



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**ESTUDO HISTOLÓGICO DOS TECIDOS CONJUNTIVO E OSTEÓIDE EM
ENXERTOS ÓSSEOS COM POLÍMERO DE MAMONA - ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS**

Walter Martinelli Junior

CAMPINAS
2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**ESTUDO HISTOLÓGICO DOS TECIDOS CONJUNTIVO E OSTEÓIDE EM
ENXERTOS ÓSSEOS COM POLÍMERO DE MAMONA - ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS**

Walter Martinelli Junior

**Dissertação de Mestrado apresentada a Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas - UNICAMP, para obtenção do
título de Mestre em Ciências, sob a
orientação do Prof. Dr. Antonio Santos
Martins**

CAMPINAS

2011

Martinelli Junior, Walter

Estudo histológico dos tecidos conjuntivo e osteóide em enxertos ósseos com polímero de mamona - estudo experimental em ratos./ Walter Martinelli Júnior. Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Santos Martins

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas

1. Biomaterial. 2. Poliuretana de mamona. I. Martins, Antonio Santos. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Estudo histológico dos tecidos conjuntivo e osteóide em enxertos ósseos com polímero de mamona - estudo experimental em ratos.

Título em inglês: Histological study of connective and osteoid tissue in bone grafts with castor oil polymer - experimental study in rats.

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): Biomaterials, Polyurethane resins from castor oil

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Antonio Santos Martins

Banca :

Presidente: Prof. Dr. Antonio Santos Martins

Titulares: Prof. Dr. Orlando Petrucci, Prof. Dr. José Luis Braga de Aquino

Suplentes: Prof. Dr. Luis Roberto Lopes, Prof. Dr. José Gonzaga Teixeira Camargo

Data da defesa: 21/12/2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

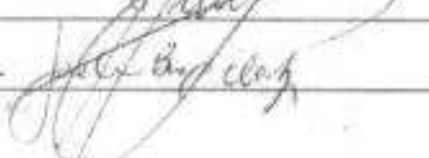
Banca Examinadora da Defesa de Mestrado
Walter Martinelli Junior

Orientador: Prof. Dr. Antonio Santos Martins

Membros:

1. Prof. Dr. Antonio Santos Martins - 

2. Prof. Dr. Orlando Petrucci Junior - 

3. Prof. Dr. José Luis Braga de Aquino - 

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 21/12/2011

DEDICATÓRIA

*A Deus, pela sua presença atuante em
todos os momentos da minha vida.*

*À minha amada esposa Silvia, que em todos os momentos
está ao meu lado, convivendo e compartilhando.*

*Ao meu querido filho Felipe, fonte da mais pura alegria,
que me mostrou o real sentido da vida.*

*Aos meus pais, Walter e Theresa, pelo amor dedicado, carinho e
oportunidades que me ofereceram na vida.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Santos Martins, pela oportunidade e confiança, pelas orientações, incentivo e compreensão para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, titular da disciplina de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, que teve participação decisiva no desenvolvimento das pesquisas.

À Profa. Dra. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin, coordenadora do programa de pós-graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, pelo apoio na realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani, titular do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, pelo incentivo, orientações e auxílio na interpretação histológica desse trabalho.

Aos amigos e colegas de departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais da Santa Casa de Piracicaba pelo estímulo, especialmente ao Prof. Pêrsio Azenha Faber pelas recomendações no início das pesquisas.

Ao Dr. Paulo Saiki, coordenador do laboratório de análises clínicas Patocito de Piracicaba, pelo apoio nas pesquisas, auxiliando na elaboração das lâminas.

Ao Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes, titular da disciplina de Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela colaboração na interpretação dos resultados desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Orlando Petrucci Junior, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, pelo auxílio e orientações desse trabalho, especialmente no referente aos dados estatísticos.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, pela colaboração durante o mestrado.

Aos funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, pela colaboração durante o mestrado.

À empresa Poliquil - Araraquara, na pessoa do Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice, por gentilmente ter cedido os polímeros para a realização das pesquisas.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento das pesquisas.

Aos bioteristas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pelo apoio na manutenção dos animais durante as pesquisas.

Aos funcionários do departamento de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pelo auxílio nas pesquisas.

Ao Dr. Paulo Sálvia, coordenador do laboratório de análises clínicas Citocamp, que muito me auxiliou na fase histológica desse trabalho.

Ao Dr. Perci Zili Bertolini, cirurgião de cabeça e pescoço do hospital Santa Casa de Piracicaba, pelo incentivo no início do mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram ou colaboraram para a realização deste trabalho.

“Eu sou o Caminho, a verdade e a vida”.

Jesus Cristo

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1- INTRODUÇÃO	19
2- REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 Reparação óssea	27
2.2 Enxertos ósseos	30
2.2.1 Enxerto autólogo	30
2.2.2 Enxerto homólogo	32
2.2.3 Enxerto heterólogo	33
2.2.4 Biomateriais	35
3- OBJETIVOS	45
4- MATERIAL E MÉTODO	47
4.1 Animais e Anestesia	48
4.2 Técnica Cirúrgica	50
4.3 Período de Preservação	54
4.4 Preparo das Peças Anatômicas	54
4.5 Fixação das Peças Anatômicas	56
4.6 Descalcificação e Diafanização	56
4.7 Inclusão e Corte	57
4.8 Processo de Coloração	57
4.8.1 Técnica de coloração com Hematoxilina e Eosina	57
4.9 Análise histológica	58
4.10 Estatística	58

5- RESULTADOS	60
5.1 Avaliação clínica dos animais	60
5.2 Avaliação macroscópica	61
5.2.1 Avaliação macroscópica Grupo G1 (30 dias)	62
5.2.2 Avaliação macroscópica Grupo G2 (45 dias)	63
5.2.3 Avaliação macroscópica Grupo G3 (60 dias)	64
5.3 Avaliação microscópica	65
5.3.1 Avaliação microscópica Grupo G1 (30 dias)	65
5.3.2 Avaliação microscópica Grupo G2 (45 dias)	66
5.3.3 Avaliação microscópica Grupo G3 (60 dias)	68
5.4 Resultado Estatístico.....	71
5.4.1 Resultado Estatístico - Infiltrado hemorrágico	72
5.4.2 Resultado Estatístico - Infiltrado inflamatório	73
5.4.3 Resultado Estatístico - Tecido ósteo-condróide	73
6- DISCUSSÃO	75
7- CONCLUSÕES	83
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
9- ANEXO.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fases da reparação óssea	28
Tabela 2: Amostragem do grupo experimental.....	47
Tabela 3: Controle de peso dos animais	48
Tabela 4: Avaliação do grau de claudicação	60
Tabela 5: Avaliação do edema pós-operatório	61
Tabela 6: Análise Estatística – Infiltrado hemorrágico.....	72
Tabela 7: Análise Estatística – Infiltrado inflamatório	73
Tabela 8: Análise Estatística – Tecido osteocondróide	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação genérica de obtenção do poliuretano	39
Figura 2: Anestesia intra-peritoneal.....	49
Figura 3: Tricotomia da região a ser operada.....	49
Figura 4: Antissepsia local com PVPI.....	50
Figura 5: Isolamento do campo e incisão linear de acesso	50
Figura 6: Incisão em região muscular.....	51
Figura 7: Exposição e perfuração do fêmur.....	51
Figura 8: Decorticação do fêmur	52
Figura 9: Instalação do polímero de mamona com micro-parafuso de titânio	52
Figura 10: Fixação do polímero de mamona no fêmur.....	53
Figura 11: Suturas do plano profundo realizadas.....	53
Figura 12: Suturas finalizadas	54
Figura 13: Exposição da peça anatômica para remoção	55
Figura 14: Peça anatômica removida.....	55
Figura 15: Peça anatômica para descalcificação grupo G1 (30 dias)	62

Figura 16: Peça anatômica em cortes grupo G1 (30 dias)	62
Figura 17: Peça anatômica para descalcificação grupo G2 (45 dias)	63
Figura 18: Peça anatômica em cortes grupo G2 (45 dias)	63
Figura 19: Peça anatômica para descalcificação grupo G3 (60 dias)	64
Figura 20: Peça anatômica em cortes grupo G3 (60 dias)	64
Figura 21: Histologia grupo G1 (30 dias) – Imagem 1	65
Figura 22: Histologia grupo G1 (30 dias) – Imagem 2	66
Figura 23: Histologia grupo G2 (45 dias) – Imagem 1	67
Figura 24: Histologia grupo G2 (45 dias) – Imagem 2	67
Figura 25: Histologia grupo G3 (60 dias) – Imagem 1	69
Figura 26: Histologia grupo G3 (60 dias) – Imagem 2	69
Figura 27: Histologia grupo G3 (60 dias) – Imagem 3	70
Figura 28: Histologia grupo G3 (60 dias) – Imagem 4	70
Figura 29: Histologia grupo G3 (60 dias) – Imagem 5	71

LISTA DE ABREVIATURAS

1. ml: Mililitro
2. kg: Kilograma
3. PVPI: Polivinilpirrolidona-iodo
4. SPF: Specific Patogen free
5. IM: Intra-muscular
6. PV: Polímero vegetal
7. CaCO_3 : Carbonato de cálcio
8. PMMA: Polimetilmetacrilato
9. HE: Hematoxilina Eosina
10. BM: Bio materiais
11. DBM: Desmineralization bone matrix
12. BMP: Bone morfogenetic protein
13. FDA: Food and Drug Administration
14. ANS: Agência Nacional de Saúde
15. ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
16. FDI: Federation Dentaire International
17. SNM: Subprograma de novos materiais
18. PADCT: Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
19. RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
20. χ^2 : Teste qui-quadrado
21. P: Probabilidade
22. H_0 : Hipótese nula

RESUMO

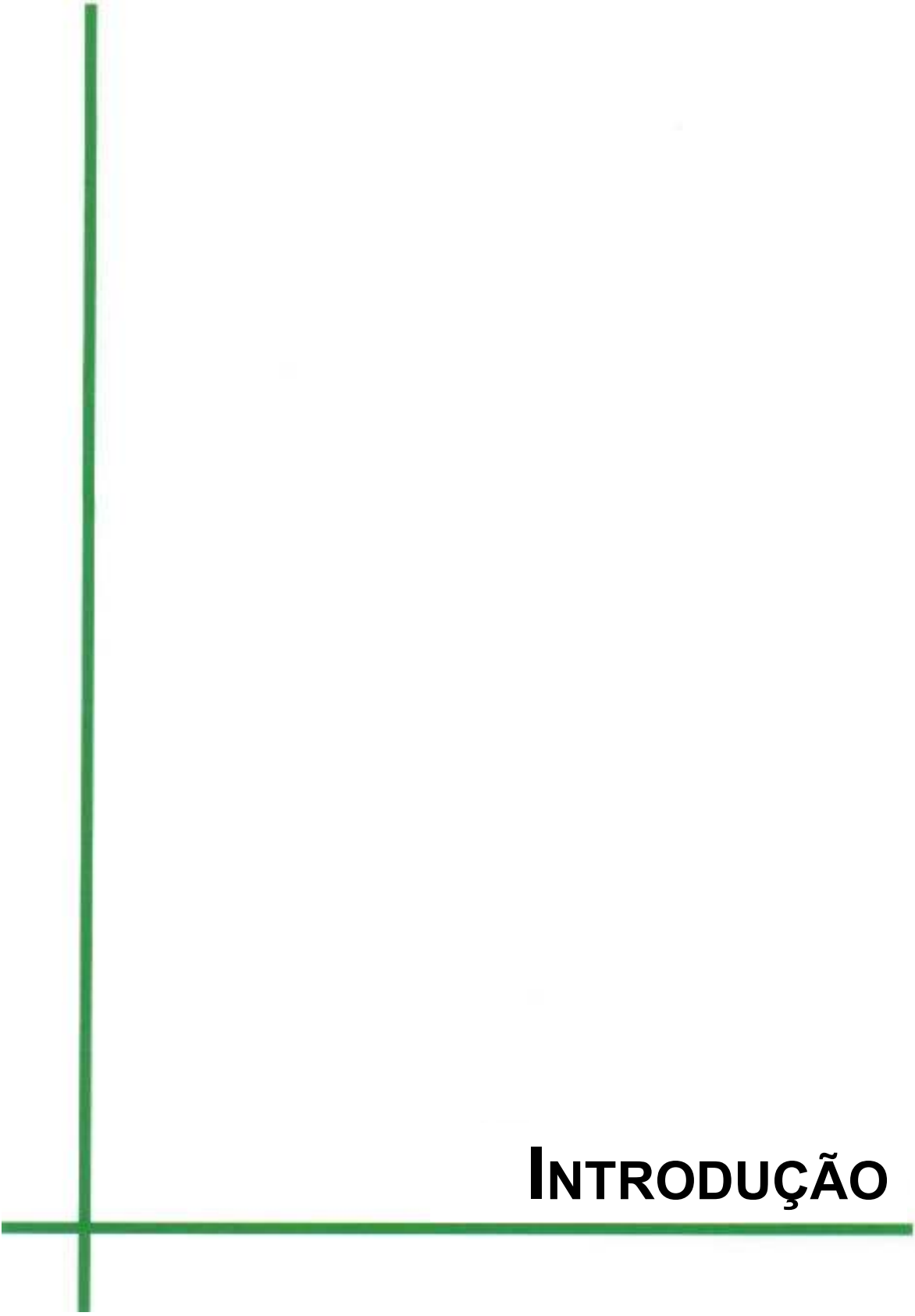
A reconstrução de defeitos com grande perda óssea representa um desafio para as cirurgias reconstrutivas. Na reconstrução desses defeitos, é preciso criar condições para o estímulo da neoformação, impedindo o crescimento de tecido conjuntivo cicatricial para o interior do defeito ósseo, o que reduz a osteogênese. Para contornar esse problema, utilizam-se os procedimentos de cicatrização óssea guiada, ou aqueles relacionados a enxertia. Contudo, os enxertos quando autógenos têm o inconveniente de submeter o paciente a considerável desconforto e morbidade pós-cirúrgica e, quando homólogos ou xenólogos, podem desenvolver reação de rejeição. Para evitar esses inconvenientes, vem sendo preconizada a utilização de substitutos ósseos sintéticos. O polímero da mamona tem como principais vantagens a disponibilidade e baixo custo (sobretudo por ser de origem nacional), ausência de riscos de transmissão de doenças, ser biotolerável e osseointegrável. O presente estudo teve por objetivo avaliar a evolução e analisar os resultados experimentais em curto prazo, da utilização do polímero da mamona em forma de blocos pré-fabricados, como biomaterial alternativo para utilização nas reconstruções de falhas ósseas. Foram operados 15 ratos machos Wistar SPF albinos adultos, divididos em 3 grupos de 5 animais (grupos G1, G2 e G3) com período de preservação de 30, 45 e 60 dias respectivamente. Foram criados defeitos nos fêmures dos animais com uma broca esférica de nº 8, removendo parcialmente osso cortical com motor de baixa rotação e abundantemente irrigado com solução salina. Nessa região foram fixados blocos de polímero vegetal (10 x 5 x 1 mm) com parafuso de titânio (1,5 x 8 mm). Após os procedimentos laboratoriais de preparo, as peças foram cortadas e coradas pelo método H.E. Os resultados indicaram biocompatibilidade óssea do polímero vegetal. Em nenhum dos períodos analisados houve reação de rejeição tipo corpo estranho, ocorrendo neoformação de tecido conjuntivo e osteocondróide na interface osso-prótese. Conclui-se, assim, que o polímero vegetal (PV) é um material de enxerto bioativo e osteocondutor, podendo ser considerado um substituto ósseo nacional alternativo facilmente disponível para ser utilizado com sucesso nas cirurgias que envolvem perdas ósseas. Pretendemos prosseguir esse estudo comparando-se a um grupo controle, com follow up maior.

Palavras-chave: Biomateriais, Poliuretano de mamona

ABSTRACT

The reconstruction of great bone loss defects represents a challenge for reconstructive surgery. To reconstruct these defects it is necessary to create conditions to stimulate new bone formation, in order to block the connective healing tissue growth towards the bony defect, which blocks the osteogenesis. The autogenous grafts are inconvenient, because they submit the patient to considerable discomfort and post-operative morbidity. The heterogeneous and xenogenous grafts can also create rejection reaction. This study aimed to evaluate the progress and analyze the experimental results (in the short term), of the use of castor oil polymer in the form of prefabricated blocks, as an alternative biomaterial to reconstruct bone defects. We operated 15 male SPF Wistar albino rats adults, which were divided into 3 groups of 5 animals (groups G1, G2 and G3) with periods of follow up at 30, 45 and 60 days, respectively. Defects were created in the femurs of the animals with a burr, partially removing the cortical bone with low engine speed and abundantly irrigated with saline. In this region were fixed blocks of polymer plant (10 x 5 x 1 mm) with titanium screw (1,5 x 8 mm). After the laboratory procedures of preparation, the samples were counted and stained by HE. The results showed bone biocompatibility of the polymer implant. In none of the periods analyzed we observed inflammatory reaction or reaction foreign body, allowing the neoformation of connective tissue and osteo-chondroid at the bone-prosthesis interface. We conclude that the vegetal polymer is a bioactive and osteoconductive graft and can be considered a national bone substitute alternative, readily available to be successfully used in surgeries that involve bone loss. We intend to continue this study with a comparison to a control group, with longer follow up.

Key words: Biomaterials, Castor Oil Polyurethane



INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto, servindo como suporte para as partes moles e protegendo órgãos vitais, como os contidos nas caixas torácica e craniana, no canal raquidiano e medula óssea, que é responsável pela formação das células sanguíneas. Proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis e constitui-se em um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Além dessas funções, os ossos atuam como depósitos de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração destes importantes íons nos líquidos corporais (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Porém, o tecido ósseo é freqüentemente acometido por defeitos causados por traumas, patologias de origens variadas, infecções e deformidades congênitas. (LANCE, 1985).

Devido à localização, os ossos faciais freqüentemente são sede de fraturas, cuja complexidade depende do grau e da intensidade da força aplicada pelo agente causador (ROWE et al., 1994).

Em muitos casos, o curso preferencial do tratamento envolve remoção dos tecidos afetados e suas substituições por algum tipo de composto natural e/ou sintético biocompatível. Até então não há dúvida que o tecido ou órgão natural, quando corretamente indicado, torna-se preferível ao composto sintético (FRASCINO, 1998; PERRY, 1999).

Entretanto, limitações logísticas, como facilidade de obtenção, imunocompatibilidade, fonte doadora, local e tempo apropriados exigidos para o tratamento, propiciam a base necessária para as cirurgias reconstrutivas buscarem compostos apropriados, restritos ao tipo de tecido e função a serem "reproduzidos", coniventes com os objetivos do tratamento pré-estabelecido (AKAGAWA, 1985).

Nos ossos, o processo regenerativo é complexo e se desenvolve em fases distintas: formação de coágulo; demolição do coágulo; organização com formação de tecido de granulação mesenquimal ossificável e, subsequente, forma-se o tecido

ósseo, nesse tecido de granulação mesenquimal. Essa formação pode se dar de duas maneiras: por meio do processo de ossificação direta (ou intramembranosa), ou pelo processo de ossificação indireta (ou endocondral). O resultado de ambos os processos é a regeneração de novo osso, cuja estrutura, após a remodelação, é indistinguível do osso maduro pre-existente (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

A reconstrução de defeitos com grande perda óssea representa um desafio para as cirurgias reconstrutivas. Para a recomposição desses defeitos, é preciso criar condições para o estímulo da neoformação óssea a fim de impedir o crescimento de tecido conjuntivo cicatricial para o interior do defeito ósseo, que reduz a osteogênese. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Tem sido sugerido que a neoformação óssea pode ocorrer por meio de três mecanismos diferentes:

- a) a osteogênese, que implica no transporte de células ósseas vivas;
- a) a osteoindução, meio em que células mesenquimais indiferenciadas se transformam em células osteoprogenitoras devido a influência de um agente indutor;
- b) a osteocondução, onde o tecido ósseo se formaria por aposição sobre e dentro de determinado material.

Um quarto mecanismo, denominado osteopromoção, também pode ser citado, sendo que este envolve o uso de barreiras mecânicas de proteção, que evitam o crescimento de tecido conjuntivo denso em meio ao defeito ósseo, permitindo que o mesmo seja repovoado exclusivamente por células osteoprogenitoras (DAHLIN et al., 1988).

Para que um desses fenômenos ocorra, é necessário que recursos mecânicos ou de preenchimento levem união e fixação às extremidades ósseas e estimulem a regeneração (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

A escolha dos materiais a serem utilizados variou com o passar do tempo. Tal variação deve-se a vários fatores, dentre eles: à opção dos cirurgiões, à comprovação científica da eficácia dos materiais e, principalmente, ao conhecimento da fisiologia que envolve a interface osso-implante (TIDSTROM et al., 1990).

Os enxertos ósseos são classificados da seguinte forma:

- **Autógenos** (quando composto por tecido do próprio receptor);
- **Homógenos** (obtidos de outro indivíduo da mesma espécie que o receptor, mas com carga genética diferente);
- **Isógenos**, (obtidos de outro indivíduo da mesma espécie que o receptor, porém com mesma carga genética);
- **Heterógeno ou xenógeno** (retirados de uma espécie diferente do receptor) (LANCE, 1985; MIRANDA, 2005).

Devido a problemas relacionados à obtenção de quantidade ideal de suprimento ósseo e à morbidade do sítio doador (no caso dos enxertos autógenos) e com a antigenicidade (em relação aos homógenos e heterógenos), uma grande variedade de materiais para preenchimento, denominados de aloplásticos ou biomateriais, foram desenvolvidos (SILVA, 2000).

Os biomateriais (BM) devem apresentar como propriedades a biocompatibilidade. Não podem ser tóxicos ou carcinogênicos, mas precisam possuir resistência mecânica, elasticidade e estabilidade química e biológica (SILVA, 2000).

Assim, o grande desafio no estudo dos BM é encontrar algum que tenha alto grau de semelhança com o tecido vivo, de modo que o organismo possa reconhecê-lo como parte de sua estrutura e não como um agressor ao seu meio (TIDSTROM et al., 1990).

Dessa forma, a partir de 1984, o Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros da Universidade de São Paulo, Campus de São Carlos, iniciaram o desenvolvimento de um polímero com base de moléculas vegetais da mamona e estrutura molecular semelhante a dos organismos vivos (GONRING, 1998).

O óleo da mamona, obtido por prensagem das suas sementes, constitui a substância precursora de um polímero e de uma solução composta por ésteres do ácido ricinoléico, (FERREIRA, et al., 1999).

Embora a toxicidade da mamoneira seja conhecida desde tempos remotos, o óleo de rícino não é tóxico, visto que a ricina, proteína tóxica presente nas sementes (que inativa os ribossomos eucarióticos, impedindo a síntese protéica) não é solúvel em lipídeos, ficando todo o componente tóxico restrito à torta. (LORD et al. 1994;

FRASCINO, 1998; GAILLARD, 1999).

A formação de um polímero se dá por meio da reação química entre um pré-polímero e um poliol. A mamona possui um grande potencial oleoquímico, que garante o fornecimento de polióis e pré-polímeros a partir da produção de ácidos graxos em larga escala. Além disso, o óleo de mamona (também conhecido como óleo de rícino) pode ser considerado como um poliol natural por conter três radicais hidroxilas passíveis de serem usados na síntese de polímeros (Pesquisa e desenvolvimento de biomateriais baseados em poliuretana derivadas de óleo de mamona, SNM 02/94-04, 1994).

Esse elemento pode ser utilizado como cimento ósseo, cuja função é preencher o espaço entre a prótese de superfície e o osso poroso, possibilitando o encaixe. Obtém-se esse cimento por meio da reação do óleo da mamona e do monômero, substância que endurece o polímero. Sua grande vantagem em relação ao cimento convencional é a de ser atóxico (Pesquisa e desenvolvimento de biomateriais baseados em poliuretana derivadas de óleo de mamona, SNM 02/94-04, 1994).

O polímero derivado do óleo de mamona possui uma fórmula molecular que tem mostrado compatibilidade com os tecidos vivos, apresentando aspectos favoráveis de processabilidade, flexibilidade de formulação, versatilidade de temperatura de curva e controle de pico exotérmico na transição líquido-gel. Possui também excelentes propriedades estruturais, e não libera vapores e radicais tóxicos quando implantados. Além disso, seu custo é baixo (CHIERICE, 1994).

Embora estudos experimentais (OHARA et al. 1995; TEIXEIRA et al. 1996, RAMALHO, 1998; OLIVEIRA et al. 2000) tenham comprovado o potencial dessa poliuretana para utilização no tratamento de afecções ortopédicas, somente em 1999 o produto foi aprovado pelo Ministério da Saúde do Brasil (registro Anvisa RDC nº 59) mas está em trâmite pela *Food and Drug Administration* (FDA), agência do governo norte-americano (ERENO, 2003).

Atualmente já existem diversas apresentações comerciais desse material que permitem diferentes flexibilidades de aplicação, tais como em forma de biomassa, blocos pré-moldados, grânulos e endopróteses. O produto pode ser aplicado já polimerizado em forma de blocos, ou então em forma de biomassa para ser manipulado e moldado conforme a necessidade, no ato cirúrgico (BRONZI et al., 1999).

O polímero pode ser manipulado ou processado sem CaCO_3 (carbonato de cálcio), mas a sua adição é que confere os melhores características, estimulando a biointegração (CLARO NETO, 1997).

Porém, o polímero de mamona com adição de CaCO_3 , permite a ocorrência de osteocondução e migração de capilares e células osteoprogenitoras, invadindo a estrutura porosa superficial, seguido da deposição de osso. Esse acarbouço se comporta como um espaçador osteocondutor. O implante é biocompatível, mas não é capaz de osteoindução (LEONEL et al. 2003).

Implantes de resina de mamona têm se mostrado compatíveis no interior de ossos longos em coelhos (IGNÁCIO, 1997), em alvéolos dentais de ratos (CARVALHO, 1997) e em ossos de cães em crescimento (MARIA et al., 2004).

O detergente do óleo da mamona apresenta propriedade antimicrobiana no tratamento endodôntico de dentes necrosados, com atividade bactericida semelhante à do hipoclorito de sódio (FERREIRA, et al., 1999).

SOUZA (2000) operou 22 pacientes com lesões ósseas tumorais submetendo-os à ressecção femoral e, no mesmo ato cirúrgico, reconstruídos com biomaterial à base do polímero da mamona em forma de blocos pré-fabricados e considerou o polímero da mamona como uma alternativa viável para reconstrução de falhas ósseas pós-ressecção de tumores benignos agressivos e malignos.

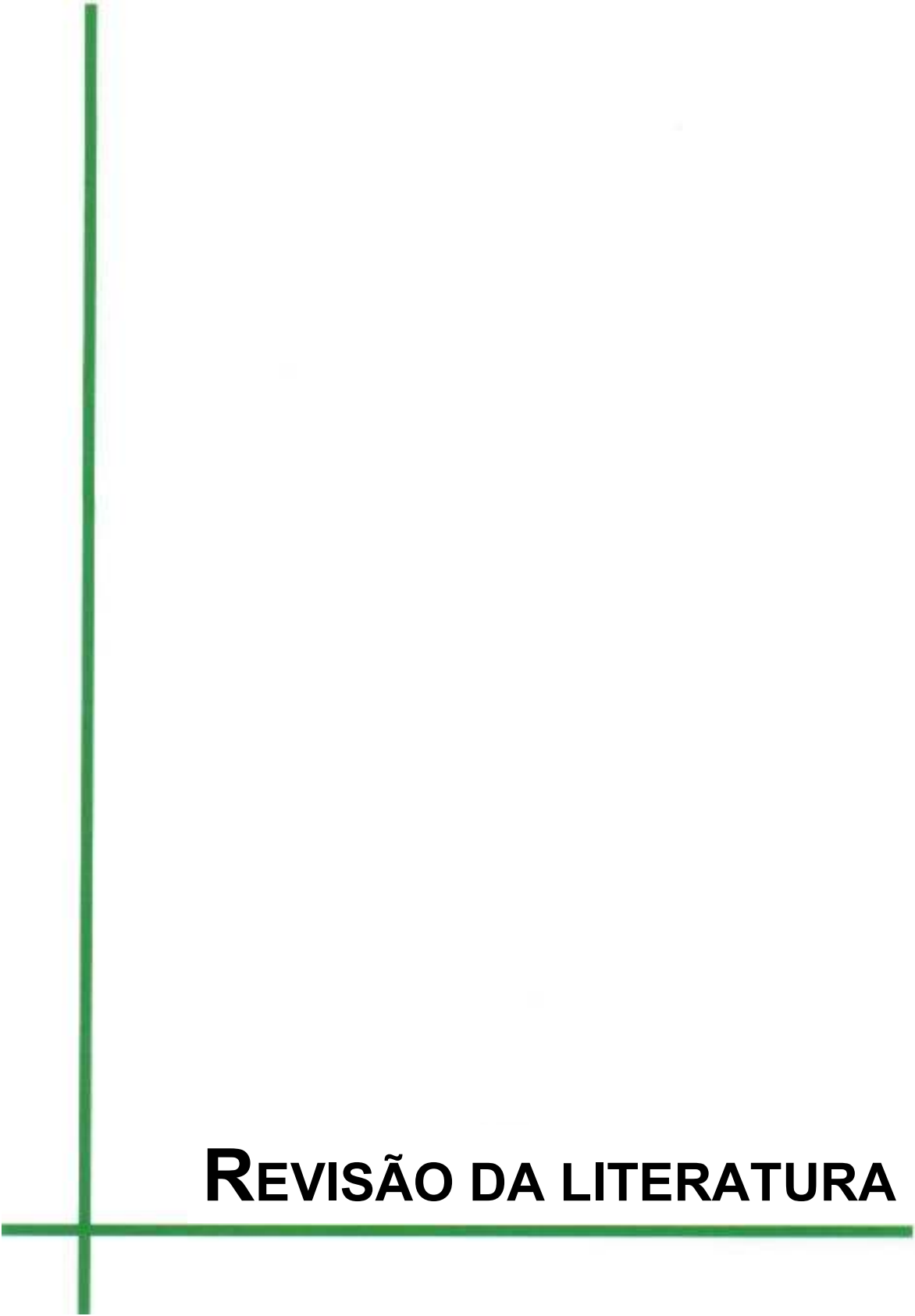
IGNÁCIO et al. (2002) realizaram um estudo experimental em cães, onde foi utilizada a poliuretana da mamona no preenchimento de falhas ósseas. O resultado foi biocompatibilidade com os tecidos, mas comportou-se como um espaçador biológico, apenas preenchendo a cavidade, sem osteointegração.

SARAN (2006) analisou a interface entre o implante de polímero da mamona com o canal medular ósseo em coelhos. A análise histológica mostrou que o polímero é biocompatível, osteoindutor e osteocondutor.

FRAZÍLIO (2007) comparou o polímero de mamona com enxerto ósseo autógeno em articulação de cães. Não observou osseointegração no grupo polímero de mamona. Houve reabsorção do enxerto ao longo do período experimental e ausência de células inflamatórias nos períodos analisados.

DIAS (2007) avaliou a reação dos tecidos circunjacentes ao implante de membrana de polímero de mamona em dorso nasal de macacos prego. Na histologia não se observou reação tipo corpo estranho e se encontrou formação e maturação óssea, indicando a biocompatibilidade do biomaterial.

LAUREANO (2007) comparou matriz óssea desmineralizada de origem humana e resina poliuretana derivada do óleo da mamona em cavidades na calvária de coelhos. A conclusão foi que ambos os materiais apresentaram-se biocompatíveis, sendo a poliuretana reabsorvida mais tardiamente e considerada de melhor resultado em relação ao outro material empregado.



REVISÃO DA LITERATURA

2- REVISÃO DE LITERATURA

A matriz óssea é constituída de uma porção orgânica e uma inorgânica. A porção orgânica está formada principalmente por colágeno do tipo I que corresponde a 95% do total, e o restante é composto por proteínas não colágenas e proteoglicanas. A matriz inorgânica é constituída por sais de cálcio e fosfato na forma de cristais de hidroxiapatita. Protegendo externamente o osso, existe uma fina camada de tecido conjuntivo com grande potencial osteogênico, denominado perióstio e, internamente, o equivalente é chamado de endóstio (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Os osteoblastos são responsáveis pela síntese e secreção da matriz óssea extra celular, estando agregados em uma única camada de células situadas em aposição ao osso em formação (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Os osteócitos são células ósseas maduras incluídas na matriz óssea (dentro de lacunas) recentemente depositada por eles, quando ainda eram osteoblastos. São responsáveis pela manutenção da matriz óssea, contribuindo para a homeostase do cálcio sanguíneo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas, cuja função é reabsorver osso. Estão ativamente associados ao remodelamento ósseo. Quando em atividade, os osteoclastos repousam sobre a superfície do osso e, através de erosão pela ação enzimática, formam um recesso pouco profundo conhecido como lacuna de Howship ou lacuna de reabsorção (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

O tecido ósseo constitui a maior reserva de cálcio do organismo, apresenta grande capacidade de remodelação, renovando-se constantemente para responder às necessidades metabólicas do corpo e manutenção da estabilidade da calcemia. Macroscopicamente, há duas formas de osso: o cortical ou compacto e o esponjoso também chamado de medular. O osso cortical confere resistência e proteção e é encontrado nas diáfises de ossos longos e na superfície externa de ossos chatos. O osso esponjoso atua nas funções metabólicas, delimita espaços entre as trabéculas que são preenchidas por medula óssea vermelha, onde há produção ativa de células sanguíneas a partir de células mesenquimais ou, com o envelhecimento, por medula óssea amarela (GARTNER e HIATT, 2003).

Histologicamente, existem dois tipos de tecido ósseo: o osso primário,

embrionário, imaturo, isotrópico ou osteóide e o osso secundário, maduro, anisotrópico ou lamelar. Ambos possuem as mesmas células, porém apresentam diferentes orientações das fibrilas de colágeno quando analisados sob microscopia de luz polarizada (ARRIGTON et al. 1996; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

O osso primário é o primeiro tecido ósseo a se formar durante o desenvolvimento fetal, e durante a reparação óssea. Possui, proporcionalmente, grande número de osteócitos, dispostos irregularmente nas trabéculas ósseas neoformadas. As fibras colágenas apresentam-se sem organização definida e o teor mineral é menor que no osso secundário. O tecido ósseo secundário substitui gradativamente o tecido ósseo primário pela deposição gradual de fibras colágenas, modelando a forma trabecular do osso primário em lamelas dispostas paralelamente umas às outras, formando ângulos retos que definem pequenos espaços medulares, chamado osso esponjoso. Quando as fibras colágenas encontram-se dispostas em camadas concêntricas em torno de capilares sanguíneos e nervos, denominamos de canal de Havers, formando o osso compacto. Esse padrão de modelação óssea é explicado pela incidência de forças externas sobre o tecido, alterando assim a forma das fibras colágenas e, por fim, levando à resistência do tecido. Nota-se então que o osso é um tecido adaptável, pois o tipo de modelamento ósseo está relacionado à carga de forças que ele recebe, formando assim o osso medular e o cortical. (GARTNER e HIATT, 2003).

2.1- Reparação óssea

Após uma lesão óssea, uma sequência de eventos dinâmicos ocorre com o objetivo de restaurar a forma e a função do osso, que é semelhante tanto para pequenas quanto para grandes injúrias, para fraturas ósseas e para defeitos cirúrgicos.

Para se entender melhor o processo de reparação óssea por ocasião de uma enxertia, torna-se indispensável alguns conhecimentos a respeito do processo de consolidação das fraturas.

São cinco as principais etapas do processo de reparação óssea e estão descritas a seguir:

Tabela 1 – Fases da reparação óssea

Fase	Tempo	Atividades
Indução	0 a 2 dias	Formação de hematoma, liberação de fatores solúveis de indução, crescimento e inflamação
Inflamação	2 a 14 dias	Proliferação de células polimorfonucleares, neutrófilos e macrófagos
Calo fibroso	2 a 8 semanas	Material altamente celular e colagenoso na falha óssea / condrogênese e angiogênese.
Calo ósseo	2 a 12 meses	Formação de osso trabeculado considerando-se consolidado
Remodelação	1 ou mais anos	Formação de osso lamelar

Na fase inicial forma-se um hematoma e mensageiros moleculares entram no compartimento extracelular. Estes fatores estimulam a migração celular, proliferação e diferenciação e inicialmente controlam o processo de reparação óssea. Durante a fase inflamatória, neutrófilos e macrófagos invadem a ferida para remover os microorganismos e estimular mediadores bioquímicos que desencadeiam respostas fibroblásticas e angiogênicas. A fase inflamatória é essencial para o processo de cicatrização óssea, estando a administração de agentes antiinflamatórios contraindicados nas primeiras duas semanas pós trauma. Depois então se forma o chamado calo fibroso. Esse calo é fundamentalmente formado por matriz colagenosa extracelular que tem um potencial altamente ativo e que se expande por toda área onde exista falha óssea. Surgem então os condrócitos e células osteoprogenitoras. A formação cartilaginosa e a revascularização são características essenciais dessa fase. Após cerca de duas semanas esse calo está praticamente formado e dá origem à fundação para o tecido ósseo duro. A fase seguinte é a de formação do calo ósseo propriamente dito e tem início com a calcificação da cartilagem. Nessa terceira fase os osteoblastos se diferenciam e elaboram os osteóides. Cartilagem calcificada é reabsorvida e forma-se osso novo, seguido de remodelação. Apesar de a formação de osso cortical ser incompleta durante essa fase, a consolidação é suficientemente rígida permitindo a

restauração da função. Meses e até mesmo anos após um trauma ortopédico são necessários para que haja uma remodelação do calo em osso estrutural e lamelar de forma completa (Kenley et al., 1993).

Ainda no que diz respeito à formação óssea, é importante distinguir os termos osteogênico, osteoindutor e osteocondutor. Material osteogênico é aquele que contém células que estão comprometidas com fenótipos osteoblásticos ou material que estimulam células osteoprogenitoras e desencadeiam a maturação dos osteoblastos induzindo a sua proliferação. Medula óssea e enxerto ósseo autógeno contém células osteoprogenitoras e, portanto, são osteogênicos. Medula óssea, enxerto ósseo e matriz óssea desmineralizada (DBM), contém fatores de crescimento que estimulam células comprometidas. Por comparação, material osteoindutor estimula células descomprometidas (células mesenquimais indiferenciadas) a se converter em células condroprogenitoras e osteoprogenitoras. A distinção entre proliferação e diferenciação celular é que a primeira caracteriza osteogênese e a segunda caracteriza osteoindução. Proteínas ósseas morfogenéticas são osteoindutoras. Medula óssea, enxerto ósseo, e matriz óssea desmineralizada contém proteínas morfogenéticas e são, portanto, osteoindutoras assim como osteogênicas. Osteocondução é um conceito importante e que tem dois significados diferentes. Algumas referências usam esse termo para descrever o processo através do qual o crescimento ósseo progride da fratura em direção ao espaço ósseo existente. Mais comumente, osteocondução refere-se ao substrato que promove um depósito favorável à penetração vascular, infiltração e fixação celular, formação cartilaginosa e deposição de tecido ósseo calcificado. Acredita-se, portanto, que a regeneração óssea pode ser obtida através da combinação de materiais osteocondutores com osteogênicos e/ou osteoindutores. Todo material de enxertia, que visa substituição óssea, deve possuir ao menos um desses três modos de ação (Kenley et al., 1993).

Um quarto termo, osteopromoção, refere-se ao princípio de utilizar barreiras mecânicas (membranas) que evitam a proliferação do tecido conjuntivo denso adjacente em meio ao defeito ósseo, permitindo que o mesmo seja povoado apenas por células osteoprogenitoras (DAHLIN et al., 1988).

Biocompatibilidade, disponibilidade, osteogênese, osteoindução, osteocondução e estabilidade mecânica são as principais propriedades dos enxertos.

Como poucas técnicas reúnem todos estes requisitos de forma proporcional, o cirurgião necessita ter critérios de escolha. A biocompatibilidade dos enxertos autógenos é indiscutível. No entanto, devido à morbididade da área doadora e limitação da oferta, ainda existe uma busca constante de outros materiais que possam oferecer algumas ou todas as vantagens dos enxertos autógenos (Kenley et al., 1993).

2.2- Enxertos ósseos

Os enxertos ósseos favorecem a consolidação óssea, provendo uma fonte osteogênica, osteocondutiva, osteoindutiva, dependendo do tipo de material (FITCH et al., 1997). Esses enxertos e seus substitutos têm um ou mais dos seguintes componentes: células tronco indiferenciadas, fatores de crescimento e um arcabouço estrutural. Cada um deles tem sido utilizado individualmente ou em várias combinações no tratamento de defeitos ósseos. As células tronco indiferenciadas são caracterizadas por uma baixa taxa de crescimento, capacidade de regeneração e habilidade de se diferenciar entre as várias linhagens celulares. Elas substituem células que foram perdidas pela senilidade ou por injúria. Os fatores de crescimento são proteínas que induzem as células tronco a se proliferarem ou se diferenciarem em células tipo osteoblasto. O arcabouço estrutural auxilia na diferenciação das células tronco e, embora não osteogênico, pode aumentar esse potencial osteogênico das células tronco e dos fatores de crescimento (PERRY et al., 1999)

2.2.1- Enxerto autólogos

O auto-enxerto de osso fresco é o mais efetivo em promover a consolidação, já que proporciona células viáveis e elimina os problemas de histocompatibilidade e transmissão de doenças (GOLDBERG et al., 1987). Por outro lado, eles têm como desvantagens: necessidade de dois tempos cirúrgicos e ou dois procedimentos, colheita e transplante (PINTO JÚNIOR, 1990), exigência de um novo acesso cirúrgico e a limitação em quantidade, aumento do tempo anestésico, risco de infecções e perda de

sangue intra-operatória (FITCH et al., 1997). Além disso, existem limitações como complicações da ferida cirúrgica, a perda de sensibilidade local e, o mais importante, a dor crônica no local da colheita. Esta última tem sido relatada como sendo superior a três meses em mais de 15% dos pacientes que foram submetidos à colheita de enxerto ilíaco (ARRINGTON, et al., 1996).

A limitação primária da utilização de auto-enxerto ósseo esponjoso é a quantidade de enxerto que é rapidamente obtida. Fontes de osso esponjoso são a crista ilíaca, a região distal do fêmur e o trocanter maior, além da região proximal da tíbia e da porção craniolateral do úmero (PERRY, 1999; FINKEMEIER, 2002). Estudos com autoenxerto ósseo esponjoso em cães evidenciaram que nos animais de porte médio e grande, a colheita de osso esponjoso a partir da tíbia é um procedimento seguro (JOHNSON, 1986). Apesar de suas limitações, auto-enxertos ósseos esponjosos continuam a ser os mais efetivos meios pelos quais a consolidação óssea é alcançada clinicamente. Há evidências que osso de origem intramembranosa é mais osteoindutivo que o de origem endocondral (PERRY, 1999).

As indicações para a utilização primária de auto-enxerto esponjoso incluem: preenchimento de defeitos corticais após curetagem ou excisão de cistos ósseos; tumores ou infecções crônicas como um auxiliar em artrodeses de articulações danificadas por traumas, doenças ou deformidades; para substituir fragmentos corticais avasculares. Além disto, também são utilizados para promover a consolidação nos casos de pseudo-artroses, em casos de não-união ou união retardada de fraturas, associadas ou não a osteomielite; como auxiliar no reparo de fraturas distais de rádio-ulna, particularmente em cães de pequeno porte, devido ao tênue suprimento vascular desta região; para restabelecer a continuidade de um osso severamente fraturado (JOHNSON, 1986; ALEXANDER, 1987).

Na realidade, a melhor técnica para preenchimento dessas grandes falhas ósseas seria através de enxertos autólogos devido ao seu poder de regeneração e de integração ao leito receptor, uma vez que tem um enorme potencial osteogênico e osteoindutor. No entanto, face à limitação da quantidade de osso dispensável do próprio paciente para o preenchimento de grandes segmentos, torna-se, em certos casos, inviável esse procedimento (KENLEY et al., 1993)

Os enxertos esponjosos são os que têm maior capacidade de revascularização. Já os enxertos corticais são mais utilizados como suporte mecânico. O enxerto autólogo não vascularizado é considerado como o meio biológico mais fácil e seguro para enxertia, sendo a crista ilíaca e a fíbula os dois principais sítios doadores (ENNEKING et al., 1980).

2.2.2- Enxerto Homólogo

Trata-se de transplante de osso de um indivíduo para outro da mesma espécie. Uma fina camada de células periféricas, nutridas por líquido tecidual, sobrevive. O enxerto necrosado é rapidamente permeado por fagócitos e células inflamatórias que removem o tecido necrótico remanescente das células medulares. Isto é seguido por um crescimento de um tecido fibrovascular reparativo que revasculariza os espaços medulares necrotizados. Dentro de sete a dez dias, entretanto, o crescimento fibrovascular, repentinamente trombosa e a revascularização é interrompida. Esta interrupção abrupta da substituição óssea é causada por uma interação imunológica entre antígenos de histocompatibilidade oriundos das células sobreviventes do enxerto e anticorpos celulares formados pelo hospedeiro contra esses antígenos, os quais produzem uma resposta inflamatória, granulomatosa, que destrói as conexões vasculares entre enxerto e hospedeiro. Após a rejeição inicial dos componentes celulares, um dos três fatos abaixo pode ocorrer com a matriz do enxerto homólogo: quando a incompatibilidade imunológica entre o hospedeiro e o enxerto é mínima, o mesmo funciona como um arcabouço para uma eventual substituição óssea; quando a incompatibilidade é moderada, o enxerto permanece inerte com reparação apenas superficial; e, quando a incompatibilidade é severa, o enxerto é reabsorvido sem reparação nenhuma (ENNEKING et al., 1980).

A antigenicidade, com reação tipo antígeno-anticorpo constitui o grande aspecto desfavorável. Porém os enxertos homólogos têm a vantagem de estar prontamente disponíveis nos bancos de ossos e evitam todos os transtornos causados na área doadora dos enxertos autólogos. As células do transplante são consideradas antigênicas, enquanto que a matriz do transplante, a qual é composta de glicoproteínas,

colágeno e mucopolissacarídeo, pode ou não ser antigênica. A ocorrência de infecção, devido ao seu potencial como antígeno, contribui para a falha do enxerto homólogo, uma vez que não tem defesa contra os microorganismos carregados através da cirurgia ou contra aqueles que chegam através da corrente sanguínea no pós-operatório. Desta forma o enxerto funcionaria como um local de resistência diminuída e mais susceptível aos processos infecciosos. O osso homólogo comportar-se-ia como espaço morto ou corpo estranho que não é protegido pelo sistema imunitário (ENNEKING et al., 1980; GARTNER et al., 2003).

A bacteriologia do enxerto homólogo em banco de ossos foi estudada, tendo-se constatado taxa de contaminação em cerca de 30% nos enxertos de cadáveres (CHAPMAN et al., 1992).

2.2.3- Enxerto heterólogo

São aqueles transplantados de um indivíduo de uma espécie para outra. Sem exceção, todo tecido heterólogo desencadeia uma resposta imunogênica com formação de anticorpos e rejeição do tecido transplantado. Tecido fresco transplantado produz uma rejeição mais rápida e violenta do que aqueles preservados, mas ambos são rejeitados. Diversas tentativas foram feitas no sentido de diminuir ou eliminar essa reação antigênica através de técnicas químicas e enzimáticas. Nos Estados Unidos, a produção de BOPLANT, que consiste de material ósseo extraído de bovinos e tratado com detergentes, desengordurado com éter e criopreservado depois de liofilizado, foi retirado de uso pela FDA, face aos constantes processos de rejeição. Histologicamente sabe-se que os enxertos heterólogos são rapidamente envolvidos por um tecido antiinflamatório agudo e reabsorvidos no curto espaço de tempo. Ao microscópio este tecido inflamatório é composto por capilares, células mesenquimais primitivas, células inflamatórias agudas e crônicas e osteoclastos. Os osteoclastos aglomeram-se nas terminações do osso enxertado e ativamente o reabsorvem (ENNEKING et al., 1980).

O osso heterólogo descalcificado pode constituir-se numa alternativa ao enxerto ósseo autólogo (CHALMERS et al., 1959).

A implantação de osso em locais extra-ósseos, ora descalcificado e

linfofilizado, ora apenas descalcificado, levou à observação de que ambos acarretam neoformação óssea após 4 a 6 semanas (REDDI et al., 1971).

A comparação de enxerto ósseo esponjoso com matriz óssea desmineralizada, após o preenchimento de falhas ósseas em ulnas de coelhos, levou à conclusão de que ambas tinham a mesma resistência (BOLANDER, 1986).

Resultados satisfatórios com a utilização da matriz óssea desmineralizada em pó foram relatados (EINHORN et al., 1984).

A proteína óssea morfogenética também pode ser identificada na matriz óssea de coelhos, na dentina e em tecido sarcomatoso, sob a forma de proteína de baixo peso molecular e pode ser extraída usando-se hidrócloro de guanidina (URIST et al., 1982).

Comparando-se o potencial osteogênico da matriz óssea desmineralizada com o do enxerto autólogo, constatou-se, após estudos radiológicos, histológicos e com radioisótopos, que a matriz óssea desmineralizada em pó era capaz de induzir a formação de uma base cartilaginosa mesmo antes da osteogênese, considerando-se esse fato como um processo mais fisiológico, que poderia garantir um crescimento ósseo mais rápido (GEPSTEIN et al., 1987).

A consolidação de defeitos ósseos em fêmures de ratos após utilização de BMP para preenchimento de falhas ósseas de 5mm, demonstrou a formação de cartilagem anterior à neoformação óssea propriamente dita (YASKO et al., 1992).

Importante observação foi feita ao se verificar que a proteína óssea morfogenética bovina utilizada em cães para preenchimento de falhas ósseas, induzia a diferenciação de células teciduais conectivas perivasculares em condroblastos e células osteoprogenitoras, aumentando o processo de regeneração óssea das células no endóstio e perióstio (NILSSON et al., 1986).

O uso de hidroxiapatita porosa em conjunto com uma proteína osteoindutora ou pérolas de "LACTOMER" (copolímero de ácido polilático e ácido poliglicólico), na reconstrução de falhas ósseas no crânio de ratos constatou um aumento do crescimento ósseo naqueles onde foi adicionada a proteína morfogenética (UEDA, 1996).

Excelentes resultados foram obtidos com o preenchimento de cavidades ósseas na mão de pacientes portadores de lesões ósseas cavitárias com enxerto ósseo

desmineralizado (VILAR, 2005).

Baseado nos dados disponíveis nos dias de hoje, sabe-se que a BMP possui atividade osteoblástica e osteoclástica, facilitando a transformação em osso lamelar e parecendo recapitular a seqüência do processo de reparação de fraturas e formação embriogênica do osso original e, portanto, prover subsídios para a terapia revolucionária da prática ortopédica futuramente (WOZNEY, 2002).

2.2.4- Os biomateriais

Os biomateriais utilizados para substituir o tecido ósseo atuam, assim como os citados anteriormente, por três mecanismos diferentes: osteogênese, osteocondução e osteoindução. Na osteogênese, observamos que o material é capaz de formar osso diretamente a partir de osteoblastos provenientes da área doadora; o osteocondutor preenche o local da lesão e conduz o desenvolvimento de novo tecido ósseo através da sua matriz de suporte, podendo ser englobado pelo tecido de reparo e fazendo parte do osso neoformado, além de ser reabsorvido simultaneamente por tecido ósseo. Podemos citar o colágeno, a hidroxiapatita e o sulfato de cálcio. O material com capacidade osteoindutora auxilia a reparação da lesão, induzindo a formação de novo tecido ósseo por mecanismo em que células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos. Como exemplos de materiais osteoindutores podemos citar o osso autógeno, a matriz orgânica do osso humano ou bovino e os fatores de crescimento (CARVALHO, 1997).

O desenvolvimento tecnológico possibilitou a incorporação em pesquisas de materiais sintéticos desenvolvidos para uso em área da saúde com a finalidade de substituir a matéria viva cuja função foi perdida. Biomateriais constituem qualquer substância sintética ou natural que pode ser utilizada como tratamento para substituição total ou parcial de qualquer tecido ou órgão do organismo. O biomaterial ideal teria que ser biocompatível com o tecido, não carcinogênico ou pirogênico, atóxico, além de apresentar estabilidade química, resistência mecânica, elástica adequada e de baixo custo (GUASTALDI, 2003).

Uma das definições correntes diz que biomateriais são materiais sintéticos ou

naturais, sólidos, ou às vezes líquidos, utilizados em dispositivos médicos. São enquadrados como biomateriais: próteses, lentes, enxertos, cateteres, tubos de circulação extra-corpórea e arcabouços empregados na engenharia de tecidos. (ANVISA, 2005).

O requisito mínimo para a implantação de materiais aloplásticos no interior de tecidos biológicos é a biocompatibilidade. Qualquer material estranho colocado no interior de tecidos vivos provoca uma resposta. Não é a resposta em si, mas sua extensão, intensidade e duração que determinam a biocompatibilidade, ou seja, um estado de mútua coexistência entre o material e o ambiente fisiológico, sem que um exerça efeito desfavorável sobre o outro (AKAGAWA, et al., 1985).

Considera-se que a biocompatibilidade e capacidade de osseointegração não são propriedades exclusivas da composição química dos biomateriais, mas também de suas propriedades físicas. A maneira que o tecido hospedeiro responde ao biomaterial, determinando o sucesso ou fracasso do implante, parece ser determinada pelas características físicas da superfície, mais do que pela composição química (BOSS, 1995).

No caso dos implantes intra-ósseos, espera-se que o material implantado seja capaz de estabelecer um contato direto com o tecido ósseo reparacional (osseointegração direta). Os biomateriais podem também estabelecer com o osso circundante uma integração indireta ou fibro-óssea, quando uma cápsula fibrosa se interpõe entre eles e a superfície do osso, o que é aceitável apenas nos estágios iniciais pós-implantação por ser desfavorável à estabilidade dos implantes, em longo prazo (BARROS, 2000).

A mamoneira (*Ricinus Communis* L.) é uma oleaginosa de grande importância no Brasil e no mundo. Produz um óleo que é uma matéria prima de aplicações únicas na indústria química, dadas às características peculiares de sua molécula que fazem do óleo por ela produzido o único óleo vegetal naturalmente hidroxilado. Além disso, sua composição com predominância de um único ácido graxo, ricinoléico, confere-lhe as propriedades químicas atípicas.

Além da vasta aplicação na indústria química, a mamoneira é importante por sua tolerância à seca, o que a torna uma cultura viável para a região semiárida do Brasil, na qual são poucas as alternativas agrícolas. Esta cultura, no entanto, não é

encontrada apenas na região semi-árida do Brasil, sendo, inclusive, plantada com excelentes resultados em diversas regiões do país (BELTRÃO et al., 2009).

A mamona é uma dicotiledônea da família das Euforbaceae. Planta típica do Brasil, seu óleo contém 80% de triglicerídio do ácido ricinoleico, e se caracteriza como um poliéster. Possui três moléculas do ácido 12-hidroxi-oleico, e cada uma delas apresenta um grupo hidroxila no carbono (IGNÁCIO, 1997).

Os polímeros constituem uma classe de materiais biocompatíveis, naturais ou sintéticos, sendo os mais empregados, dentre outros, os silicões, o ácido polilático, o ácido poliglicólico, a polidioxanona, o polietileno, o polipropileno, o metilmetacrilato e as poliuretanas. Podem ser processados por diferentes modos de elaboração em fibras, materiais de sutura, hastes, parafusos, placas e grampos (IGNÁCIO, 1997).

Como a mamona existe em grande abundância no território brasileiro e apresenta grande potencial óleo-químico, pode garantir o fornecimento de polióis e pré-polímeros a partir de ácidos graxos em grande escala. (IGNÁCIO, 1997).

O ácido ricinoléico é o principal componente do óleo da mamona, sendo inúmeras as suas aplicações. Além de purgativo, o óleo de rícino pode ser utilizado na fabricação de tintas, corantes, anilinas, desinfetantes, germicidas, óleos lubrificantes de baixa temperatura, colas e aderentes, náilon e matéria plástica. O óleo pode ainda ser utilizado na produção de biodiesel e como base na manufatura de cosméticos e de muitas drogas farmacêuticas (DE OLIVEIRA et al., 2005; COSTA, et al., 2004).

O óleo da mamona, obtido por prensagem das sementes, constitui a substância precursora de um polímero e de uma solução composta por ésteres do ácido ricinoleico, denominada detergente do óleo da mamona (FERREIRA, et al., 1999). Implantes de resina de mamona têm se mostrado compatíveis no interior de ossos longos em coelhos (IGNÁCIO, 1997), em cavidades alveolares em ratos (CARVALHO, 1997) e em ossos de cão em fase de crescimento (MARIA et al., 2001). O detergente derivado do óleo da mamona, por sua vez, apresentou propriedade antimicrobiana no tratamento de dentes com necrose de polpa e a atividade bactericida desta substância foi semelhante à do hipoclorito de sódio (FERREIRA, et al., 1999).

O polímero derivado do óleo de mamona possui uma fórmula molecular que tem mostrado compatibilidade com os tecidos vivos, apresentando aspectos favoráveis

em suas características bioquímicas. Possui também excelentes propriedades estruturais, além de não liberar vapores e radicais tóxicos quando implantados e ser de baixo custo (CHIERICE, 1994).

O polímero pode ser processado sem carbonato de cálcio, mas a sua adição é que confere os melhores padrões de resistência e elasticidade em relação ao tecido ósseo, além de fornecer cálcio na região da interface osso/polímero quando implantado, estimulando assim a biointegração (CLARO NETO, 1997).

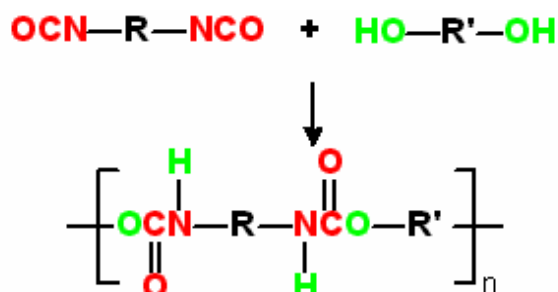
A poliuretana da mamona poderia ser utilizada na forma pura ou em associação com o carbonato de cálcio, que facilitaria as trocas iônicas na interface osso-resina, aumentando, assim, os níveis de dissolução celular e facilitando sua degradação (CHIERICE, 1994).

Na composição química dessa material existe uma cadeia de ácidos graxos cuja estrutura molecular está presente nas gorduras existentes no corpo humano. Por isso, as células não “enxergam” a resina de mamona como corpo estranho e não a repelem (CHIERICE, 1994; ERENO, 2003).

O polímero de mamona acrescido de cálcio permite a ocorrência de osteogênese e osteocondução com formação progressiva de osso novo, principalmente quando adicionado de células tronco. Permite, também, a migração de capilares de tecidos perivasculares e células osteoprogenitoras em um processo inicial de tecido fibrovascular, invadindo a estrutura porosa superficial, seguido da deposição direta de osso. Esse acarbouço passivo também se comporta como um espaçador osteocondutor. O implante é biocompátível e não é capaz de osteoindução (LEONEL et al. 2003).

Foi o químico francês Charles Adolphe Würtz que, em 1848, descobriu que os grupos isocianatos reagem quantitativamente com os grupos hidroxilas primárias, dando origem a grupos uretanos. Essas reações, durante muitos anos (quase um século) permaneceram como simples experimentos de laboratório, até que em 1937, quando o alemão Dr. Otto Bayer conseguiu que o produto se impusesse na prática, levando o poliuretano à escala industrial (VILAR, 2005).

Figura 1 – Reação genérica de obtenção de poliuretano



Assim, o poliuretano é considerado um dos polímeros mais populares do mundo atual, com uma grande e crescente atuação no mercado nas mais diversificadas áreas. Sem falar nas propriedades fantásticas que se podem obter nesse material quando sintetizado a partir de óleo vegetal, ganhando a denominação de biomaterial devido às suas propriedades biocompatíveis e biodegradáveis (VILAR, 2005). O sucesso do biopolímero também é explicado pela compatibilidade que ele tem com o organismo humano (RAMALHO, 1998).

Trabalhos vêm demonstrando que esse polímero, quando implantado em falhas ósseas, pode receber no interior dos seus poros a invasão de vasos sangüíneos, o que promove o crescimento de células que vão recompondo o osso original em substituição ao polímero, ou seja, este vai sendo metabolizado e em seu lugar ocorre um crescimento ósseo (CARVALHO, 1997; ERENO, 2003; FRASCINO, 1998; IGNACIO, 1997; LEONEL, 2003; MARIA et al., 2001).

OHARA et al. (1995) estudaram experimentalmente a bio-compatibilidade da resina de mamona quando implantada intra-óssea e intra-articular no joelho de 15 coelhos, respectivamente na forma de corpos de prova com cálcio e em gel. Os animais foram sacrificados após os períodos de 3, 15 e 40 dias. O polímero derivado da poliuretana de mamona não causou reação inflamatória tardia da região sinovial quando implantada no espaço intra-articular, não sendo observado crescimento bacteriano nas culturas do líquido sinovial realizadas após 03 dias da implantação. Já a colocação da mamona intra-óssea evolui em três fases: a hemorrágica e de tecido de granulação aos 03 dias; a de reação conjuntiva fibrosa aos 15 dias; e a de ossificação aos 40 dias, sem que ocorresse a presença de células gigantes ou sinais de granuloma tipo corpo

estranho em nenhum caso.

VILARINHO et al (1996) realizou-se o estudo do comportamento dos tecidos da câmara anterior do olho, frente aos implantes de resina de poliuretana vegetal acrescida ou não de CaCO_3 em camundongos machos com 60 dias de idades, com a finalidade de verificar a sua biocompatibilidade, a possível reação inflamatória e a indução de ossificação pela presença ou não de carbonato de cálcio, através de estudo histológico. Os resultados mostraram que a resina de poliuretana vegetal é bem tolerada pelos tecidos da câmara anterior do olho, havendo uma reação inflamatória inicial que diminui com o passar do tempo. A reação dos tecidos foi semelhante em ambas as formulações e a presença de células multinucleadas pode propiciar a reabsorção do material que será muito lenta.

IGNÁCIO (1997) utilizou do cimento derivado do polímero de mamona no preenchimento de falhas ósseas de 2 cm em raios de coelhos. Os animais foram divididos em quatro grupos e sacrificados após 2, 4, 8 e 16 semanas de observação. Os resultados obtidos por meio de análises radiográfica, macroscópica e histológica indicaram que o processo de neoformação óssea foi gradual, progressivo e organizado, ocorrendo a partir das interfaces cimento/osso, proximal e distal, em direção à região central do material, iniciando-se por um processo inflamatório decorrente da agressão produzida pelo ato cirúrgico e que diminuiu paulatinamente. A formação fibroblástica foi substituída por lamelas ósseas ao longo do tempo, que praticamente uniram-se na região central do cimento do grupo de 16 semanas. Observou-se também, histologicamente, um neo-periosteio cobrindo o tecido ósseo neoformado. Os resultados evidenciaram que o material foi biocompatível e, além de não apresentar reação típica de corpo estranho, permitiu a osteocondução.

SOUZA, entre janeiro de 2000 e maio de 2002, operou 22 pacientes com lesões ósseas tumorais benignas agressivas e malignas. As cirurgias ocorreram no Serviço de Ortopedia Oncológica do Departamento de Cirurgia do Hospital de Câncer de Pernambuco. Todos os pacientes foram submetidos à ressecção femoral com critérios oncológicos e, no mesmo ato cirúrgico, reconstruídos com biomaterial à base do polímero da mamona em forma de blocos pré-fabricados. De acordo com a avaliação funcional e considerando os pacientes na sua totalidade, após seguimento mínimo de 26 e máximo de 147 semanas, obteve-se 7 (35%) resultados excelente, 4 (20%) bons, 4 (20%)

regulares e 5 (25%) falhas. Se, no entanto, considerar-se apenas os casos de tumores ao nível do joelho, que correspondem a 19 (95%), constata-se 6 (31,6%) resultados excelentes, 4 (21%) bons, 4 (21%) regulares e 5 (26,3%) falhas. Considerando-se apenas os oitos casos benignos agressivos, obteve-se três (37,5%) avaliados como excelentes e três (37,5%) bons. Um paciente foi avaliado regular (12,5%) e um como falha total (12,5%). Baseado nos resultados clínicos obtidos a curto e médio prazos e, comparando-os com outros encontrados na literatura, considerou o polímero da mamona como uma alternativa viável para reconstrução de falhas ósseas pós ressecção de tumores benignos agressivos e malignos.

IGNÁCIO et al. (2002) realizaram um estudo experimental em cães, onde foi utilizada a poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falhas ósseas. Com isso, puderam concluir que tal material se apresenta biocompatível com os tecidos, mas comportou-se como um espaçador biológico, preenchendo a cavidade, mas sem osteointegração.

MARIA et al (2004) estudaram a poliuretana da mamona em defeitos produzidos experimentalmente na porção proximal medial da tíbia de cães normais em fase de crescimento. Utilizaram nesse experimento, 12 cães, subdivididos aleatoriamente em 3 grupos com mesmo número de animais, utilizando o mesmo tratamento, mas com análise histopatológica aos 30 (GI), 60 (GII) e 90 (GIII) dias. A avaliação clínica demonstrou não ter havido rejeição do implante.

SARAN (2006) analisou da interface entre o implante derivado do polímero da mamona com o canal medular ósseo, em 44 coelhos da linhagem Nova Zelândia albinos, divididos em dois grupos, sendo o Grupo I, composto por 12 animais controle, cujas fresagens do canal medular foram produzidas bilateralmente nas tíbias e não preenchidas, o Grupo 2, com 30 animais, cujos canais medulares da tíbia, após fresagem, foram preenchidos bilateralmente com os cilindros derivados da poliuretana da mamona. Os 30 animais foram divididos aleatoriamente em 3 subgrupos experimentais (G2a, G2b e G2c) de 10 animais, conforme as datas de eutanásia pre-determinadas em 90, 120, 150 dias após o ato operatório. Decorridos os períodos programados, os animais foram eutanasiados, as peças removidas e submetidas ao processamento histológico. A análise histológica foi realizada, mostrando que o polímero é biocompatível, osteoindutor e osteocondutor.

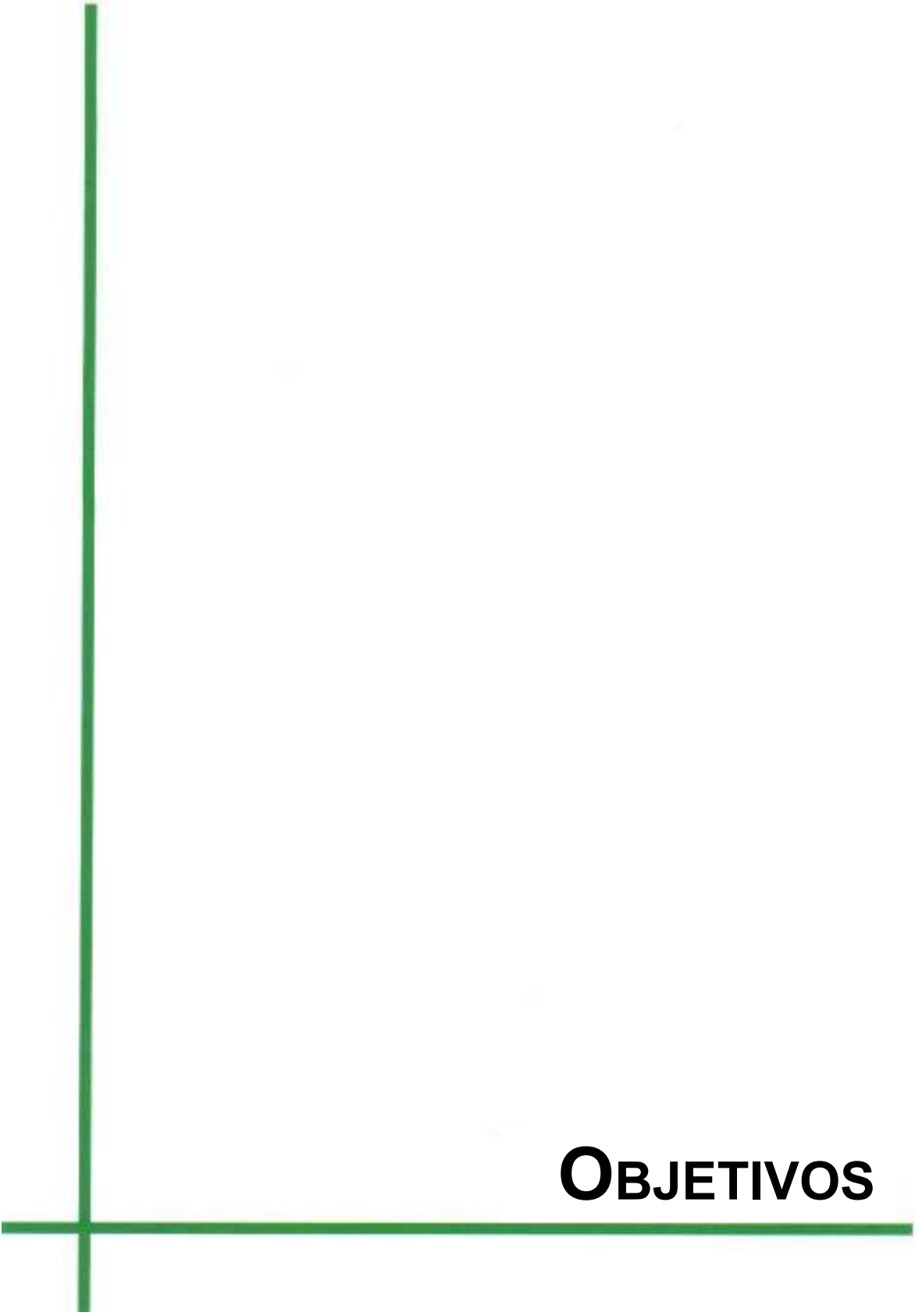
DIAS (2007) avaliou histologicamente a reação dos tecidos circunjacentes ao implante de membrana de polímero de mamona. Foram utilizados 4 macacos prego (*Cebus apella*) com peso médio de 2 kg e idade entre 7 e 8 anos. Foram realizadas fraturas dos ossos nasais dos animais, que receberam, no ferimento cirúrgico, o implante pré-confeccionado do polímero de mamona. Após período de 270 dias, os animais foram sacrificados e os espécimes processados e corados com Hematoxilina e Eosina, Tricrômio de Masson, e Picro Sirius. Na análise histológica, não foi observada reação tipo corpo estranho e foi encontrada progressiva formação e maturação óssea, concluindo que a membrana do polímero foi biocompatível.

LAUREANO (2007) analisou histologicamente o efeito de uma matriz óssea desmineralizada de origem humana e de uma resina poliuretana derivada do óleo da mamona sobre o processo de reparação óssea. Foram utilizados 24 coelhos e em cada calvária foram preparadas duas cavidades cirúrgicas, sendo uma do lado direito e a outra do lado esquerdo da sutura parietal. Os animais foram divididos em dois grupos. No grupo I, a cavidade experimental (lado direito) foi preenchida com a matriz óssea desmineralizada de origem humana, enquanto no grupo II a cavidade experimental foi preenchida com a poliuretana derivada do óleo de mamona. As cavidades de controle foram preenchidas apenas com o sangue do animal. Os animais foram sacrificados nos períodos pós-operatórios de 4, 7 e 15 semanas. A análise histológica revelou que tanto o grupo controle quanto os grupos I e II apresentaram um aumento na neoformação óssea ao longo do tempo, sendo que esta reparação se deu mais rapidamente no grupo controle, mesmo mostrando diminuição importante na espessura. Ambos os materiais apresentaram-se biocompatíveis, sendo a poliuretana reabsorvida mais tardiamente e considerada de melhor resultado em relação ao outro material empregado.

FRAZÍLIO (2007) realizou um estudo morfológico comparativo do implante do polímero de mamona e enxerto ósseo autógeno em articulação de cães, com o intuito de verificar a viabilidade de uma técnica alternativa na correção cirúrgica da luxação medial de patela. Métodos: Dezesseis cães adultos foram distribuídos em dois grupos de oito animais. Os animais foram subdivididos em dois subgrupos com quatro animais em cada um, conforme a avaliação de 30 e 90 dias, sendo chamados GI-30, GI-90, GII-30 e GII-90. No grupo I (poliuretana) - foi feito o aprofundamento da tróclea femoral direita com implante da prótese de polímero de mamona, que foi comparado com o

grupo II (controle) - em que se realizou o aprofundamento da tróclea femoral esquerda com o implante de enxerto ósseo cartilaginoso autógeno. Os animais foram sacrificados após 30 e 90 dias e as peças anatômicas foram avaliadas macro e microscopicamente. Resultados: Não foi observada osteointegração no grupo polímero de mamona. Houve reabsorção do enxerto ao longo do período experimental e ausência de células inflamatórias nos períodos analisados. Conclusão: Os resultados mostraram que o polímero de mamona auxiliou no processo cicatricial, permanecendo biotolerante, porém sem osteointegração, podendo ser usado em articulações sendo uma alternativa para o preenchimento ósseo.

A literatura mostra comportamentos diferentes desse biomaterial em cirurgias experimentais com animais, incentivando a idéia de testar seus resultados, uma vez que o mesmo já é utilizado nas áreas médica e odontológica.

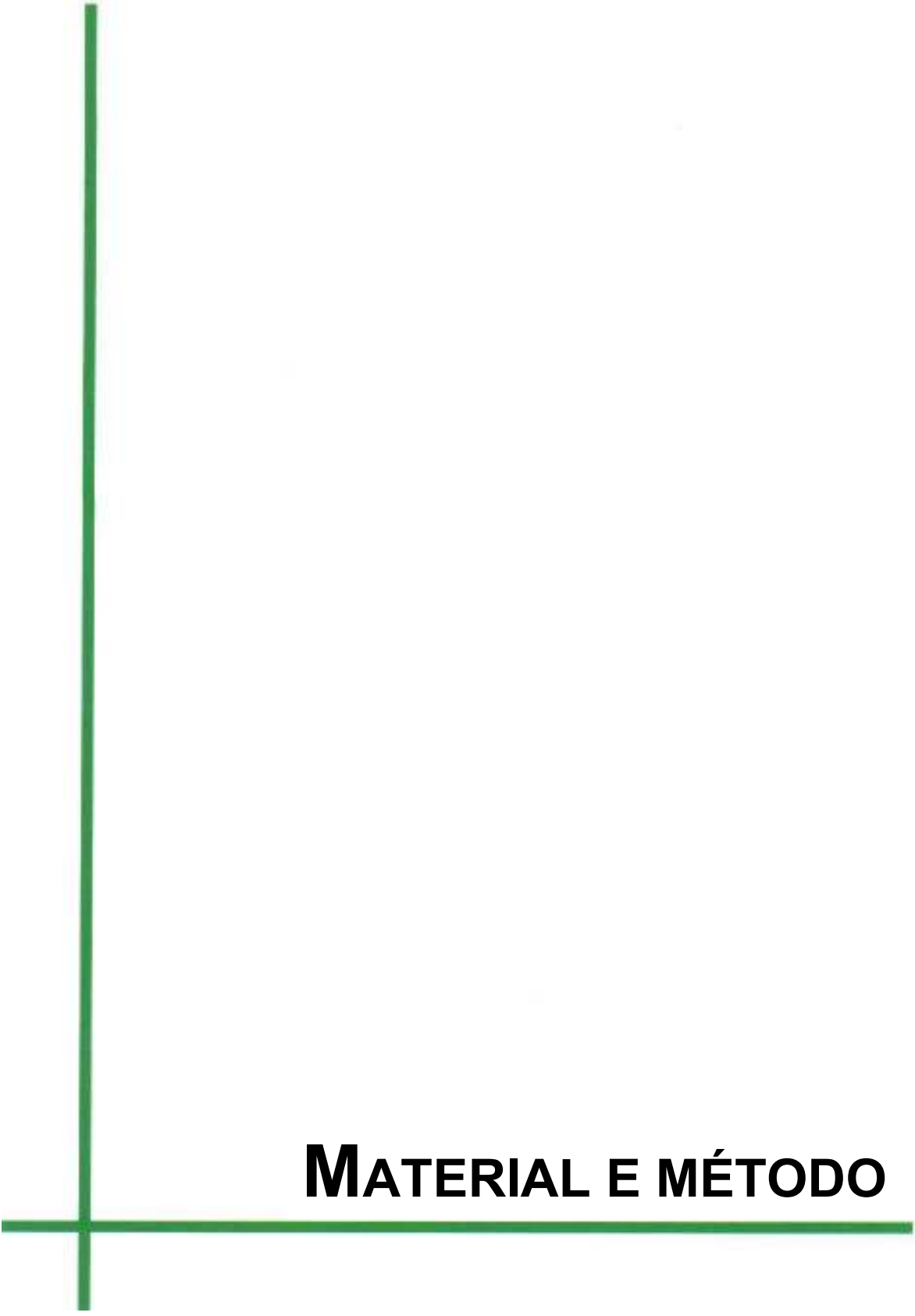


OBJETIVOS

3- Objetivos

O objetivo deste trabalho foi a de realizar um estudo avaliando:

- 1- O polímero de mamona em sua forma pré-fabricada com 30% de CaCO_3 em sua composição e comprovar suas características biocomportamentais.
- 2- A reação dos tecidos conjuntivo e osteóide ante a utilização do referido biomaterial.
- 3- A acomodação do tecido muscular frente ao polímero de mamona.



MATERIAL E MÉTODO

4- MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi previamente analisado e aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

O estudo experimental animal foi realizado no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP no período compreendido entre 18 de setembro de 2007 a 22 de outubro de 2009.

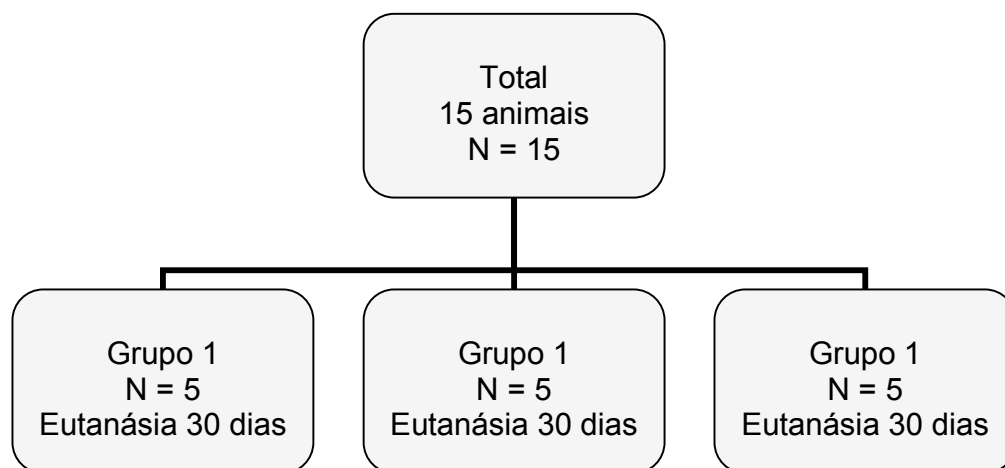
Para o estudo foram utilizados quinze ratos machos Wistar SPF, com oito meses de idade e peso médio entre 400 e 500 g.

Os animais foram mantidos, antes e durante o período experimental, em biotério adequado, dentro de gaiolas individuais de 30 x 50 cm de tamanho, recebendo alimentação sólida com ração apropriada e água *ad libitum*.

O biotério apresentava manutenção controlada das condições ambientais, como umidade relativa do ar, nível de ruído, temperatura média e iluminação.

Os 15 animais foram subdivididos em três grupos compostos de cinco animais, denominados de grupos G1, G2 e G3, esquematizados na tabela abaixo.

Tabela 2: Grupo experimental



O peso animal mediano e peso de grupo mediano foram relacionados conforme abaixo:

Tabela 3- Controle de peso dos animais

Grupos	G1	G2	G3
Nº de ratos	5	5	5
Mínimo	0,476 Kg	0,451 Kg	0,459 Kg
Máximo	0,649 Kg	0,584 Kg	0,579 Kg
Média	0,562 Kg	0,517 Kg	0,519 Kg

Todos os animais do experimento receberam o bloco de polímero vegetal derivado do óleo de mamona, com dimensões padronizadas de 10 x 5 x 1 mm, como material aposicional em região de fêmur direito.

Foram utilizados para a fixação do polímero nos fêmures dos animais, micro-parafusos de titânio de 1,5 x 8,0 mm, com suporte de uma chave de fenda cruciforme.

Os períodos de avaliação foram trinta, quarenta e cinco e sessenta dias pós-operatórios, respectivamente para os grupos G1, G2 e G3.

O polímero de mamona foi gentilmente cedido pela empresa Poliquil - Araraquara, SP.

O material em questão sofreu processo de esterilização por gás de óxido de etileno pela empresa Sterileno - Sorocaba, SP.

4.1- Animais e Anestesia

Para a viabilização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à anestesia geral, com administração intraperitoneal de medicação anestésica de cloridrato de ketamina, na dose de 0,9 ml/kg, em associação com cloridrato xilazina (sedativo-analgésico) na dose de 0,5 ml/kg, produzindo uma anestesia dissociativa e cataléptica.



Figura 2 – Anestesia intra-peritoneal

Aguardado um período aproximado de 10 minutos, os animais já estavam em condições de se submeter ao procedimento cirúrgico.

Foram então posicionados dorsalmente na mesa operatória, sofreram tricotomia na região de acesso em região femoral, realizando-se antissepsia com polivinilpirrolidona iodo (PVPI tópico) e então foram cobertos com campo fenestrado.

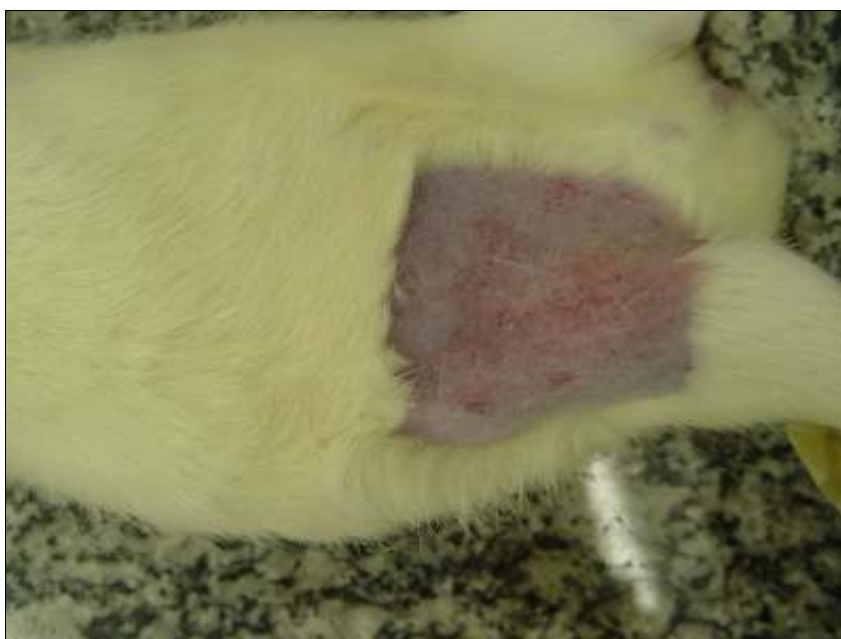


Figura 3- Tricotomia da região a ser operada



Figura 4- Antissepsia local com PVPI.

4.2- Técnica Cirúrgica

Após isso, realizou-se uma incisão inicial linear de aproximadamente 3 cm na pele do animal, na região do fêmur, com lâmina de bisturi nº 15.



Figura 5- Isolamento do campo e incisão linear de acesso.

Em seguida, nova incisão realizada em região muscular, seguida de divulsão.



Figura 6 – Incisão em região muscular.

Com o auxílio de um descolador de Freer, foi feita uma cuidadosa dissecação, expondo a superfície óssea. Utilizando-se broca 1,5 mm, em motor de baixa rotação e abundante irrigação com solução salina, foi realizada uma perfuração, transfixando o fêmur, onde será fixado o bloco de polímero de mamona.

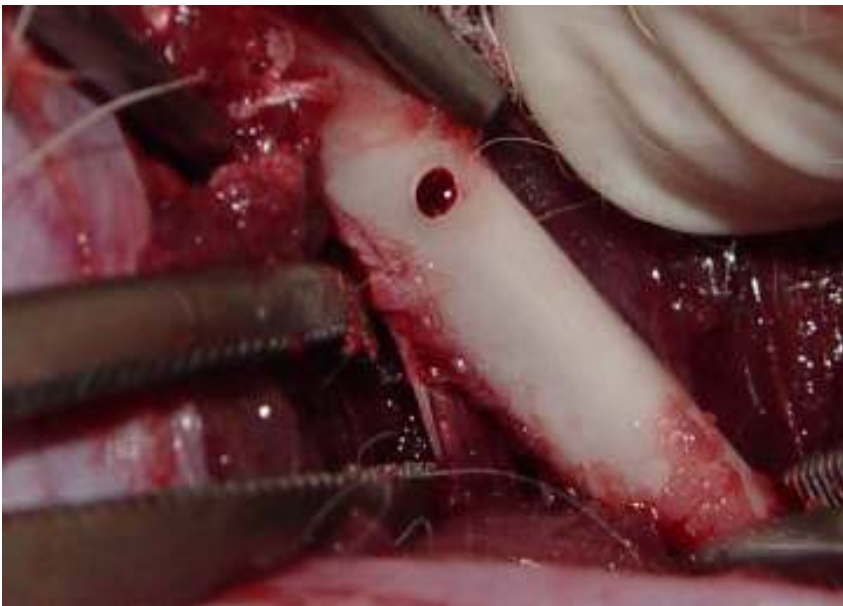


Figura 7 – Exposição e perfuração do fêmur.

Com uma broca esférica nº 8, em motor de baixa rotação e irrigação abundante com solução salina, foi removido parcialmente o osso cortical, proporcionando um leito para a acomodação do polímero.



Figura 8 – Decorticação do fêmur.

O polímero foi implantado e fixado com um micro-parafuso de 8,0 x 1,5 mm.

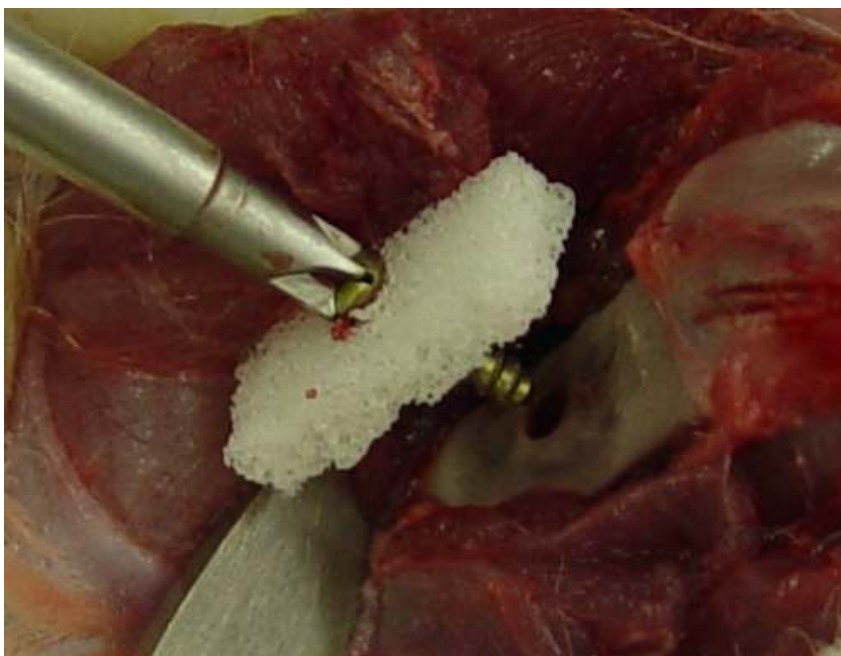


Figura 9 – Instalação do polímero com micro-parafuso de titânio montado em chave de fenda cruciforme.

Após verificada a adequada acomodação e estabilidade do material, procedeu-se os procedimentos de suturas.



Figura 10 – Fixação do polímero de mamona no fêmur.

A sutura foi iniciada pelo tecido muscular com fio bioabsorvível categut simples 4-0 e, posteriormente, a pele com fio de seda 3-0.



Figura 11 – Suturas do plano profundo realizadas.



Figura 12 – Suturas finalizadas.

Não foi realizado qualquer tipo de imobilização interna ou externa. No pós-operatório e utilizou-se, como profilaxia a infecções, Ampicilina sódica numa dose de 1ml/kg por via IM, imediatamente após o procedimento cirúrgico .

4.3- Período de Proservação

Os animais dos três grupos, G1, G2 e G3, foram preservados respectivamente por trinta, quarenta e cinco e sessenta dias, isolados em gaiolas individuais e alimentados com ração sólida água *ad libidum*.

4.4- Preparo das Peças Anatômicas

A eutanásia ocorreu por super-dosagem de anestésico geral ketamina em associação com xilazina (ambas três vezes superior a dose indicada), levando a uma parada cardíaco-respiratória. Um total de cinco animais de cada grupo foram sacrificados em cada período pré-estabelecido. As áreas operadas foram expostas e examinadas atentamente para avaliação de sinais macroscópicos de inflamação e/ou infecção. As

peças foram manipuladas e removidas cuidadosamente por meio de ostectomia com brocas laminadas tronco-cônicas nº 701 em baixa rotação, irrigadas abundantemente com solução salina, mantendo distância de 10 mm das bordas do polímero.



Figura 13 – Exposição da peça anatômica para remoção.

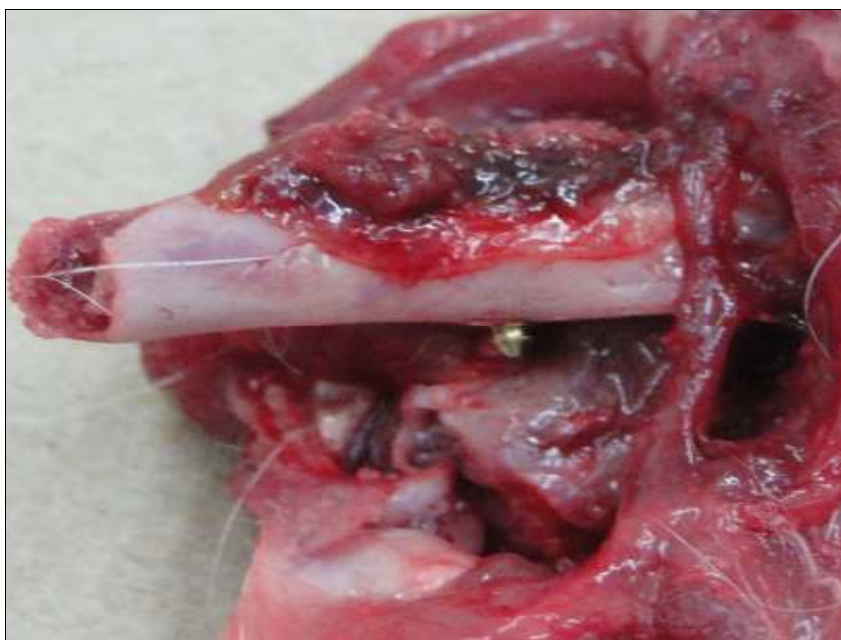


Figura 14 – Peça anatômica removida.

4.5- Fixação das Peças anatômicas

Após a remoção das peças, as mesmas foram colocadas em solução de Formol 10%. De um total de quinze peças obtidas, todas foram processadas para análise histológica.

Foram utilizados os seguintes critérios para a análise histológica:

- 800 ml água destilada
- 200 ml ácido clorídrico
- 10 g tártaro de sódio
- 15 g tártaro de sódio e potássio
- Tempo de descalcificação: 48h

Após esse procedimento, os fragmentos foram encapsulados e seguiram para processamento conforme protocolo estabelecido, utilizando-se:

- Coloração de hematoxilina e eosina:
- Estufa
- Desparafinização – xilol I, II e III
- Desparafinização – álcool I, II e III
- Coloração – hematoxilina (1 minuto 30 segundos) – eosina (5 segundos)
- (lavar em água corrente por 5 minutos)
- Desidratação (apenas lavagem) e passagem por alcoóis I, II, III, IV e V
- Diafanização – xilol I e II
- Montagem com resina e lamínula.

4.6- Descalcificação e Diafanização

O processo de descalcificação consiste na remoção do cálcio tecidual, sem alterações nas estruturas celulares .

No total, quinze peças foram submetidas ao processo de descalcificação. Após a descalcificação, as peças foram preparadas para a inclusão. Primeiramente foi feita a desidratação, que consiste na retirada do conteúdo aquoso do interior das células. Em seguida, foi realizada a diafanização, que tem por finalidade preencher os espaços anteriormente ocupados por água e permitir a penetração da parafina em todos os interstícios do tecido.

4.7- Inclusão e Corte

A partir desse momento, as peças foram incluídas em parafina (60° C).

Uma vez preparados os blocos de parafina foram submetidos a cortes em micrótomo, na espessura de cinco micrômetros, e estendidos em banho-maria a 45° C; em seguida foram colocados nas lamínulas, e estas, por sua vez, foram colocadas em estufa para secagem.

4.8- Processo de Coloração

Os cortes foram submetidos aos processos de coloração com HE.

4.8.1- Técnica de coloração com Hematoxilina e Eosina

O procedimento de coloração consiste na limpeza das lâminas por meio de sua imersão em xilol (I) por quinze minutos e em xilol (II) por quinze minutos. Prossegue-se por passagens sucessivas em álcool 100%, álcool 95% e álcool 70%, intercalando cada banho com lavagem em água corrente por cinco minutos. Após cada imersão, removem-se os excessos das substâncias envolvidas apenas escorrendo-as.

Após o banho nessas soluções, é feita a coloração em hematoxilina de Harris por quatro minutos, seguida de nova lavagem em água corrente por sete minutos para remoção dos excessos do corante. Na sequência, é feita a imersão em Eosina por um

minuto e lavagem em água corrente para remoção dos excessos.

Segue-se com imersões rápidas em álcool 95% (duas vezes), álcool 100% (duas vezes), xilol I e II (quinze minutos em cada solução) e, finalmente, imersão em solução de xilol III, até a montagem das lamínulas utilizando-se Permount.

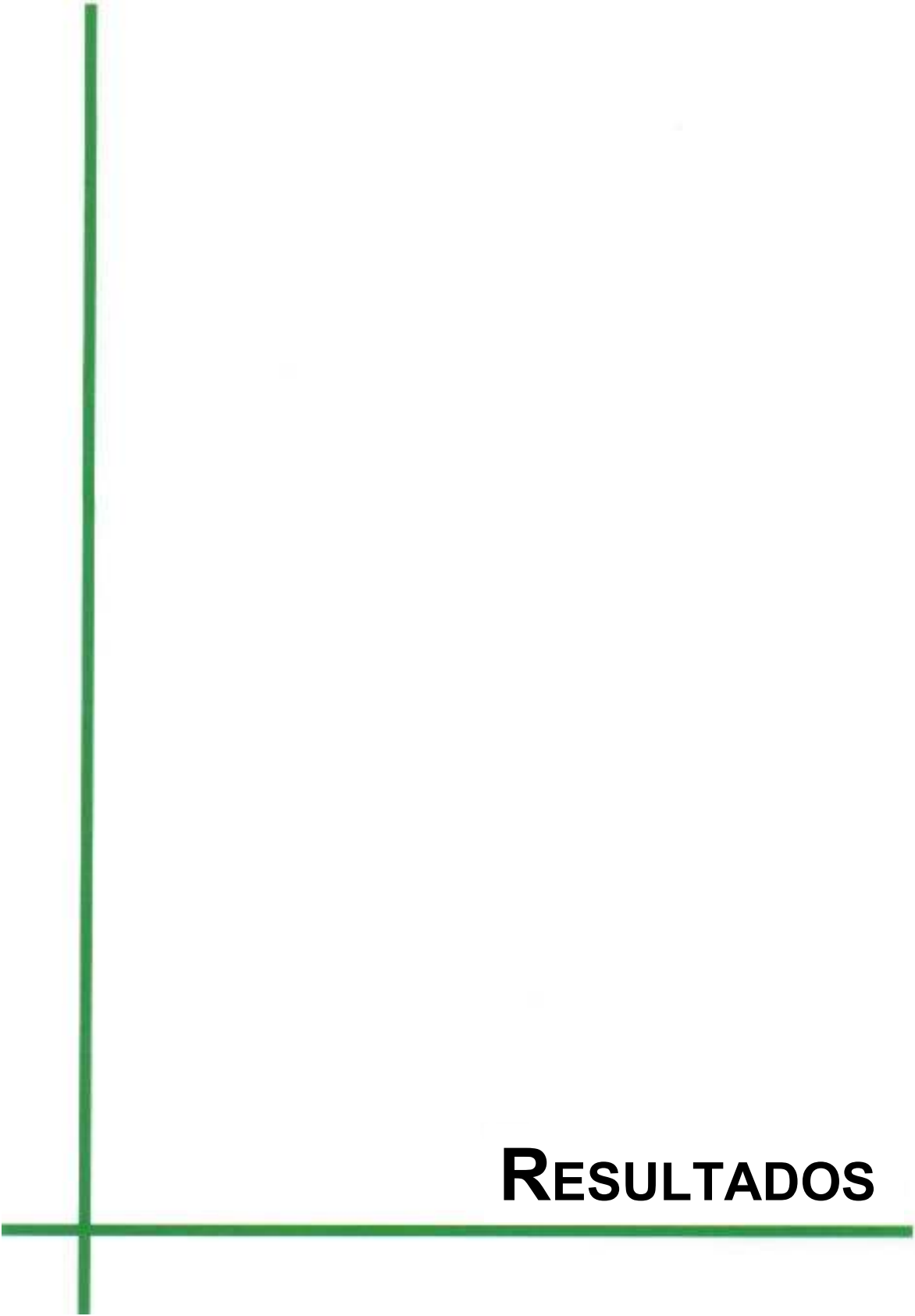
4.9- Análise histológica

A análise histológica à microscopia óptica foi realizada empregando-se um microscópio Olympus BX50.

A análise foi realizada comparando-se os três grupos utilizados no experimento, expostas em resultados.

4.10. ESTATÍSTICA.

Para análise dos dados, foi utilizado o software Medcalc versão 12.1 (Medcalc, Mariakerke, Bélgica). As variáveis analisadas foram infiltrado hemorrágico, infiltrado inflamatório e formação de tecido osteo-condróide. Os valores $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes, desconsiderando-se a hipótese nula (H_0).



RESULTADOS

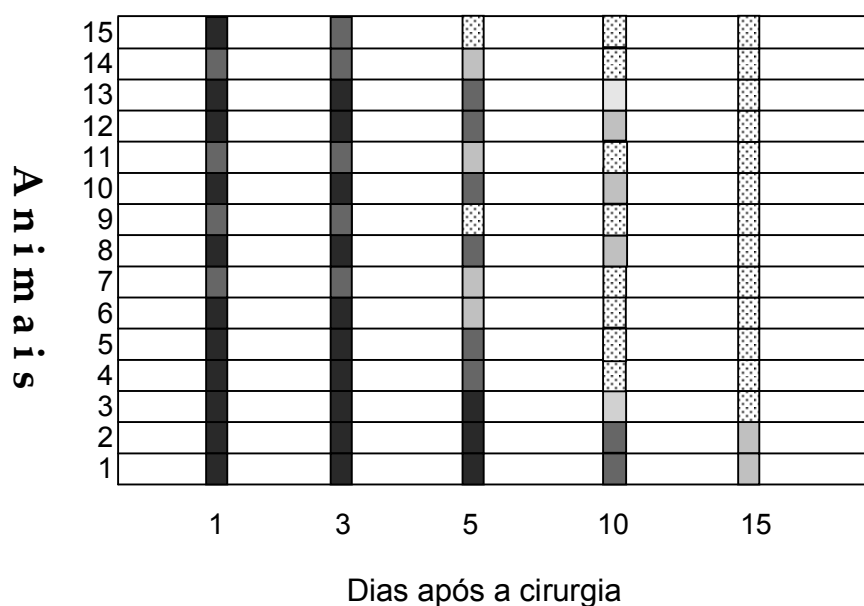
5- Resultados

5.1- Avaliação clínica dos animais

Os animais foram avaliados inicialmente com relação ao grau de claudicação, do 1º ao 15º dias pós-operatório. Foram avaliados em 4 graus, de acordo com Braden & Brinker, para acompanhar a recuperação clínica do membro inferior.

No 1º dia pós-operatório, 73% dos animais não usavam nem apoiavam o membro e, ao 15º dia, 80% deles já usava o membro operado naturalmente, de acordo com a tabela abaixo:

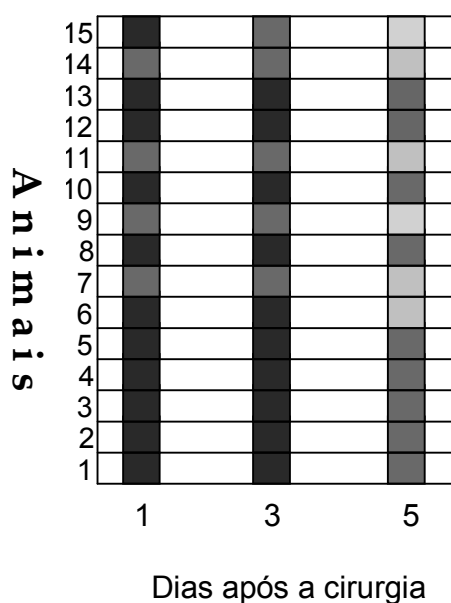
Tabela 4: Avaliação do grau claudicação (Braden & Brinker)



- Não usa nem apóia o membro.
- Pouco funcional. Apóia o membro quando parado, eleva quando corre. Não sustenta o peso do corpo.
- Uso funcional do membro. Sustenta parcialmente o peso do corpo.
- Membro normal, sem alterações. Caminha e corre e sustenta o peso corporal.

Também foi realizada uma avaliação do edema pós-operatório do membro inferior, do 1º ao 5º dias de preservação, conforme abaixo:

Tabela 5 – Avaliação do edema pós-operatório



- Edema pós-operatório importante.
- Edema pós-operatório discreto.
- Edema pós-operatório desprezível

5.2- Avaliação macroscópica

Ao exame dos três grupos, foi possível identificar a região da acomodação do polímero em todos os animais.

Foi observada a presença de tecido fibroso envolvendo a peça implantada e a quantidade deste tecido diminuiu com o tempo de avaliação. Não houve formação de aderências ao tecido muscular adjacente.

O polímero, em todos os animais, encontrava-se na posição de implantação.

5.2.1- Grupo G1 (30 dias)



Figura 15 – Peça anatômica para processo de descalcificação grupo G1 (30 dias).



Figura 16 – Peça anatômica em cortes grupo G1 (30 dias).

5.2.2- Grupo G2 (45 dias)



Figura 17 – Peça anatômica para processo de descalcificação grupo G2 (45 dias).



Figura 18 – Peça anatômica em cortes grupo G2 (45 dias).

5.2.3- Grupo G3 (60 dias)

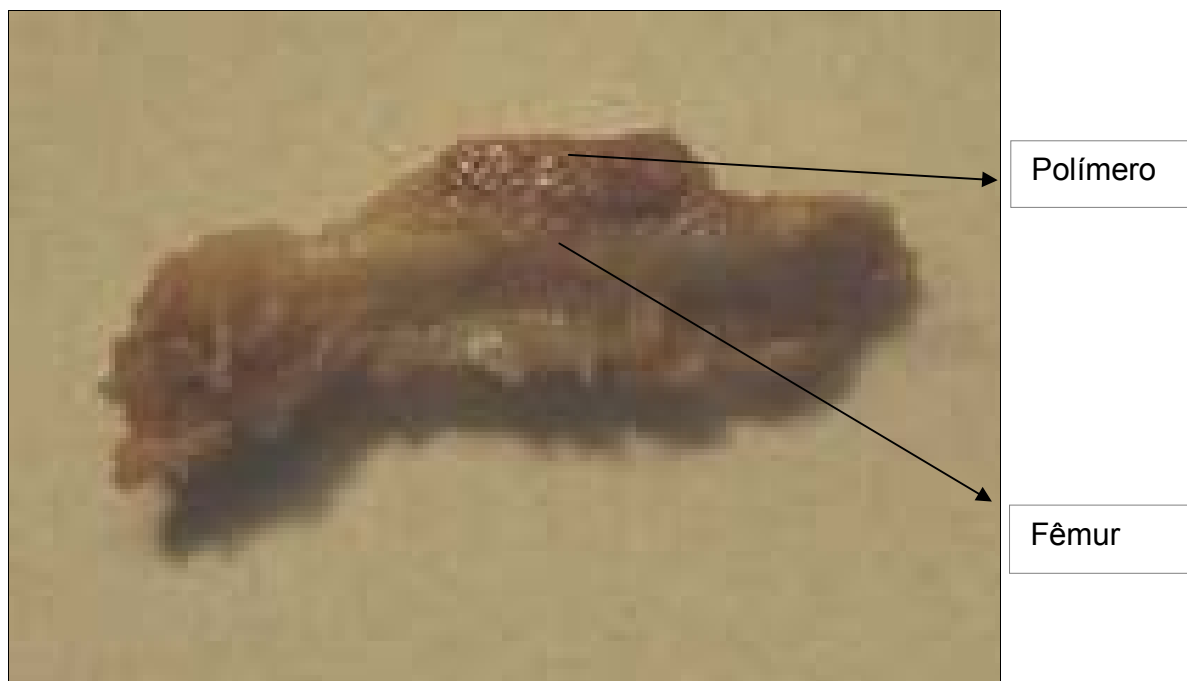


Figura 19 – Peça anatômica para processo de descalcificação grupo G3 (60 dias).



Figura 20 – Peça anatômica em cortes grupo G3 (60 dias).

5.3- Avaliação microscópica

A intenção é avaliar a proliferação de tecido conjuntivo e osteo-condróide na interface osso-polímero.

5.3.1- Grupo 30 dias

Observou-se atividade osteogênica, com discreta penetração de tecido conjuntivo na peça implantada em todos os animais.

Não se observou a presença de células osteóides nesse grupo de animais.

Notou-se, porém, presença de tecido conjuntivo denso ao redor do polímero, sem associação com células inflamatórias. Esse tecido era contínuo com o tecido ósseo receptor, notando-se a presença de fibras colágenas neoformadas, fibroblastos, capilares sangüíneos e alguns macrófagos em todos os animais desse grupo.

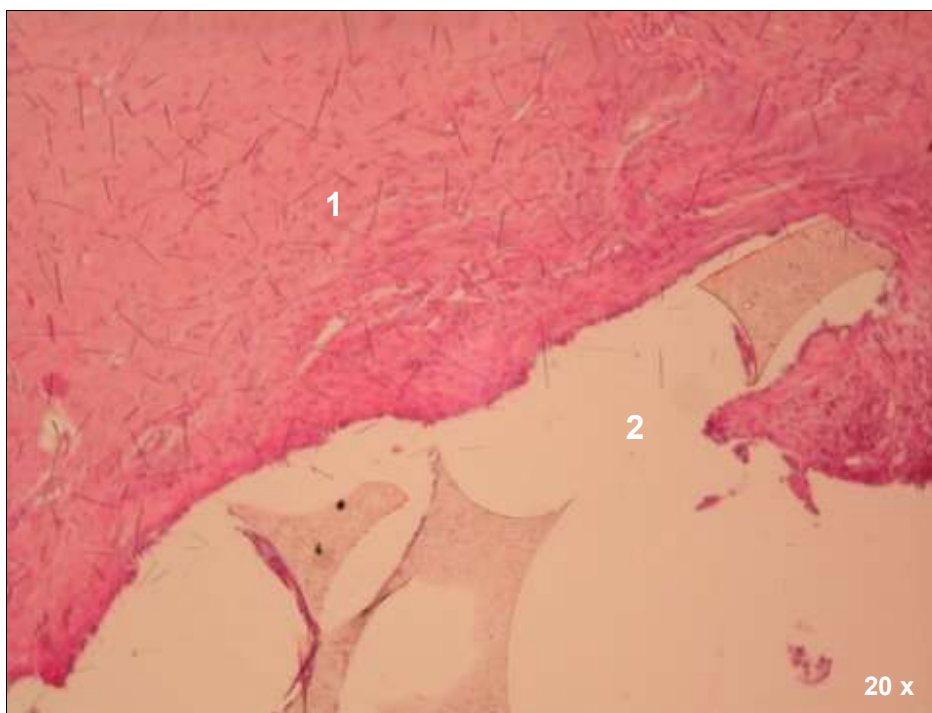


Figura 21 – Histologia grupo G1 (30 dias) – Imagem 1

Nota-se proliferação de tecido conjuntivo (1) circundando os poros do polímero de mamona (2).

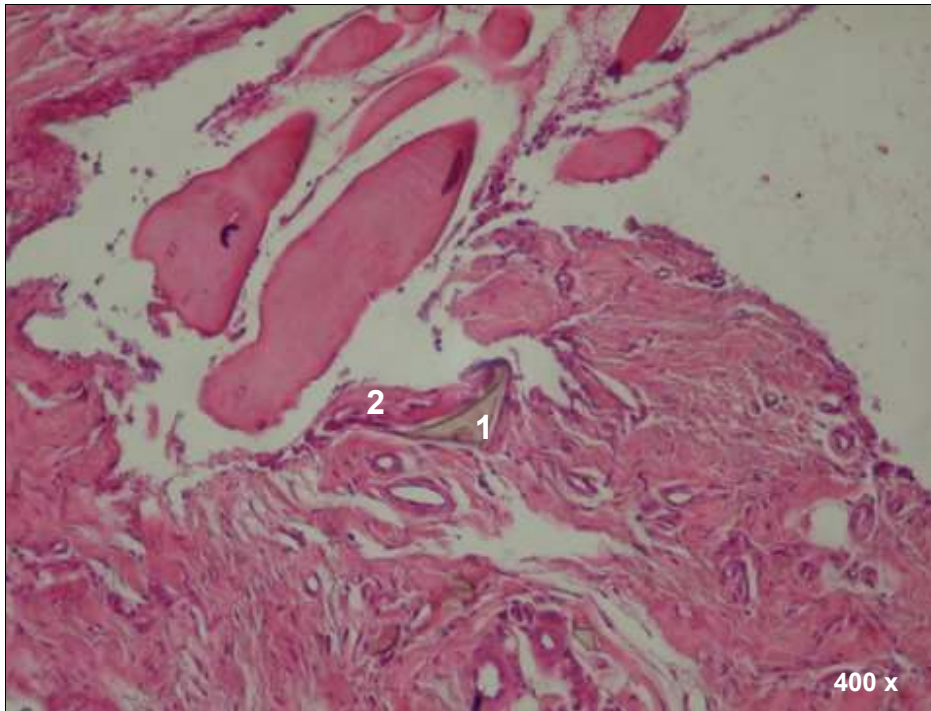


Figura 22 – Histologia grupo G1 (30 dias) – Imagem 2

É possível observar a proliferação de tecido conjuntivo (2) ao redor de fragmento polímero de mamona (1).

5.3.2- Grupo 45 dias

O polímero estava íntegro nos animais deste grupo. Apresentava-se com poros de vários tamanhos, envolto por tecido fibroso, com infiltrado inflamatório moderado, sem indícios de reabsorção. Em alguns animais, entre o tecido ósseo e o material implantado foi observada moderada faixa de tecido conjuntivo, exibindo feixes de fibras colágenas e crescimento ósseo imaturo.

Observada discreta invaginação de células osteoblásticas pelos poros do implante. Houve presença de tecido conjuntivo, neovascularização e células gigantes multinucleadas.

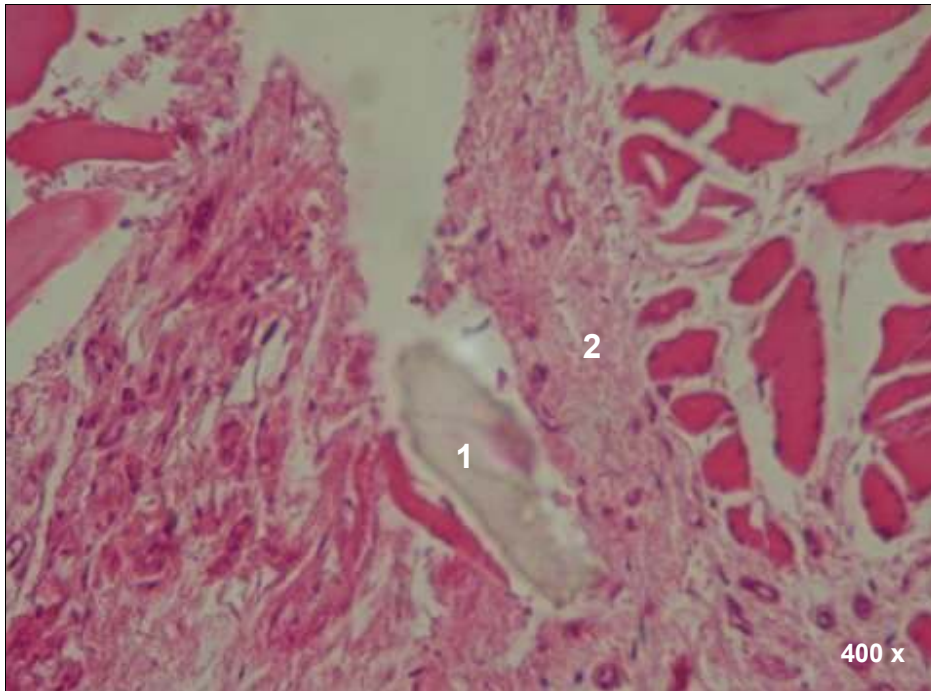


Figura 23 – Histologia grupo G2 (45 dias) – Imagem 1
Proliferação de tecido conjuntivo (2) ao redor de fragmento polímero (1).

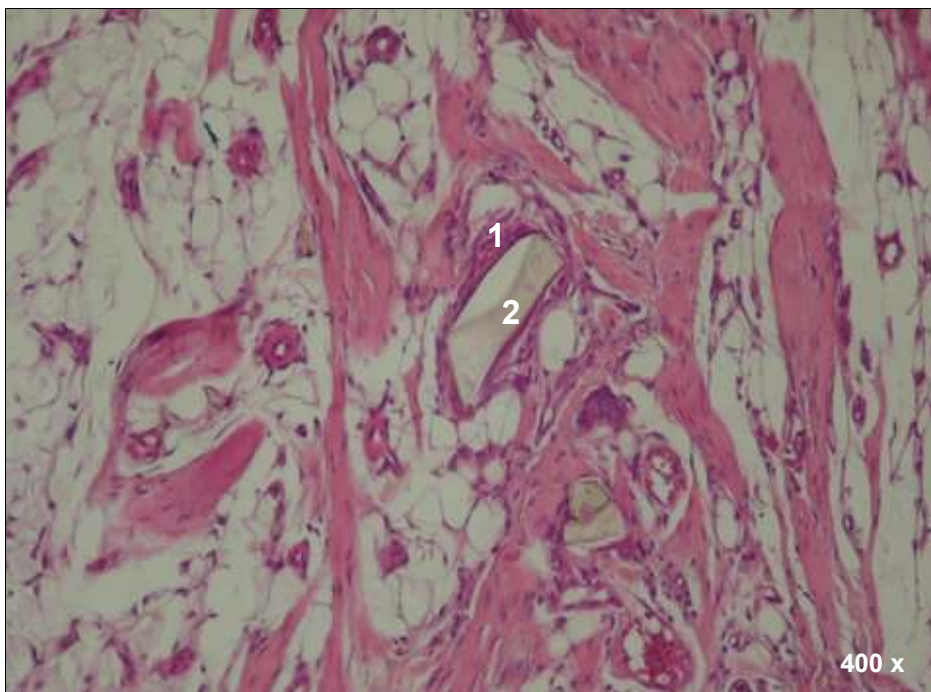


Figura 24 – Histologia grupo G2 (45 dias) – Imagem 2
É possível observar a proliferação de tecido conjuntivo (1) ao redor de fragmento polímero de mamona (2).

5.3.3- Grupo 60 dias

Nesse grupo observou-se progressão da proliferação de células osteocondróides na interface entre osso e polímero implantado, principalmente a partir dos fragmentos receptores.

Notamos a existência de extensas áreas apresentando tecido conjuntivo neoformado que permeia a musculatura de modo não uniforme, predominantemente com interface bem delimitada entre o tecido muscular e o tecido ósseo neoformado. Foram observados pontos de calcificação na superfície e interior do polímero, nos cortes longitudinais superficiais. De permeio ao tecido conjuntivo, notamos material focal, amarelado bi-refringente, espiculado, (resquícios do polímero).

Observamos também nítida ossificação endocondral a partir do tecido conjuntivo em certas áreas, com presença de neoformação de matriz condróide e osteóide. Não foi observada reação inflamatória na área do implante, porém foram notados sinais de degradação parcial do polímero. Observou-se o envolvimento do polímero por tecido fibroso, com preenchimento dos poros superficiais por tecido fibroso e ósseo e a presença de neovascularização partindo do próprio osso. Em algumas áreas, o polímero tinha aspecto poroso, com poros largos, permeado por tecido conjuntivo. Não havia granulomas de corpo estranho. Tecido fibroso maduro foi observado em algumas áreas em quantidade leve a moderada. Colônias bacterianas não foram observadas.

Macrófagos foram encontrados em todos os períodos analisados juntamente com fragmentos do polímero de mamona, sendo estas células úteis na degradação do material implantado e relacionadas com a fibroplasia e neo-angiogênese. Isto ocorre porque os macrófagos são capazes de liberar substâncias que fazem com que células mesenquimais se acumulem e proliferem no local do defeito.

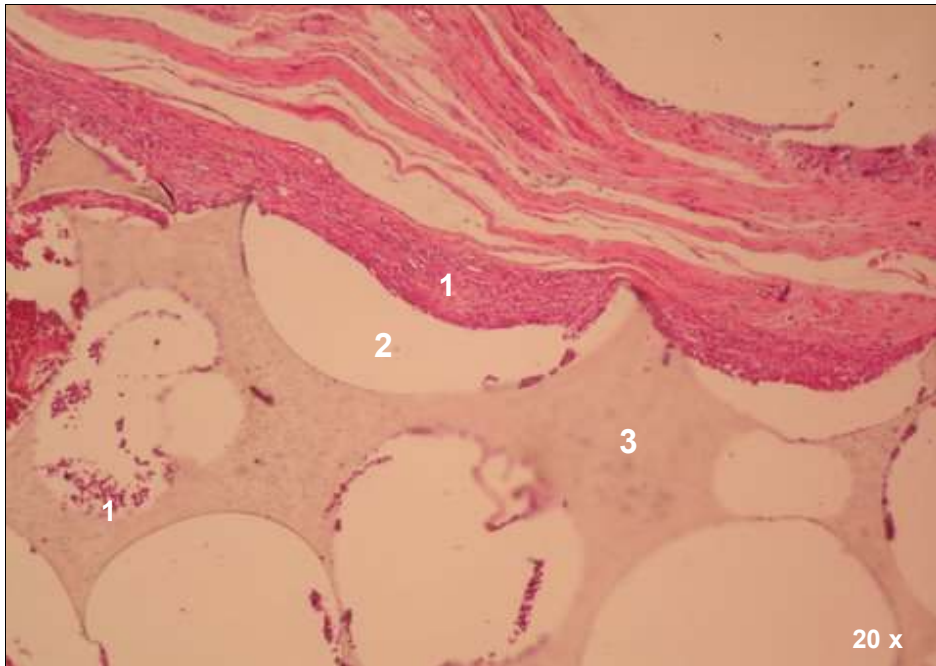


Figura 25 – Histologia grupo G3 (60 dias) – Imagem 1

Nota-se a proliferação e invaginação de tecido conjuntivo (1) por entre os poros (2) delimitado pelo polímero de mamona (3).

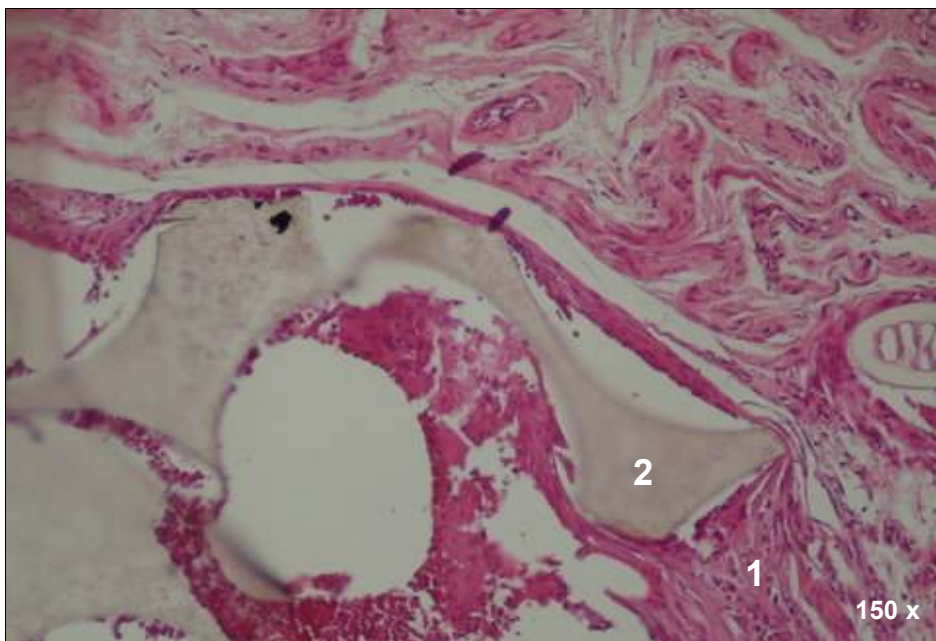


Figura 26 – Histologia grupo G3 (60 dias) – Imagem 2

É possível observar a proliferação de tecido conjuntivo (1) justaposto às trabéculas do polímero de mamona (2).

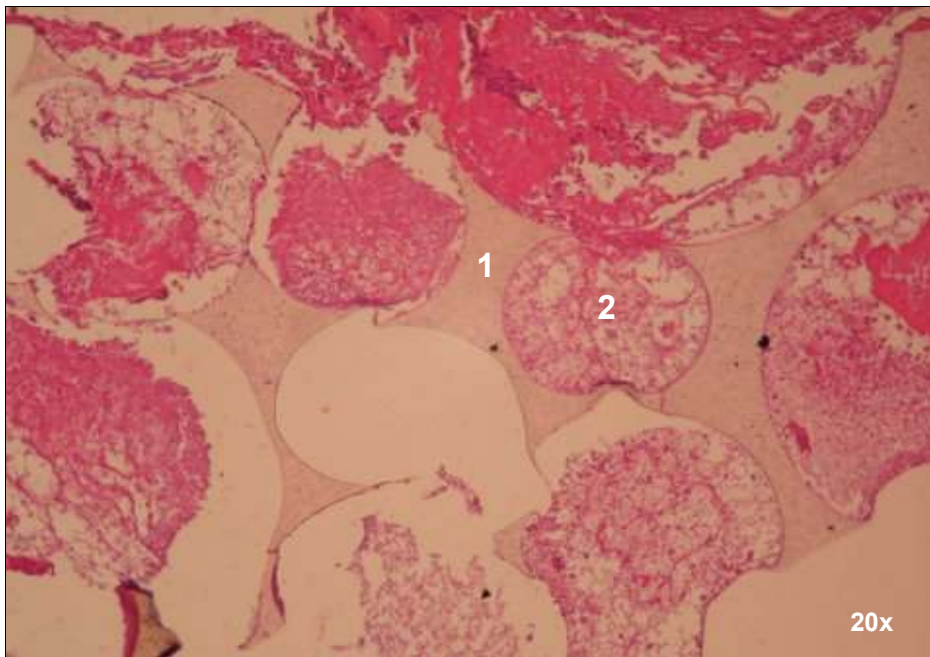


Figura 27 – Histologia grupo G3 (60 dias) – Imagem 3

É possível observar a proliferação de tecido conjuntivo (2) no interior do trabeculado protético do polímero de mamona (1).

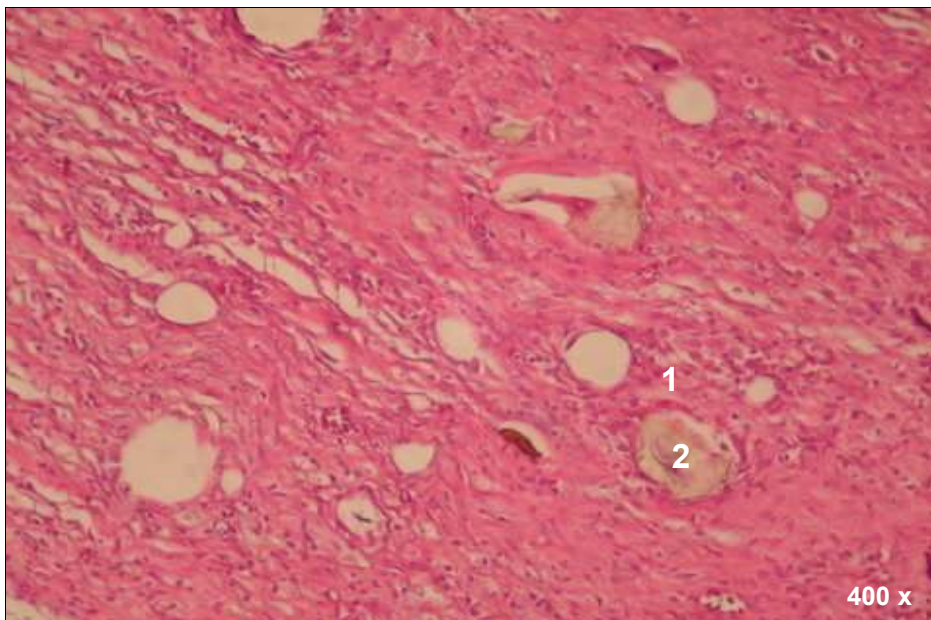


Figura 28 – Histologia grupo G3 (60 dias) – Imagem 4

É possível observar a proliferação de tecido conjuntivo (1) englobando completamente o fragmento do polímero de mamona (2).

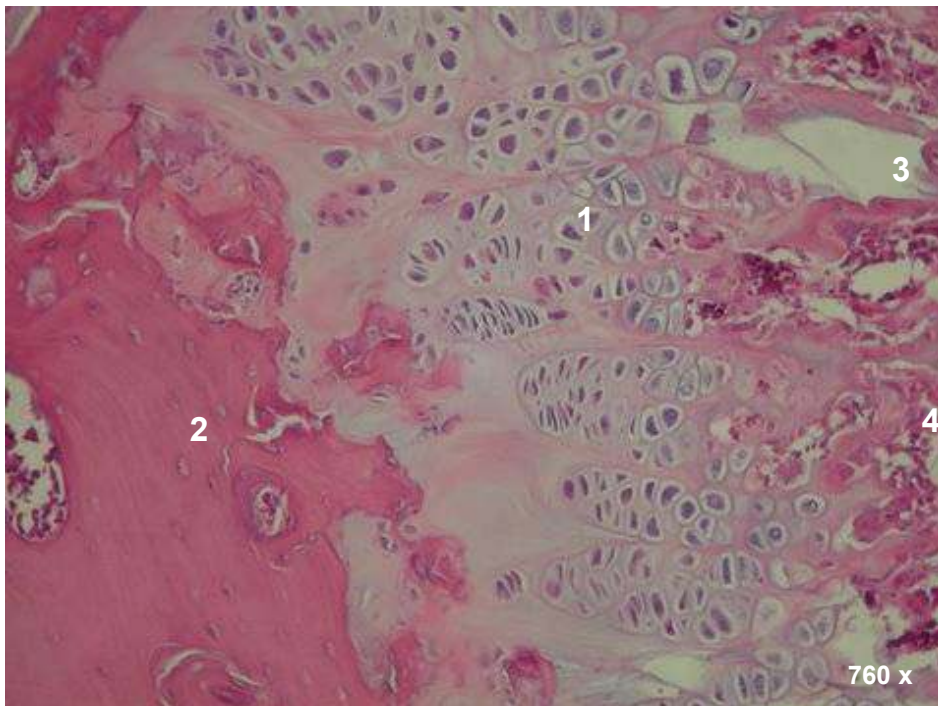


Figura 29 – Histologia grupo G3 (60 dias) – Imagem 5

É possível observar nitidamente, na inter-face osso (2) / polímero (3), a proliferação de tecido osteo-condróide (1) advindo da diferenciação celular de tecido conjuntivo (4).

5.4- Resultado Estatístico

Metodologia:

As variáveis contínuas foram expressas em média com desvio padrão. As variáveis discretas foram expressas pela frequência. Para comparar as variáveis discretas nos diferentes períodos de enxertia do material foi aplicado o teste do qui-quadrado (X^2).

Para análise dos dados foi utilizado o software Medcalc versão 12.1 (Medcalc, Mariakerke, Bélgica).

O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Foram comparados, estatisticamente, as variáveis infiltrado hemorrágico,

infiltrado inflamatório e formação de tecido osteo-condróide.

Com relação ao infiltrado hemorrágico, aplicando-se o teste X^2 nos diferentes períodos de acompanhamento, observamos o escore $P = 0,17$ ($P > 0,05$). Assim a hipótese nula (H_0) não é desconsiderada, indicando que não há diferença estatisticamente significativa entre os três grupos analisados para essa variável.

O mesmo ocorre com relação à variável infiltrado inflamatório. O teste X^2 indicou $P = 0,6294$ ($P > 0,05$). Assim a H_0 também não é desconsiderada, indicando que não há diferença estatística significativa, para essa variável, entre os três grupos analisados.

Porém, a avaliação da variável tecido osteo-condróide, no teste X^2 , indicou $P = 0,0138$ ($P < 0,05$). Nessa situação a H_0 é desconsiderada, indicando diferença estatística significativa dessa variável na avaliação dos grupos G1, G2 e G3, onde o 3º grupo mostra a formação desse tecido de forma mais intensa quando comparado aos outros grupos.

Detalhes podem ser observados nas tabelas seguintes.

5.4.1- Infiltrado Hemorrágico

Tabela 6 – Análise estatística - infiltrado hemorrágico

Grupo	Infiltrado Hemorrágico			
	(30 DIAS)	(45 DIAS)	(60 DIAS)	Total
NULO	0	1	3	4 (22.2%)
DESPREZIVEL	1	1	2	4 (22.2%)
LEVE	1	3	1	5 (27.8%)
MODERADO	2	1	0	3 (16.7%)
INTENSO	2	0	0	2 (11.1%)
	6 (33.3%)	6 (33.3%)	6 (33.3%)	18 (100%)
Qui-quadrado			11.600	
Liberdade			8	
Significância			P = 0.1700	
Coeficiente de Contingência			0.626	

Nota-se, nesta análise, $P > 0,05$. Portanto não é possível rejeitar a hipótese nula quanto ao infiltrado hemorrágico entre os grupos.

5.4.2- Infiltrado Inflamatório:

Tabela 7 - Análise estatística - infiltrado inflamatório

Grupo	Infiltrado Inflamatório			
	(30 DIAS)	(45 DIAS)	(60 DIAS)	Total
NULO	1	1	2	4 (22.2%)
DESPREZIVEL	3	1	1	5 (27.8%)
LEVE	2	3	3	8 (44.4%)
MODERADO	0	1	0	1 (5.6%)
INTENSO	0	0	0	0 (0,0%)
	6 (33.3%)	6 (33.3%)	6 (33.3%)	18 (100%)
Qui-quadrado			4.350	
Liberdade			6	
Significância			P = 0.6294	
Coeficiente de Contingência			0.441	

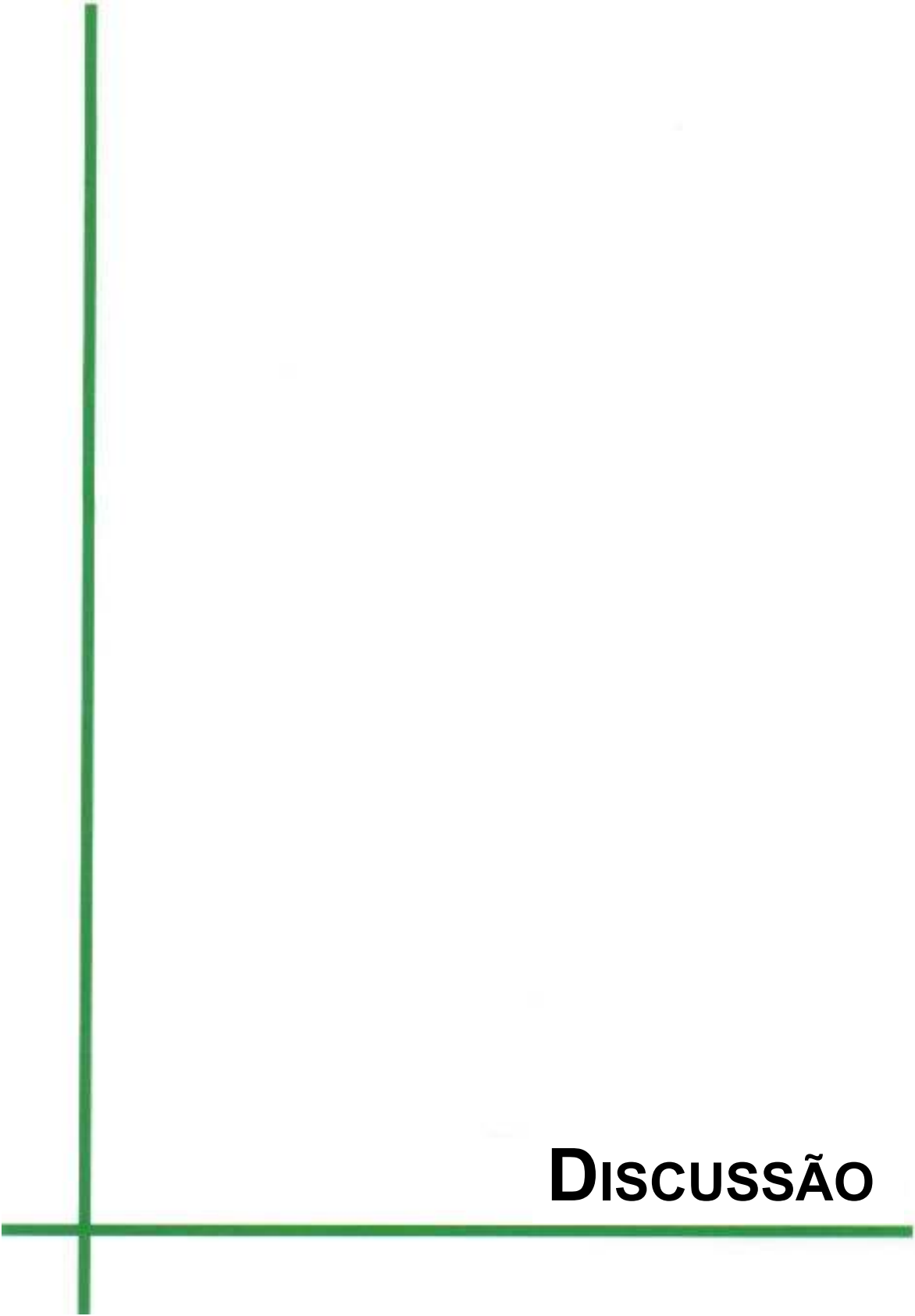
Nota-se, nesta análise, $P > 0,05$. Portanto não é possível rejeitar a hipótese nula quanto ao infiltrado Inflamatório entre os grupos.

5.4.3- Tecido Osteo-condróide:

Tabela 8 - Análise estatística - formação de tecido ósteo-condróide

Grupo	Tecido Osteo-condróide			
	(30 DIAS)	(45 DIAS)	(60 DIAS)	
NULO	4	1	0	5 (27.8%)
DESPREZIVEL	2	1	0	3 (16.7%)
LEVE	0	2	0	2 (11.1%)
MODERADO	0	2	4	6 (33.3%)
INTENSO	0	0	2	2 (11.1%)
	6 (33.3%)	6 (33.3%)	6 (33.3%)	18 (100%)
Qui-quadrado			19.200	
Liberdade			8	
Significância			P = 0.0138	
Coeficiente de Contingência			0.718	

Nota-se, nesta análise, $P < 0,05$. Portanto é possível rejeitar a hipótese nula quanto a formação de tecido osteo-condróide entre os grupos, evidenciando que essa formação no grupo G3 foi superior, estatisticamente, aos outros grupos.



DISCUSSÃO

6- DISCUSSÃO

Nos últimos anos, novos materiais artificiais desenvolvidos para o uso biomédico, conhecidos como biomateriais, vêm sendo testados com o intuito de avaliar as suas propriedades mais importantes, para a utilização em áreas multidisciplinares como a medicina, odontologia, biologia, química e engenharia.

O implante do polímero de mamona é resultado de pesquisa da Faculdade de Química de São Carlos, vinculada à Universidade de São Paulo. É um produto de desenvolvimento inteiramente nacional (SUGUIMOTO 1997).

Os materiais aloplásticos têm a propriedade de não serem absorvíveis, e esta é uma vantagem sobre os materiais biológicos. Os implantes como os derivados do poliéster, o polietileno poroso de alta densidade e os implantes injetáveis (como o PMMA) não são absorvidos (LEMBERLE et al., 1995; VUYK, ADAMSOM, 1998).

Quando se avalia o processo de reparo em defeitos ósseos resultantes de trauma, ou em defeitos ósseos patológicos, infecções ou tumores, com considerável perda óssea, é importante considerar-se não apenas a capacidade regenerativa das células individuais, mas também os vários comportamentos teciduais que podem modificar o processo regenerativo (TIDSTROM e KELLER, 1990).

Existem testes recomendados pela F.D.I. (1980) como preliminares para avaliar a biocompatibilidade dos materiais aloplásticos. Um tipo de teste é aquele em que os materiais são implantados no tecido conjuntivo de animais, método relativamente rápido para avaliar a toxicidade *in vivo* de um material.

Os testes de toxicidade *in vivo* de materiais destinados a um contato prolongado com o tecido subcutâneo, pela F.D.I., devem ser examinados e avaliados quanto à presença ou ausência de necrose e de inflamação, à intensidade e extensão da inflamação e a outras alterações pertinentes como a reabsorção do material. A intensidade da resposta inflamatória é baseada no número, tipo e na localização das células inflamatórias.

Quanto aos tipos de enxertos, os mais utilizados são os de osso fresco autógeno avascular. Normalmente obtido da crista ilíaca, é o principal método utilizado e possui comprovada capacidade osteocondutora e osteoindutora (KELLER et al. 1987;

FRIEDLAENDER 1987). Além disso, o osso autógeno é biocompatível e não imunogênico e, usualmente, incorpora-se ao leito ósseo cirúrgico (HOROWITZ 1987; FRIEDLAENDER, 1987). Esse método pode prolongar a cirurgia e submeter o paciente a considerável desconforto pós-cirúrgico (ARRINGTON et al., 1996).

Alternativas para reconstrução óssea são os enxertos microvasculares. Essa técnica foi introduzida em 1975 por TAYLOR et al., mas foi em 1989 que obteve maior difusão e começou a ser mais utilizada. Dentre as vantagens dessa técnica destacam-se:

- a) a reconstrução simultânea de defeitos ósseos e tecido mole
- b) pode ser utilizada em regiões previamente irradiadas ou em regiões ósseas portadoras de osteorradionecrose
- c) permite a presença de tecido mole suficiente para fechamento da ferida cirúrgica por primeira intenção
- d) não prejudica a irrigação sanguínea da região doadora
- e) quando utilizada em regiões maxilares ou mandibulares, permite a colocação de implantes osseointegráveis

Com o advento da microcirurgia, o uso de enxertos vascularizados tem sido preferido em relação aos não-vascularizados, por possuírem alto índice de sucesso e menor risco à infecções.

Como desvantagem destacam-se a necessidade de uma área doadora (com certa incidência de morbidade associada), necessidade de treinamento em microcirurgia neurovascular e tempo de cirurgia prolongado.

Para fugir dos inconvenientes dos enxertos biológicos, vem sendo preconizada, com desenvoltura, a utilização de substitutos ósseos sintéticos como materiais de implante (DALCUSI et al. 1990; JOSCHEK et al., 2000).

Nesse estudo, optou-se pela utilização do rato por constituir-se em um modelo experimental de fácil obtenção e manuseio. Desta forma, puderam ser propiciadas aos animais adequadas condições de sobrevivência, evitando-se também a ocorrência de quadros de desconforto desnecessários aos mesmos. Além disto, o rato apresenta-se como um modelo experimental conveniente para a avaliação da cicatrização óssea, quando da utilização do polímero de mamona (FRASCINO, L.F., 1998, IGNÁCIO, H., 1995, LEONEL, E., 2003).

A opção por estudar o polímero de mamona leva em conta suas qualidades como material viável para uso clínico, em virtude da disponibilidade e do baixo custo; porém existem relatos divergentes de biocompatibilidade demonstrado em diversos experimentos animais:

OHARA et al. (1995), realizaram estudo com 15 coelhos da raça New Zealand onde implantaram poliuretana de mamona em região intra-óssea e intra-articular, onde não foi observada reação inflamatória, que coincidem com os resultados desse trabalho.

LEONEL et al. (2003), estudaram 60 ratos albinos, que foram submetidos a preenchimento com polímero de mamona em arco zigomático. Notaram, nesse estudo, que o material de preenchimento auxiliou o processo de reparação óssea, que coincidem com os resultados desse trabalho.

SARAN (2006) analisou a interface entre o implante de polímero da mamona com o canal medular ósseo, em coelhos. Histologicamente notou-se que o polímero é biocompatível, osteoindutor e osteocondutor, que coincidem parcialmente com os resultados desse trabalho, que comprovou características de biocompatibilidade e osteocondutividade desse material.

IGNÁCIO et al. (2002) estudaram a poliuretana da mamona em cães, no preenchimento de falhas ósseas. Os resultados indicaram ausência de osseointegração, o que diverge dos resultados encontrados nesse estudo.

FRAZÍLIO (2007) comparou o polímero de mamona com enxerto ósseo autógeno em articulação de cães. Nesse estudo, não foi constatado osseointegração no grupo polímero de mamona, o que também diverge dos resultados encontrados nesse estudo.

Um dos fatores necessários para que se obtenha sucesso, qualquer que seja o procedimento cirúrgico realizado, é o cuidado para que se evite a contaminação do campo operatório, impossibilitando a formação de um depósito de microorganismos em meio aos tecidos vivos.

Nesse trabalho, atenção especial foi dedicada ao preparo do campo operatório e à realização das suturas, com o intuito de evitar que ocorresse infecção do material implantado, já que a flora microbiana das superfícies da pele pode infectar e destruir implantes e enxertos ósseos se penetrarem à ferida criada (TIDSTROM e

KELLER, 1990). Para este propósito, utilizou-se PVPI tópico na antisepsia da pele e fio de sutura bio-absorvível (Categut simples 4-0) no plano interno e seda 3-0 no externo, apesar de que a escolha por materiais absorvíveis pode introduzir problemas como uma resposta inflamatória local, com atividade fagocitária para a degradação dos mesmos (DAHLIN et al., 1988).

No nosso estudo, o interesse foi de observar as alterações do tecido circunjacente ao polímero de mamona e o comportamento ósseo.

Observa-se que são necessárias avaliações com acompanhamento em longo prazo, pois a absorção do material poderá deixar de ser uma vantagem desse tipo de implante sobre o material biológico. A presença de porosidade permite o crescimento de tecido fibrovascular dentro do implante, diminuindo a possibilidade de migração e extrusão. Convém salientar que a extrusão em materiais de enxertos não biológicos ocorre com certa frequência devido a sua rigidez e, se não tiverem partes moles generosas cobrindo estes materiais, haverá extrusão em alta porcentagem, como acontece, por exemplo, em próteses mandibulares (KUHURANA, 1999).

A poliuretana de mamona, adicionada de cálcio, apresenta estrutura porosa. Esses poros podem ser heterogêneos, com os mais diversos tamanhos ou poros menores com disposição homogênea (LEONEL et al. 2003).

Na revisão da literatura pesquisada, entretanto, não foram observados dados referentes ao diâmetro dos poros do polímero de mamona, mas pode-se afirmar que esta porosidade é conseqüente à sua expansão no processo de polimerização.

Já para FRASCINO (1998), o crescimento ósseo não ocorre pelos poros, mas de forma trans-resina, através da região em que houve fragmentação do polímero. Questiona-se, portanto, o conceito de osteocondução desse autor. Por outro lado, OHARA et al. (1995) e RAMALHO (1998) referem-se à presença de tecido ósseo novo na transição implante-osso e no interior do implante. Nesses casos foram observados neoformação óssea que ocorria por diferenciação do tecido conjuntivo neo-formado na interface osso-polímero, tendendo ao preenchimento dos poros do polímero com osso neo-formado.

Também estudado por ROUX et al. (1988) e GÜHNAN et al. (1994), a estrutura porosa do material favoreceu a sua invasão pelo tecido de granulação, aumentando suas chances de mineralização.

Segundo os autores WHITE e SHORS (1986), VAN EEDEN e RIPAMONTI (1994) e SILVA (2000), a presença de osso dentro dos poros do material implantado é evidência de que ele possui propriedades osteocondutoras.

A presença de porosidade na arquitetura interna do polímero permite a incorporação do material aos tecidos e favorece a regeneração dos defeitos ósseos. Além disso, a biocompatibilidade do poliuretano de óleo de mamona pode ser explicada pelo fato desse material conter em sua estrutura uma cadeia de ácido graxo, que é também encontrada nas gorduras existentes no corpo humano, tornando-o assim semelhante ao organismo, o que evita a rejeição (ERENO, D. 2003).

Estudos com polímero de mamona nas diversas situações e modelos animais (camundongos, coelhos, cães e macacos) não observaram sinais de infecção ou extrusão do material (IGNÁCIO et al., 1997; SUGUIMOTO, 1997; CAVALIERI, 2000 e LEONEL et al., 2003). Esses relatos coincidem com os achados clínicos deste estudo, já que não foram observados quaisquer sinais de infecção ou extrusão em nenhum dos animais avaliados no período de 30, 45 e 60 dias.

Todas as cirurgias deste experimento foram realizadas com blocos de polímero de mamona pré-fabricados e esterilizados por óxido de etileno, evitando-se, assim, o tempo necessário para a mistura dos componentes e posterior polimerização, o que facilitou o procedimento e diminuiu consideravelmente o tempo de cirurgia.

Para a realização das cirurgias experimentais, optou-se pela utilização de animais com peso entre 400 e 600 g por considerar essa uma cirurgia traumática e animais desse porte suportariam melhor o procedimento cirúrgico, além de facilitar a instalação do polímero e dos parafusos de titânio, levando em consideração o tamanho dos animais.

Apesar do impacto traumático dessa proposta de cirurgia, os animais responderam bem quanto à recuperação pós-cirúrgica.

No pós-operatório foi realizada avaliação do grau de claudicação segundo BRADEN & BRINKER (1973). Os autores relatam que a falta de uso do membro durante a fase de reparação óssea resulta em problemas que se caracterizam por atrofia muscular, rigidez articular e osteoporose.

Ao término do período estipulado para cada grupo, foi observado, à microscopia, presença de tecido fibroso envolvendo toda a parede superior do bloco de

polímero de mamona. Apesar disso, não foram notados extrusões ou presença de fístulas durante o período experimental, o que coincidem com os achados de OHARA (1995), IGNACIO (1997) e CARVALHO (1997). Esses resultados se contrapõem aos achados de DIAS (2007), que não notou presença de formação de tecido fibroso envolvendo o material de polímero de mamona.

Na microscopia, todos os casos revelaram presença de tecido conjuntivo neoformado no interior do bloco, mais evidente no grupo G3. Foi observado também que, com 60 dias de evolução, era nítida a presença de tecido osteóide na interface osso-implante, detalhe que não pareceu tão significativo nos grupos de 30 e 45 dias. Isso reforça a idéia da tendência desse osso se infiltrar nos poros do polímero, resultados que coincidem com trabalhos de OHAHA (1995), IGNACIO (1997), LEONEL (2003).

Em algumas áreas, observou-se grande de formação de tecido conjuntivo. Outras mostraram edema moderado, que coincidem com resultados de DIAS (2007).

Neste estudo, notamos que ocorreu diminuição do volume do polímero de mamona e, também observada em todas as avaliações, presença de fragmentos do implante no meio do tecido conjuntivo, resultados coincidentes com estudos de SUGUIMOTO (1997) e DIAS (2007).

No presente estudo foi possível concluir que a porosidade do polímero de mamona, que é uma constante nesse biomaterial, auxiliou no processo de infiltração de tecido conjuntivo, resultados coincidentes com estudos de LEONEL (2003).

Estatisticamente foram comparadas as variáveis infiltrado hemorrágico, inflamatório e formação de tecido osteo-condróide, usando o teste qui-quadrado.

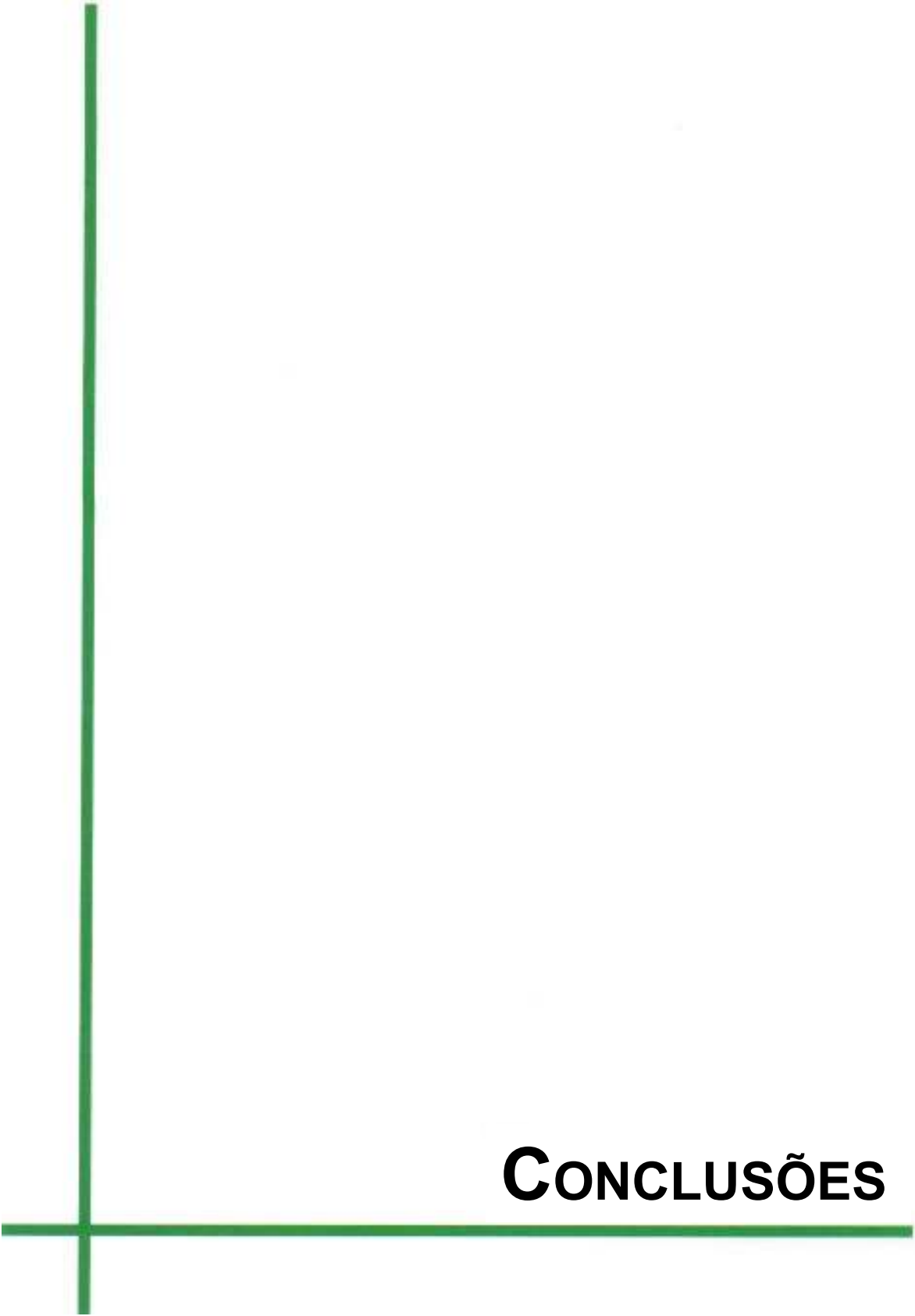
Para determinar a presença dessas variáveis nas lâminas analisadas, dois patologistas analisaram de forma cega e subjetiva esses materiais, classificando-os como nulo, desprezível, leve, moderado e intenso, simbolizados como +, ++, +++, +++++, ++++++ respectivamente.

Para as variáveis infiltrado hemorrágico e infiltrado inflamatório, observamos $P > 0,05$ indicando que não há diferença estatisticamente significativa entre os três grupos analisados para essas variáveis, porém, a avaliação da variável tecido osteo-condróide, resultou $P < 0,05$, indicando diferença estatística significativa entre os grupos G1, G2 e G3, onde o 3º grupo mostra a formação desse tecido de forma mais

intensa quando comparado aos outros grupos.

Nota-se, na literatura, resultados e comportamentos diferentes desse biomaterial em cirurgias experimentais animais. Isso pode estar relacionado com a metodologia de cada experimento, como o animal utilizado, a região estudada e o período de avaliação em cada pesquisa.

Ressaltamos a intenção de continuar esse estudo de forma mais aprofundada, comparando os resultados a um grupo controle, com um período de acompanhamento maior.



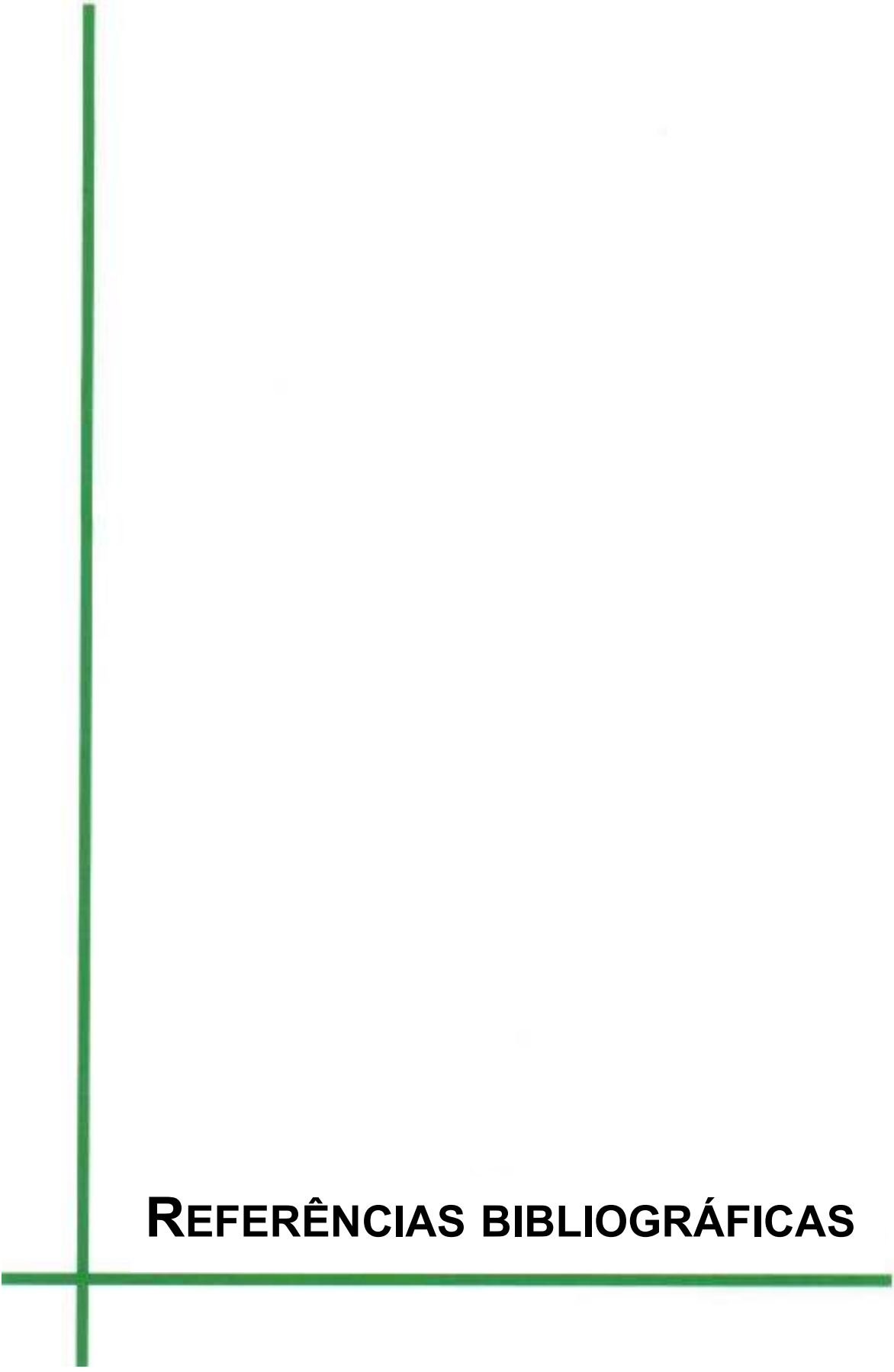
CONCLUSÕES

7- CONCLUSÕES

1- O polímero de mamona utilizado neste estudo mostrou-se um material biocompatível, uma vez que foi invadido por tecido conjuntivo neoformado, comprovando suas características biocomportamentais de osteocondução. Esta neoformação foi mais evidente no período de análise de 60 dias. Notou-se também que houve diminuição do volume do material enxertado.

2- Observou-se nítida ossificação endocondral a partir do tecido conjuntivo, com presença de neoformação de matriz condróide e osteóide, na interface osso/prótese, permitindo o crescimento de tecido conjuntivo no interior de seus poros, auxiliando a estabilidade no local da implantação. O polímero, de aspecto poroso, com poros largos, foi permeado por tecido conjuntivo. Não foram observados granulomas de corpo estranho.

3- Observou-se, em todos os grupos, encapsulamento do polímero por um tecido fibroso, isolando-o do tecido muscular, que ficou aderido ao tecido fibrótico.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AKAGAWA Y. Tissue Reaction to Implanted Biomaterials. *J Prosthet Dent* 1985; 53:681-6.
- 2- ALEXANDER JW. Bone grafting. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1987; 17(4):811-9.
- 3- ANVISA - Brasil.Ministério da Saúde. - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2005. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>
- 4- ARRIGTON ED, SMITH WJ, CHAMBERS HG, BUCKNELL AL, DAVINO NA. Complications of Iliacs Crest Bone Grafting Harvesting. *Clin Orthop and Related Res* 1996; 329:300-9. Complications of Iliacs Crest Bone Grafting Harvesting. *Clin Orthop and Related Res* 1996; 329:300-9.
- 5- BARROS SVG. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea em falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos. *Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)* - Universidade Federal de Viçosa. 2000.
- 6- BELTRÃO NEM, OLIVEIRA MIP, AMORIM MLCM. Opções para a produção de biodiesel no semiárido brasileiro em regime de sequeiro: por que Algodão e Mamona. Embrapa - Documentos ISSN 0103-0205. 2009.
- 7- BOLANDER ME, BALIAN G. The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. *J Bone Joint Surg* 1986; 68:1264-74.
- 8- BOSS JH, BOSS JH, SHAJRAWI I, AUNULLAH J, MENDES DG. The relativity of biocompatibility. A critical of the concept of biocompatibility. *Israel J Med Sci* 1995; 31(4):203-9.
- 9- BRADEN TD, BRINKER WO. Effect of certain internal fixation devices on functional limb usage in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1973; 162:642-6.
- 10- BRONZI ES, SAAD JRC, MOTISUKI C. Estudo in vitro da resistência ao teste de cisalhamento de restaurações do polímero vegetal (óleo de mamona) com sistemas de adesão e cimento de ionômero de vidro. *Odonto* 2000 – *Odontol. Séc. XXI*, Araraquara, 1999; 3:30-6.
- 11- CARVALHO TL, ARAÚJO CA, TEÓFILO JM, BRENTGANI LG. Histologic and histometric evaluation of rat alveolar wound healing around polyurethane_resin implants. *Int Oral Maxillofac Surg* 1997; 26:149-52.
- 12- CAVALIERI I. Estudo do processo de reparação óssea entre os implantes de polímero de mamona, resina acrílica termicamente ativada e cimento ósseo, em tibia

de coelhos. São José dos Campos, UNESP, *Dissertação (Mestrado)* – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos da Universidade do Estado de São Paulo. 2000.

13- CHALMERS J, SISSONS HA. An experimental comparison of bone grafting materials in the dog. *J Bone Joint Surg* 1959; 41:209.

14- CHAPMAN PG, Villar RN. The bacteriology of bone allografts. *J Bone Joint Surg* 1992; 74:398-9.

15- CHIERICE GO. Pesquisa e desenvolvimento de biomateriais baseados em poliuretanas derivadas do óleo de mamona. São Carlos, *SNM-PADCT-II (Relatório Técnico – SNM-PADCT-II)*. 1994.

16- CLARO NETO S. Caracterizações físico-químicas de um poliuretano derivado do óleo de mamona utilizado para implantes ósseos. 1997. 127f. Tese (*Doutorado em Química Analítica*) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1997.

17- COSTA HM, VISCONTE LLY, NUNES RCR, FURTADO CRG. Effects from the castor oil on sílica-filled natural rubber compounds. *Polímeros* 2004; 14:46-50.

18- EINHORN TA, LANE JM, BURSTEIN AH, KOPMAN CR, VIGORITA VJ. The healing of segmental defects induced by demineralized bone matrix: a radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg* 1984; 66:274-79.

19- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de pesquisa do algodão. Mamona. Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/index.html>.

20- ENNEKING WF, EADY JL, BURCHARDT H. Autogenous cortical bone grafts in the construction of segmental skeletal defects. *J Bone Joint Surg* 1980; 62:1039-58.

21- ERENO D. Próteses de mamona. *Pesquisa Fapesp* 2003; 91:66-71.

22- DAHLIN C, LINDE A, GOTTLÖW J, NYMAN S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988; 81:672-6.

23- DALCUSI G, PASSUT N, MARTIN S, DEUDON C, LEGEROS R, RAHER S. Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs: clinical and histological study. *J Biomed Mater Res* 1990; 24:379-96.

24- DE OLIVEIRA D, LUCCIO M, FACCIO C, ROSA CD, BRENDER P, LIPKE N, et al. Optimization of alkaline transesterification of soybean oil and castor oil for biodiesel production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2005; 121:553-60.

25- DIAS, PCJ. Avaliação histológica da biocompatibilidade do polímero de mamona no dorso nasal de macacos prego (*cebus apella*). Tese (*Doutorado em Medicina*) – Faculdade de Ciências médicas da Santa Casa de São Paulo. 2007.

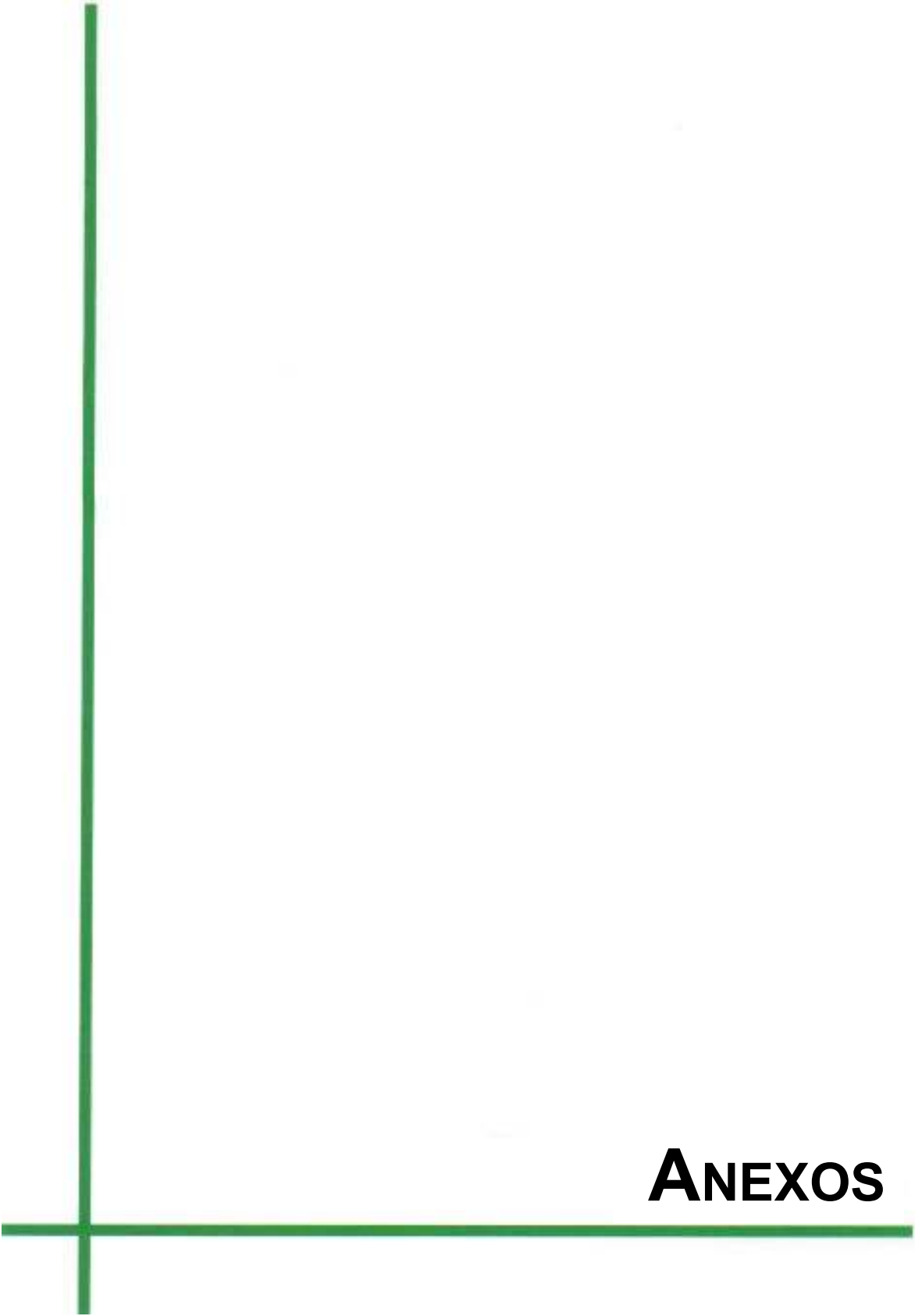
- 26- EHRLICH MA, PARHISCAR A. Nasal dorsal argumentation with silicone implants. *Facial plastic Surg* 2003; 19:325-30
- 27- Federation Dentaire International. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J* 1980; 30:140-88
- 28- FERREIRA CM, BONIFACIO KC, FRONER IC, ITO IY. Evaluation of the antimicrobial activity of three irrigating solutions in teeth with pulpal necrosis. *Brazilian Dental Journal* 1999; 10:115-21.
- 29- FINKEMEIER CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *Bone Joint Surg* 2002; 84(3):454-64.
- 30- FITCH R, KERWIN S, SINIBALDI KR, NEWMAN-GAGE H. Bone autografts and allografts in dogs. *Compend Contin Edu Pract Vet* 1997; 19:558-78.
- 31- FRASCINO LF. Implante de resina poliuretana vegetal em cranioplastia: estudo experimental em coelhos. *Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)* - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP. 1998.
- 32- FRIEDLAENDER, G.E. Current concepts review bone grafts. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1987; 69:786-90.
- 33- GAILLARD Y, PEPIN G. Poisoning by plant material: review of human cases and analytical determination of main toxins by higher-performance liquid chromatography-spectrometry. *Journal of Chromatography* 1999; 733:181-229.
- 34- GARCIA SD, PERRI SHV, CHIERICE GO, CARDOSO D. Avaliação da toxicidade subaguda e multigeracional da ingestão de derivado do polímero de mamona em ratos. *Ciência Animal Brasileira* 2009; 10:219-225.
- 35- GARTNER LP, HIATT JL. *Tratado de histologia. 2a ed.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003: 456p.
- 36- GEPSTEIN R, WEISS RE, SABA K, HALLEL T. Bridging large defects in bone by demineralized bone matrix in the form of a powder. *J Bone Joint Surg* 1987; 69:981-84.
- 37- GOLDBERG V, STEVENSON S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop* 1987; 225:7-16.
- 38- GONRING D. Mamona, a nova descoberta da medicina. *A Gazeta, Vitória, 6 set. Caderno Medicina* 1998: 16.
- 39- GUASTALDI, A. C. Engenharia de superfície do Ti para aplicações biomédicas. *Re. Metal & Mater* 2003; 59:442-44.

- 40- GÜNHAN O, BAL E, CELASUN B, SENGUN O, FINCI R. A Comparative histological study of non-porous and micro-porous (algae-derived) hydroxyapatite ceramics. *Aust Dent J* 1994; 39:25-7.
- 41- IGNÁCIO H, MAZZER N, BARBIERI CH, CHIERICE G. Uso da poliuretana derivada do óleo de mamona para preencher defeitos ósseos diafisários segmentares do rádio: estudo experimental em coelhos. *Rev Bras Ortop* 1997; 32:815-21.
- 42- IGNÁCIO H, MAZZER N, BARBIERI CH, CHIERICE GO. Utilização da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea: estudo experimental em cães. *Rev Bras Ortop* 2002; 37:187-94.
- 43- HOROWITZ MC, FRIEDLAENDER GE. Immunologic aspects of bone transplantation. A rationale for future studies. *Orthop Clin North Am* 1987; 18:227-33.
- 44- JOHNSON, K.A. Cancellous bone graft collection from the tibia in dogs. *Vet. Surg* 1986;15;334-38.
- 45- JOSCHEK S, NIES B, GOEPFERICH, A. Chemical and Physicochemical Ceramics made of Natural Bone. *Biomaterials* 2000; 21:1645-58,
- 46- JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. *Histologia Básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- 47- KELLER MD, SELVIN RC, CLAUS, W, GUILLARD, RRL. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J Phycol* 1987; 23:633-8.
- 48- Kenley R.A. YIM K, ABRAMS J, ROAN E, TUREK T, MARDEN LJ, HOLLINGER JO. Biotechnology and bone graft substitutes. *Pharmaceutical Research* 1993.
- 49- KUHURANA D, DAVID AS. Grafting materials for augmentation septorhinoplasty. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 7:210-5.
- 50- LANCE EM. Some observations on bone graft technology. *Clin Orthop* 1985; 200:114-24.
- 51- LAUREANO JR; BRANCO BLC; ANDRADE ESS; BARBOSA JRA. Comparação histológica entre o osso desmineralizado e polímero de mamona sobre a regeneração óssea. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 2007; 73:186-92.
- 52- LEMBERLE G, HAZAN-GAUTHIER N, LEMBERLE M. PMMA microspheres (Artecoll) for skin and soft-tissue augmentation. Part II : Clinical investigations. *Plast Reconstr Surg* 1995; 96:627-34.
- 53- LEONEL E. A importância da porosidade interna do polímero de mamona durante a neformação óssea - estudo em ratos. *Cienc Odontol Brás* 2003; 6:19-25.

- 54- LORD JM, ROBERTS LM, ROBERTUS JD. Ricin: structure, mode of action and some current applications. *The Faseb Journal* 1994; 8:201-8.
- 55- MARIA PP, PADILHA JG, ALMEIDA TL. Luxação medial de patela em cães – revisão. *Clínica Veterinária* 2001; 6:25-32.
- 56- MARIA PP, PADILHA JG, CANOLA JC, CASTRO MB. Poliuretana de mamona (*Ricinus communis*) para desvio da crista tibial no cão. *Cienc Rural*. 2004; 34(3) 167-79.
- 57- MIRANDA ES, CARDOSO FTS, MEDEIROS JF, BARETO MDR, Teixeira RMM, WANDERLEY AL, FERNANDES KE. Estudo experimental comparativo no uso de enxerto ósseo orgânico e inorgânico no reparo de fraturas cirúrgicas em rádio de coelhos. *Acta Ortop Bras* 2005; 13(5):245-8.
- 58- NILSSON OS, URIST MR, DAWSON EG, SCHMALZRIED TP, FINERMAN GAM. Bone repair induced by bone morphogenetic protein in ulnar defects in dogs. *J Bone Joint Surg* 1986; 68:635-42.
- 59- OHARA GH, KOJIMA KE, ROSSI JC. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretana de mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos. *Acta Ortop Bras* 1995; 3:62-68.
- 60- OLIVEIRA DR, DEL CARLO RJ, VILORIA MIV, GALVÃO SR, MAIA A, FILGUEIRAS RR. Matriz óssea homóloga desmineralizada associada à medula óssea autógena no preenchimento de falhas segmentares em rádio de coelhos. *Rev Cien Anim Bras* 2000; 1:89-89.
- 61- Pesquisa e desenvolvimento de biomateriais baseados em poliuretana derivadas de óleo de mamona. Universidade de São Paulo – Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos. *Projeto PADCT. Edital SNM 02/94-04*. Jul. 1994.
- 62- PERRY CR. Bone Repair Techniques, Bone Graft, and Bone Graft Substitutes. *Clin Orthop Relat Res* 1999; 360:71-86.
- 63- PINTO JÚNIOR HS. Utilização de enxertos ósseos homólogos preservados na reparação de fraturas cominutivas de ossos longos de cães. *Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária)* – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1990.
- 64- RAMALHO LTO. Biocompatibilidade da resina poliuretana vegetal derivada do óleo de mamona: estudos histológicos. Vitória. Anais: CISBIO - *Chierice International Society For Biomateriais* 1998; 1:56.
- 65- REDDI AH, HUGGINS CB. Lactic/Malic dehydrogenase quotients during transformation of fibroblasts into cartilage and bone. *Proc So Exp Bio Med* 1971; 137:127-29.

- 66- RIPAMONTI U. Morphogenesis of bone in replicas of porous hydroxyapatite obtained from conversion of carbonate exoskeletons of coral. *J Bone Joint Surg* 1991; 73:692-703.
- 67- ROWE NL, WILLIAMS J. *Maxillofacial Injuries*. 2ª ed. New York: Churchill Livingstone 1994; 2:39-49
- 68- ROUX FX, BRASNU D, LOTY B, GEORGE B, GUILLEMIM G. Madreporic coral: a new bone graft substitute for cranial surgery. *J Neurosurg* 1988; 69(4):510-13.
- 69- SARAN WR. Estudo experimental de implantes derivados da resina poliuretana de mamona (*Ricinus Communis*), inseridos no canal medular da tíbia de coelhos. Análise da interface osso e implante. *Dissertação (Mestrado em bioengenharia)* - Universidade de São Paulo. 2006.
- 70- SCHENA III, CJ. The procurement of cancellous bone for grafting in small animal orthopedic surgery: a review of instrumentation, technique, and pathophysiology. *J A. Anim Hosp Assoc* 1983; 19:695-701.
- 71- SILVA AM. Avaliação dos potenciais osteoindutor e osteocondutor da matriz óssea homóloga desmineralizada de coelho. *Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)* - Universidade Federal de Viçosa. 2000.
- 72- SILVA NM. Óleo de mamona é usado em cirurgia da coluna. O Estado de São Paulo, São Paulo. *Ciência e Tecnologia* 23 mar 1996:16.
- 73- SOUZA AMG. Biopolímero da mamona para reconstrução de falhas ósseas pós-ressecção tumoral: aplicação clínica. Tese (Doutorado em Medicina) – Universidade de Pernambuco 2000.
- 74- SUGUIMOTO RM. Implante de polímero de mamona (*Ricinus communis*) sobre o mento. Estudo histológico em macacos. *Dissertação (Mestrado)* - Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista. 1997.
- 75- TAYLOR GI, MILLER GDH, HAM FJ. The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques. *Plastic and reconstructive Surgery* 1975; 55:533-44
- 76- TEIXEIRA HM, VILARINHO RH, RAMALHO LTO. “Reação à resina vegetal de mamona durante o processo de reparo em defeitos ósseos induzidos no corpo de mandíbula” in *Reunião da SBPQO*. Anais São Pedro (SP). 1996.
- 77- TIDSTROM KD, KELLER EE. Reconstruction of mandibular discontinuity with autogenous iliac bone graft: report of 34 consecutive patients. *J Oral Maxillofac Surg* 1990; 48:336-46.

- 78- UEDA JK. Implante de resina de poliuretana vegetal na câmara anterior do olho de camundongo. Estudo histológico. In: Reunião da SBPQO. Anais São Pedro (SP) 1996.
- 79- URIST MR, LIETZE A, MIZUTANI H, TAKAGI K, TRIFFITT JT, AMSTUTZ J, DELANGE R, TERMINE J, FINERMAN G. A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction. *Clin Orthop* 1982; 162:219-32.
- 80- VAN EEDEN SP, RIPAMONTI U. Bone differentiation in porous hydroxyapatite in baboons is regulated by the geometry of the substratum: implications for reconstructive craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg* 1994; 93:959-66.
- 81- VILAR WD. *Química e Tecnologia dos Poliuretanos*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Vilar Consultoria, 2005.
- 82- VILARINHO RH, HETEM S, RAMALHO LTO. Implante de resina de poliuretana vegetal na câmara anterior do olho de camundongo - estudo histológico. In: *Odontologia do século XXI*. Araraquara, SP. Anais Araraquara: Faculdade de Odontologia, 1996; 1:25-29.
- 83- VUYK HD, ADAMSON PA. Biomaterials in rhinoplasty. A review. *Clinical Otolaryngol* 1998; 23:209-17.
- 84- WHITE E, SHORS EC. Biomaterial aspects of interpore-200 porous hydroxyapatite. *Dent Clin North Am* 1986; 30:49-67.
- 85- WHITEMAN D, GROPPER PT, WIRTZ P, MONK P. Demineralized bone powder: Clinical applications for bone defects of the hand. *J Hand Surg* 1993; 18:487-90.
- 86- WOSNEY JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 2002; 15:2-8.
- 87- YASKO AW, LANE JM, FELLINGER EJ, ROSEN V, WOZNEY JM, WANG EA. The healing of segmental bone defects induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rh BMP-2). *J Bone Joint Surg* 1992; 74:659-70.



ANEXOS

9- Anexo

Termo de Aprovação do Estudo pela comissão de ética na Experimentação Animal - CEEA/UNICAMP - parecer nº 1294-1.



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1294-1, sobre "Estudo histológico da acomodação do tecido muscular e presença de células osteóides em próteses de polímero de mamona", sob a responsabilidade de Dr. Antonio Martins / Walter Martinelli Junior, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 1o. de agosto de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1294-1, entitled "Histological study of muscular tissue accomodation and osteoids cells presence in vegetal polyurethane resin", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on August 1, 2007.

Campinas, 1o. de agosto de 2007.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB - Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: cometab@unicamp.br
<http://www.ibz.unicamp.br/institucional/cometab/index.htm>