD, Rosa FP (2006) Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. **Cells Tissues Organs** 184(3-4):128-137.

Cooper DM, Matyas JR, Katzenberg MA, Hallgrimsson B (2004) Comparison of micro-computed tomographic and microradiographic measurements of cortical bone porosity. **Calcified Tissue International** 74(5):437-447.

Dias MIR, De Sousa CMP, De Carvalho PMP, Lempek MR, Viegas, CAA, De Azevedo JMT (2013) Enxertos e substitutos ósseos em cirurgia ortopédica reconstrutiva nos animais de companhia - Uma breve revisão. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 35(4):339-350.

Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW (1984) Practical cone-beam algorithm. **Journal of Acoustical Society** 1(6):612-619.

Freitas SH, Neto JE, Godoy RF, Santos MD, Rondon AS, Camargo RA (2006) Aspectos radiográficos de implante ósseo heterólogo aplicado na metáfise proximal de tibia de coelho. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, p.28.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005) Bone substitutes: an update. **Injury** 36(3):20-27.

Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO (2012) Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. **Advanced Drug Delivery Reviews** 64:1063-1077.

Guerra FADRA (2003) Biomimética: formulações haptotáticas para aplicação em regeneração óssea [Tese de Doutorado]. Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Guizzardi S, Silvestre MD, Scandroglio R, Ruggeri A, Savini R (1992) Implants of heterologous demineralized bone matrix for induction of posterior spinal fusion in rats. **Spine** 17(6) 701-707.

Han B, Yang Z, Nimni M (2005) Effects of moisture and temperature on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. **Journal of Orthopaedic Research** 23:855-861.

Hoffer MJ, Griffon DJ, Schaeffer DJ, JOHNSON AL, Thomas, MW (2008) Clinical Applications of Demineralized Bone Matrix: A Retrospective and Case-Matched Study of Seventy-Five Dogs. **Veterinary Surgery** 37:639–647.

Iamaguti P, Ineo AP, Del Carlo RJ, Muniz LM, Mamprim MJ, Dal Pai V (1995) Uso de auto-enxerto ósseo esponjoso na reparação do rádio. Estudo experimental em coelhos. **Veterinária e Zootecnia** 7:49-61.

Introini SO (2011) **Avaliação do reparo tecidual em defeito ósseo por microtomografia tridimensional por raio-x**. Dissertação - Universidade de São Paulo.

Iwata H, Sakano S, Itoh T, Bawer TW (2002) Demineralized bone matrix and native bone morphogenetic protein in orthopaedic surgery. **Clinical Orthopaedics and Related Research** 395:99-100.

Jergensen HE, Chua J, Kao RT, Kaban LB (1991) Age effects on bone induction by demineralized bone powder. **Clinical Orthopaedics and Related Research** 268:253–259.

Klein M, Goetz H, Pazen S, Al-Nawas B, Wagner W, Duschner H (2009) Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed tomography. **Clinical Oral Implants Research** 20:67-74.

Lee JH, Lee K, Baek HR, Jang SJ (2011) Combined effects of porous hydroxyapatite and demineralized bone matrix on bone induction: in vitro and in vivo study using a nude rat model. **Biomedical materials** 6(1):1-7.

Lindhe J, Karring T, Lang NP (2003) **Clinical periodontology and implant dentistry**. Fourth edition by Blackwell Munksgaard. Blackwell Publishing Company.

Madruga MS, Arruda SGB, Nascimento JA (1999) Castration and slaughter age effects on nutritive value of the “mestiço” goat meat. **Meat Science** 52:119-125.

Malafaya PB, Reis RL (2009) Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: Influence of hydroxyapatite on in vitro cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor. **Acta Biomaterialia** 5(2):644-660.

Martins O (2009) Estudo, in vivo, de uma hidroxiapatite de arquitetura otimizada [Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental]. Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Matos SMA (2008) Aplicação de matrizes enriquecidas com moduladores biológicos na regeneração de tecidos periodontais e tecidos ósseos [Tese de Doutorado]. Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Melo EG, Rezende CMF, Borges APB, Nobrega Neto PI (1998) Aloenxerto ósseo cortical: avaliação do seu emprego em tibia de cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 50(4):385-394.

Molinaro EM (2010) Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. **EPSJ;IOC** 2(3):89-188.

Moraes PC, Selmi AL, Padilha Filho JG, Canola, JC (2005) Utilização de enxerto cortical de ave (*Gallus gallus domesticus* – LINNAEUS, 1758) na reparação de ostectomia diafisária femoral em gatos. **ARS Veterinária** 121:129-134.

Morgan EF (2009) Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. **Bone** 44(2):335-344.

Nade S, Burwell RG (1977) Decalcified bone as a substrate for osteogenesis. An appraisal of the interrelation of bone and marrow in combined grafts. **The Bone & Joint Journal** 59(2):189-96.

Ni GX, Lu WW, Xu B, Chiu KY, Yang C, Li ZY, Lam WM, Luk KD (2006) Interfacial behavior of strontium-containing hydroxyapatite cement with cancellous and cortical bone. **Biomaterials** 27:5127-5133.

Osathanon T, Linnes ML, Rajachar RM, Ratner BD, Somerman MJ, Giachelli CM (2008) Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials** 29(30):4091-4099.

Palma PJR (2009) Estudo de novas formulações para regeneração óssea em defeitos de dimensão crítica. Coimbra: Universidade de Coimbra.

Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG (2007) Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. **European cells & materials** 13:1-10.

Precheur HV (2007) Bone Graft Materials. **Dental Clinics of North America** 51:729-746.

Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R (2015) Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. **Journal of Biomedical Optics** 20(3):1-7.

Ramirez-Fernandez M, Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, et al. (2011) Bone response to hydroxyapatites with open porosity of animal origin (porcine [OsteoBiol mp3] and bovine [Endobon]): a radiological and histomorphometric study. **Clinical Oral Implants Research**. 22(7):767-73.

Schwartz Z, Somers A, Mellonig JT, Carnes DL Jr, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD (1998) Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. **Journal of Periodontology** 69:470–478.

Stubbs D, Deakin M, Chapman-Sheath P, Debes J (2004) In vivo evaluation of resorbable bone graft substitutes in a rabbit tibial defect model. **Biomaterials** 25:5037-5044.

Syftestad GT, Urist MR (1982) Bone aging. **Clinical Orthopaedics and Related Research** 162:288–297.

Tabata Y (2009) Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of the Royal Society Interface** 6:311-324.

Tomford WW (1995) Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts, **Journal of Bone and Joint Surgery-American** 77(11):1742-54.

Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM (1998) An interspecies comparison of bone fracture properties. **Bio-Medical Materials and Engineering Journal** 8:1-9.

Walsh WR, Chapman-Sheath PJ, Cain S, Debes J, Bruce WJ, Svehla MJ, Gillies RM (2003) A resorbable porous ceramic composite bone graft substitute in a rabbit metaphyseal defect model. **Journal Of Orthopaedic Research** 21:655–661.

Yu D, Li Q, Mu X, Chang T, Xiong Z (2008) Bone regeneration of critical calvarial defect in goat model by PLGA/TCP/rhBMP-2 scaffolds prepared by low temperature rapid prototyping technology. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery** 37:929-934.

Yu H, Vandevord PJ, Mao L, Matthew HW, Wooley PH, Yang SY (2009) Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization. **Biomaterials** 30:508-517.

Zhukauskas R, Dodds RA, Hartill C, Arola, T, Cobb RR (2010) Histological and radiographic evaluations of demineralized bone matrix and coralline hydroxyapatite in the rabbit tibia. **Journal of Biomaterials Applications** v. 24.