

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MORFOLOGIA

JOÃO CLEBER THEODORO DE ANDRADE

OSTEOINTEGRAÇÃO DE CORPOS CERÂMICOS DENSOS E
POROSOS DE HIDROXIAPATITA EM CAVIDADES PRODUZIDAS
NO FÊMUR DO RATO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
João Cleber Theodoro
de Andrade
e aprovada pela Comissão Julgadora.
25/05/98

Tese de Mestrado apresentada no
Instituto de Biologia - UNICAMP
para obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas - Área de
Concentração em Morfologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ANGELO CAMILLI

Campinas, 1997

UNIDADE	BC
CHAMADA:	
UNICAMP	
Ano	240
34145	
395198	
0	☒
28.11.00	
05/06/98	
CPD	

CM-00112426-7

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Andrade, João Cleber Theodoro de

An240 Osteointegração de corpos cerâmicos densos e porosos de hidroxiapatita em cavidades produzidas no fêmur do rato / João Cleber Theodoro de Andrade. -- Campinas, SP: [s.n.], 1998.
70f.: illus.

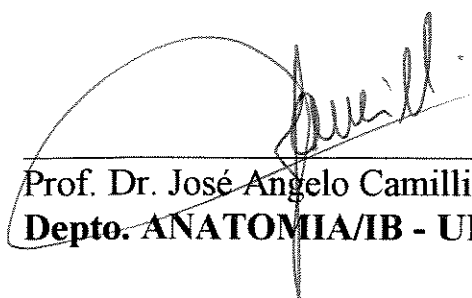
Orientador: José Angelo Camilli

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1.Hidroxiapatita. 2.Osso. 3.Formação. I.Camilli, José Angelo II.Universidade Estadual de Campinas.Instituto de Biologia. III.Título.

Defesa de Tese Realizada em 21 / 01 / 98

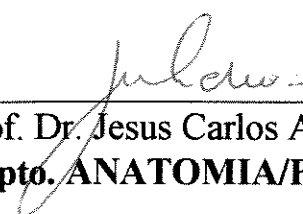
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Angelo Camilli - ORIENTADOR
Depto. ANATOMIA/IB - UNICAMP



Prof. Dr. Armando Mâncio de Camargo
Depto. ANATOMIA/IB - UNICAMP



Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo
Depto. ANATOMIA/FOB - USP

Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran
Depto. QUÍMICA/IQ - UNICAMP

*Aos meus pais João e Dirce
Aos meus irmãos*

DEDICO

*Vocês que sempre
depositam total confiança em todas
minhas decisões.*

À minha namorada Edilene

DEDICO

*Você que com esse jeito meigo de me olhar,
sempre soube compreender
meus momentos neste trabalho.*

Ao Sr. Egidio e Sra. Odete

DEDICO

*Vocês que sempre me
receberam
com carinho e confiança em seu lar*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, Criador e Unipresente, que sempre nos piores momentos de minha vida, quando imaginava estar caminhando sozinho, porque observava nas pegadas deixadas na areia a presença de somente dois passos, estava na verdade, sendo carregado nos braços dele.

Ao Amigo, Professor e Orientador Dr. José Angelo Camilli, que sempre me orientou com atenção e zelo, abdicando-se, por muitas ocasiões de sua família, viabilizando, assim, várias oportunidades de reunir-mos.

“O segredo de um sucesso está em se ter uma oportunidade, não aquela que se conquista, mas aquela, em que de repente, alguém chega e lhe abre uma porta”

Ayrton Senna

Ao professor Ms. Alexandre, do Departamento de Anatomia - UNICAMP, pelas ajudas constantes no aprendizado com o computador.

Aos colegas do Departamento de Anatomia - UNICAMP, pelos incentivos e colaborações que sempre dispensaram, especialmente, à professora Dra. Valéria, que sempre ouviu meus desabafos e ao professor Dr. Armando, que sempre se preocupou com minha formação.

A todos os funcionários do Departamento de Anatomia - UNICAMP, que de um modo ou de outro, colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

A Srta. Helena, secretária da pós-graduação em morfologia - UNICAMP, pela atenção que sempre me prestou.

Ao professor Dr. Celso Bertran e a Ms. Elizabete, do Instituto de Química - UNICAMP, pelo preparo da hidroxiapatita e pela possibilidade de interdisciplinariedade entre anatomia e química.

A Srta. Isabel, do Departamento de Ortopedia - UNICAMP, pela ajuda nos cortes dos ossos não descalcificados.

A professora Dra. Iris e Sra. Ana, do Departamento de Cristalografia, Instituto de Física - UNICAMP, pela atenção e presteza com as microrradigrafias.

A CAPES, pela bolsa que me concederam tornando possível a realização deste trabalho.

Ao FAEP, pelo auxílio na compra dos materiais utilizados nesta tese.

A todos aqueles que de uma forma ou outra deram sua parcela de contribuição para este trabalho e que por um lapso, neste momento, não me lembrei de citar.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1.0 - INTRODUÇÃO.....	01
2.0 - LITERATURA.....	02
2.1 - Estrutura do osso.....	02
2.2 - Reparo ósseo.....	05
2.3 - Enxertos ósseo e periostais.....	07
2.4 - Implante de hidroxiapatita.....	09
3.0 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 - SÍTESE DO PÓ DE HIDROXIAPATITA.....	13
3.1.1 - Confeção dos corpos cerâmicos densos.....	13
3.1.2 - Confeção dos corpos cerâmicos porosos.....	14
3.2 - CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	14
3.2.1 - Determinação da composição do Ca de P.....	14
3.2.2 - Razão molar Ca/P.....	15
3.2.3 - Porosimetria de Mercúrio.....	15
3.3 - ESTUDO “ <i>IN VIVO</i> ”.....	17
3.3.1 - Procedimento cirúrgico.....	17
3.3.2 - Organização dos grupos experimental e controle.....	19
3.4 - TÉCNICAS UTILIZADAS.....	19
3.4.1 - Microrradigrafia.....	20
3.4.2 - Cortes histológicos.....	21
4.0 - RESULTADOS.....	22
4.1 - OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS.....	22

4.2 - OBSERVAÇÕES RADIOGRÁFICAS.....	24
4.2.1 - Implante de hidroxiapatita densa.....	24
4.2.2 - Implante de hidroxiapatita porosa.....	26
4.3 - OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS.....	28
4.3.1 - GRUPO CONTROLE.....	28
4.3.1.1 - Uma semana após à cirurgia.....	28
4.3.1.2 - Duas semanas após à cirurgia.....	28
4.3.1.3 - Quatro semanas após à cirurgia.....	29
4.3.1.4 - Oito, dezesseis e vinte e quatro semanas após à cirurgia.....	29
4.3.2 - GRUPO EXPERIMENTAL.....	31
4.3.2.1 - IMPLANTE DE HIDROXIAPATITA DENSA...	31
4.3.2.1.1 - Uma semana após à cirurgia.....	31
4.3.2.1.2 - Duas semanas após à cirurgia.....	33
4.3.2.1.3 - Quatro semanas após à cirurgia.....	35
4.3.2.1.4 - Oito semanas após à cirurgia.....	35
4.3.2.1.5 - Dezesseis semanas após à cirurgia.....	38
4.3.2.1.6 - Vinte e quatro semanas após à cirur- gia.....	41
4.3.2.2 - IMPLANTE DE HIDROXIAPATITA POROSA	43
4.3.2.2.1 - Uma semana após à cirurgia.....	43
4.3.2.2.2 - Duas semanas após à cirurgia.....	45
4.3.2.2.3 - Quatro semanas após à cirurgia.....	45
4.3.2.2.4 - Oito semanas após à cirurgia.....	47
4.3.2.2.5 - Dezesseis semanas após à cirurgia.....	49
4.3.2.2.6 - Vinte e quatro semanas após à cirur- gia.....	52
5.0 - DISCUSSÃO.....	54
6.0 - CONCLUSÕES.....	64
7.0 - BIBLIOGRAFIA.....	65

RESUMO

Enxertos ósseos autógenos tem sido freqüentemente usados para tratar lesões com perda de tecido ósseo. Um método alternativo que evita cirurgia adicional, consiste em utilizar biomateriais para preencher falhas ósseas. Nessa investigação, implantes de hidroxiapatita porosa (HAP) e densa (HAD), produzidos e caracterizados pelo Instituto de Química - UNICAMP, foram usados em cavidades produzidas nos fêmures de ratos. Durante um período de 24 semanas, o local de implante foi examinado macroscópica, radiográfica e histologicamente. Nos animais com 1 e 2 semanas de implantação, um nódulo esbranquiçado foi visto em todos os casos, com progressiva diminuição de tamanho após quatro semanas. As observações radiográficas mostraram a presença de uma rede de trabéculas ósseas ao redor dos implantes de HAD e HAP. A partir de 2 semanas, nos dois tipos de implantes, as trabéculas tornaram-se mais radiopacas e ocorreu diminuição do volume do osso formado. Nas observações microscópicas, 1 e 2 semanas após a implantação, osso jovem foi observado envolvendo a superfície dos dois tipos de implantes. Formação de osso também ocorreu no interior dos poros do implante de HAP. Até 4 semanas, os implantes de HAP demonstraram marcante processo de formação óssea para o interior dos poros. Após 8, 16 e 24 semanas foi observada uma progressiva absorção óssea nos dois tipos de implantes. Osso maduro com sistema haversiano permaneceu ao redor do implante de HAD e preenchendo os poros do implante de HAP durante todo o período do experimento. De acordo com nossos resultados, os implantes densos e porosos de HA demonstraram ser biocompatíveis. A HAP permitiu crescimento de tecido ósseo para o interior dos poros. Uma fina camada de tecido fibroso estava presente na interface entre o osso neoformado e o implante de HAD.

ABSTRACT

Autogenous bone grafts have frequently been used to treat lesions with loss of bone tissue. An alternative method, to avoid additional surgery, consists of to apply biomaterials to fill up bone defects. At the present we investigated the implants of hydroxyapatite porous (HAP) and dense (HAD) - produced and characterized by the Institute of Chemistry; UNICAMP - to rapair cavities surgically induced in the femura of rats. Twenty-four weeks after surgery the place of the implants was examined macroscopic, radiografic and histologically. One and two weeks after implantation, a nodule whitish was seen in all the cases. The size of this node decreased after four weeks. The radiografics observations showed the presence of a trabecular net of bone around of the HAD and HAP implants. At two weeks, in HAP and HAD as well, the trabecular bone became more radiopaque and there was a decreased in the volume of the formed bone. Microscopic observations showed that, 1 and 2 weeks after the implantation, young bone was observed involving the surface of the two types of implants. Bone formation also occurred into the pores of the HAP. Until 4 weeks, the HAP implants have demonstrated a significant process of bone formation in the pores. After 8, 16 and 24 weeks we noticed a progressive bone absorption in both types of implants. Mature bone with haversian systems has involved the HAD and filling the pores of the HAP during the whole period of the experiment. Our results show that, HAD and HAP implants are biocompatible. HAP has allowed growth of bone tissue into the pores. A fine layer of the fibrous tissue was observed in the interface among the neoformed bone and the HAD.

1.0 INTRODUÇÃO

Lesões graves causadas pela ressecção de tumores, infecções e principalmente por traumas mecânicos, são fatores incapacitantes que acarretam ao indivíduo não só problemas de saúde, mas também de caráter sócio-econômico. Particularmente aquelas com perda de substância óssea, são com frequência tratadas com enxerto ósseo autógenos. A obtenção destes enxertos envolve intervenções cirúrgicas adicionais que podem apresentar complicações como hemorragia, pneumotórax, infecção, dor crônica e distúrbios no desenvolvimento ósseo quando o paciente é jovem (GLOWACKI et al., 1981).

Considerando as possibilidades da utilização do enxerto ósseo autógeno, em algumas circunstâncias, a quantidade de osso é insuficiente. Pode-se, nesses casos, recorrer ao uso de enxertos homólogos e heterólogos. O enxerto homólogo é mais bem tolerado que o heterólogo, porém, inferior ao autógeno em termos de reação tecidual. No entanto, apresentam a vantagem de serem disponíveis em maior quantidade e podem ser conservados e armazenados (HAM, 1983).

Assim sendo, o desenvolvimento de técnicas e materiais que possam substituir o uso desse tipo de enxerto e, ao mesmo tempo, estimular a regeneração, abreviando o tempo de consolidação óssea, é uma questão fundamental na resolução do problema.

Nossa proposta foi estudar as características morfológicas do processo de regeneração óssea ao redor de corpos cerâmicos densos e porosos de hidroxiapatita, quando implantados em cavidades produzidas nos fêmures de ratos e revestidas por retalho periosteal.

2.0 LITERATURA

2.1 Estrutura do osso

Um dos aspectos importantes a considerar para o desenvolvimento de materiais biocompatíveis, está, primeiramente, em estudar as características do tecido natural a substituir.

O osso é constituído por um tipo especial de tecido conjuntivo, composto de células, fibras e substância fundamental, diferenciando-se de outros por apresentar o componente extracelular calcificado, tornando-o uma substância dura e resistente, ideal para as funções como sustentação e proteção do esqueleto (HAM, 1983). O tecido ósseo proporciona sustentação dos músculos e tendões, essenciais para a locomoção e proteção de órgãos vitais, contidos na cavidade craniana, torácica e pélvica. Além destas funções mecânicas, o osso aloja os elementos hematopoiéticos da medula óssea e desempenham importante papel para o metabolismo, armazenando cálcio que pode ser mobilizado à medida que requeira regulação homeostática no sangue e em outros líquidos orgânicos (BLOOM & FAWCETT, 1973).

A observação simples de um osso longo permite-nos reconhecer dois tipos de tecido ósseo: uma porção esponjosa e outra compacta. O esponjoso apresenta-se formado por uma rede tridimensional de trabéculas ósseas que delimitam um espaço ocupado por medula óssea. O compacto apresenta-se como uma massa sólida na qual os espaços são vistos somente em microscópio.

Em ossos longos típicos como o fêmur distingue-se uma diáfise, constituída por um cilindro oco, com parede óssea compacta, delimitando uma cavidade central, a cavidade medular, que contém medula óssea. Nas

extremidades encontram-se as epífises, formadas, principalmente, por osso esponjoso, recoberto por uma delgada camada de osso compacto.

Nos indivíduos adultos, o osso esponjoso da diáfise continua-se diretamente com a cavidade medular da diáfise. Quando o indivíduo está em desenvolvimento, cada epífise apresenta-se separada da diáfise por uma placa cartilaginosa definida como disco epifisário. A cartilagem constitui a zona de crescimento do osso em comprimento.

O tecido ósseo do ponto de vista microscópico é classificado como osso imaturo ou primário e osso maduro ou lamelar. O tecido ósseo primário apresenta fibras colágenas dispostas em várias direções sem organização definida, com menor quantidade de minerais e maior porcentagem de osteoblastos e osteócitos. O osso lamelar é constituído por sistemas de Havers. Cada sistema, também chamado de ósteon, com diâmetro inferior a 0,4 mm, apresenta-se constituído por um longo cilindro, eventualmente bifurcado, envolvido por 4 a 20 lamelas ósseas concêntricas com um canal central, denominado canal de Havers. Este canal apresenta comunicação com a superfície externa do osso e com o canal medular por meio de canais dispostos transversal ou obliquamente, chamados de canais de Volkmann. Internamente, esses canais contêm vasos e nervos.

Em toda superfície externa do osso, com exceção das superfícies articulares, encontra-se o perióstio. Ele é constituído por tecido conjuntivo fibroso na sua parte externa, com poucas células e vasos. A camada interna apresenta-se constituída por tecido conjuntivo frouxo, com células osteogênicas e uma rica rede de vasos, a qual está em contato direto com o osso.

Nas crianças, a cobertura perióstica é espessa e fragilmente aderida à cortical e produz prontamente osso novo; nos adultos, ao contrário, o perióstio torna-se progressivamente fino, mais aderido à cortical e produz

osso lentamente. Isto explica, em parte, porque as fraturas se consolidam mais depressa nas crianças do que nos adultos.

Revestindo as cavidades do osso esponjoso, canal medular, os canais de Havers e os de Volkmann encontra-se o endósteo, formado por uma delgada camada de tecido conjuntivo que contem células com funções de nutrir o tecido e servir como fonte de osteoblastos para o crescimento e reparação dos ossos.

As lamelas ósseas possuem cavidades denominadas lacunas, no interior de cada uma delas encontra-se um osteócito. Das lacunas partem canalículos que permitem comunicações entre si. Através desses, os osteócitos vizinhos comunicam-se por meio de seus prolongamentos o que permite fluxo intercelular de metabólitos essenciais para a manutenção do tecido ósseo.

O osso é composto de matriz orgânica fortalecida por depósitos de sais de cálcio. O osso compacto contém, em peso, cerca de 30% de matriz e 70% de sais. A matriz orgânica está constituída de 90 a 95% de fibras colágenas, sendo o restante denominado substância fundamental amorfa. As fibras colágenas estendem-se, principalmente, em torno das linhas de força tensional. A síntese e a mineralização do colágeno no osso são intimamente coordenadas. Observam-se velocidades diferentes de síntese do colágeno em ossos diferentes e em áreas diferentes do mesmo osso (FIRSCHEIN, 1967).

Os constituintes mais importantes do osso são o fosfato e cálcio. Há também outros íons presentes como: magnésio, carbonato, sódio, potássio, ferro, cobre, chumbo, manganês, estanho, alumínio, estrôncio, boro, cloreto, fluoreto, silício, níquel, zinco (SANTOS & GARCIA, 1992).

Embora se saiba que a composição química do cristal ósseo pode variar durante a vida, considera-se a hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ como

o principal componente cristalino inorgânico, que constitui cerca de 23% em massa dos ossos e 90% do esmalte dental (DE GROOT, 1981).

Nas micrografias eletrônicas, os cristais de hidroxiapatita aparecem sob a forma de agulhas ou tabletes alongados, medindo 40X25X3nm. Esses cristais se arranjam ao longo das fibrilas colágenas e são envolvidos por substância fundamental amorfa. Os íons da superfície do cristal de hidroxiapatita são hidratados, existindo, portanto, uma camada de água e íons em volta do cristal. Essa camada, denominada capa de hidratação, facilita a troca de íons entre o cristal e o líquido intersticial. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

2.2 Reparo ósseo

O reparo do tecido ósseo cortical pode se processar por dois modos diferentes, o primário e o secundário. No processo primário, a reparação do osso ocorre sem a formação de calo, enquanto o secundário, que é o mais frequente, envolve a formação de um calo ósseo (HENCH & ETHRIDGE, 1982).

O processo de reparação primário da fratura ocorre quando existe imobilização suficiente no foco da fratura e em lesões incompletas. Por este processo, novos ósteons são formados diretamente na extremidade da fratura, os quais são nutridos diretamente por vasos do endósteo e do periósteo (HENCH & ETHRIDGE, 1982).

A reparação secundária se desenvolve quando, no local da fratura, muitos vasos sangüíneos são rompidos e o sangue, liberado na região, coagula, formando um hematoma. O pH da região cai de cerca de 7,4 para até 5,2 de modo a facilitar a descalcificação, reabsorção e remodelação do osso necrótico. Ocorre uma rápida queda na concentração de colágeno e um

aumento na concentração de mucopolissacarídeos. Há pronunciada proliferação fibroblástica no período de 1 a 2 dias após a lesão e, paralelamente, o local é invadido por capilares (HENCH & ETHRIDGE, 1982).

Após uma semana, a concentração de mucopolissacarídeos diminui e aumenta a concentração de colágeno, produzido por fibroblastos, condroblastos e osteoblastos. Inicia-se a formação de osso trabecular, fibras colágenas substituem o sangue coagulado do calo e o pH começa a aumentar. Com 2 semanas, todo o coágulo é substituído por matriz colágena e condroblastos, os quais são vistos entre a matriz e o osso neoformado. A maior taxa de deposição de osso mineralizado ocorre entre a segunda e a terceira semana. Entre a terceira e a quarta semana, ocorre substituição dos condroblastos por osso. Após 5 semanas, a principal atividade é a remodelação do osso trabecular com a deposição de osso cortical (HENCH & ETHRIDGE, 1982).

Outro fator que age na recuperação ou remodelação óssea é a diferença das tensões mecânicas aplicadas ao osso. Segundo a teoria da “histogênese casual”, o osso se orienta estruturalmente ao longo das linhas de forças aplicadas ao mesmo e tensões de cisalhamento estimulam a formação de tecido conjuntivo. É sabido que a forma estrutural do osso é gerada pela orientação das fibras de colágeno e que essas fibras são capazes de gerar potenciais bioelétricos (ENGELHARDT, 1984). O sinal destes potenciais depende do tipo de tensão, ou seja, tensões de compressão produzem potenciais negativos que estimulam a deposição óssea e vice-versa.

2.3 Enxertos ósseos e periostais

Transplantes ósseos e periostais são geralmente empregados quando não há recuperação dos ossos fraturados ou quando partes substanciais são destruídas por acidentes ou por doença. São também úteis para determinadas reconstituições da face por cirurgões plásticos e, eventualmente, empregados para proporcionar união entre ossos separados devido a articulação comprometida. O uso clínico desses enxertos baseia-se na capacidade osteocondrogênica do perióstio, da medula óssea e do osso esponjoso, demonstrada por vários autores.

Com o propósito de desenvolver um enxerto mais eficiente para corrigir perdas de substância óssea da mandíbula, BOYNE (1970), estudou o potencial osteogênico da medula óssea e osso esponjoso, isolados em câmaras com microfiltros. Entre os vários procedimentos utilizados no experimento, ele obteve maior quantidade de osso em transplantes de osso esponjoso com medula óssea, quando implantados subperiostealmente. Segundo o autor, os resultados sugerem a existência de fatores inerentes à área receptora que estimulam a osteogênese e inibe a função hematopoiética predominante da medula.

RUBAK (1983), desenvolveu um modelo experimental onde estudou a influência de osso esponjoso e osso cortical na diferenciação das células do perióstio da tibia quando transplantados sobre o osso ilíaco de coelhos. Nos dois procedimentos foi notada a proliferação e diferenciação das células da camada interna do perióstio. No entanto, maior quantidade de osso foi produzida onde o perióstio permaneceu em contato com o osso esponjoso.

SATOH et al. (1983), descreveram o uso clínico de um enxerto músculo-periosteal vascularizado, obtido na fossa ilíaca, para a correção de uma fratura da tibia, com grande perda de substância óssea. Evidências

radiológicas da formação de osso foram observadas duas semanas após à cirurgia e com cinco meses a consolidação da fratura foi confirmada. Segundo os autores, não há dúvidas de que o periósteo participou da reparação óssea.

JAROMA & RITSILÄ (1987), relatam em um estudo experimental em coelhos, que transplante periostal livre formou rapidamente tecido condrogênico proveniente de células periostais e a formação de cartilagem ocorreu seis semanas após implantação. Após vinte semanas, a região da patela condroctomizada estava espessa e semelhante à cartilagem hialina.

SHENG et al. (1989), publicaram resultados do uso clínico e experimental de transplantes vascularizados do periósteo da fossa ilíaca, para a reparação de fraturas do colo do fêmur. No estudo experimental para acompanhar o processo de reparação, fraturas induzidas no colo do fêmur de cães foram completamente preenchidas com osso doze semanas após o transplante. Onze pacientes com fratura do colo do fêmur foram tratados com enxerto de periósteo da fossa ilíaca, pediculado na artéria circunflexa ilíaca profunda. Em todos os casos ocorreu uma boa consolidação da fratura, sem qualquer complicação na cabeça do fêmur. Alguns casos foram acompanhados até seis anos após a cirurgia.

SAKAI et al. (1991), sugeriram o uso do periósteo acompanhado com uma camada delgada de osso cortical. Eles utilizaram, clinicamente, transplantes corticoperiostais vascularizados, obtidos do côndilo medial do fêmur para a correção de fraturas não consolidadas do membro superior. Os seis pacientes tratados apresentaram união das fraturas dois meses e meio após a cirurgia. Os autores concluíram que a técnica é eficiente e apresenta algumas vantagens sobre os métodos tradicionais.

2.4 Implante de hidroxiapatita

A utilização de materiais aloplásticos como substituto de tecido levaram pesquisadores a considerar a influência desses materiais na resposta tecidual e reação interfacial. Fatores como biocompatibilidade, forma do implante, tipo de superfície do implante e estado do tecido que recebe o implante parecem interferir nos resultados obtidos. Estes fatores não agem sozinhos, mas se interrelacionam uns com os outros. (ALBREKTSSON & ALBREKTSSON, 1988).

De acordo com a resposta desenvolvida na interface tecido vivo/implante, os biomateriais utilizados para implantes ósseos são classificados em 4 tipos principais (HENCH & ETHRIDGE, 1982; HENCH, 1991):

Tipo 1- material denso (microporoso), quase inerte;

Tipo 2- material poroso (macroporoso), quase inerte;

Tipo 3- material denso (microporoso), superfície reativa e

Tipo 4- material reabsorvível.

Os materiais tipo 1 são aqueles que provocam a formação de uma cápsula fibrosa de espessura, variando de acordo com o material implantado e separa o material do tecido ósseo hospedeiro. Esta cápsula, apesar de ser adjacente ao tecido, não é ligada química ou biologicamente ao implante e resulta no movimento da interface tecido/biomaterial quando sob stress, limitando a vida útil de muitos materiais. Exemplos deste tipo de material são as cerâmicas de alumina densa, borracha de silicone, aço inoxidável.

Os materiais tipo 2 permitem o crescimento de tecido ósseo através de seus poros, resultando em uma ligação mecânica que aumenta a resistência do implante devido ao grande entrelaçamento ocorrido.

Exemplos são as cerâmicas porosas de alumina, cerâmicas porosas de hidroxiapatita, metais revestidos com hidroxiapatita.

Os materiais do tipo 3 induzem uma reação biológica, resultando na formação de osso entre o tecido e o implante através de uma ligação química, ao contrario do que fazem os do tipo 1 e 2. Exemplos são biovidros, cerâmicas vítreas bioativas.

Os materiais tipo 4 são desenvolvidos para serem repostos por tecido em regeneração ao mesmo tempo em que eliminam a interface original. Exemplos são o sulfato de cálcio, fosfato de cálcio.

Os fosfatos de cálcio (hidroxiapatita - HA, fosfato tricálcio - TCP, ou a mistura de ambos) apresentam excelente biocompatibilidade e se ligam diretamente ao osso, sem interposição de qualquer outro tipo de tecido (BARTH, et al., 1988; GEESINK et al., 1987; GROSS et al., 1990; JANSEN & GROOT, 1988; JARCHO, 1981; LANGE & DONATH, 1989). Isto é explicado pelo fato destes materiais serem compostos dos mesmos íons que compõe a fase mineral do osso natural, sendo, portanto, capazes de participar do equilíbrio cálcio fosfato no organismo (BARTH et al., 1988).

A composição química e estrutural da hidroxiapatita sintética (HA) é similar ao osso humano. Sendo amplamente difundida na prática médica e odontológica como osteocondutor (CARVALHO, 1994).

A biocompatibilidade da hidroxiapatita, obtida de forma sintética, tem sugerido seu uso não somente por sua composição, mas pelos resultados obtidos em implantes *in vivo*. Demonstra ausência de toxicidade local ou sistêmica, não provoca inflamação ou resposta a um corpo estranho (JARCHO, 1981; SOCARRÁS, 1991). Tem sido observado aposição direta de osso neoformado em contato com a hidroxiapatita, sem a presença de tecido fibroso (RICCI et al. 1986).

A hidroxiapatita exibe propriedade osteocondutora quando implantada em defeitos ósseos. A formação de novo osso inicia-se na borda do defeito e é conduzido através do implante, formando uma ponte entre o osso e a HA. A porosidade influi na eficácia da condução do crescimento tecidual para o seu interior. EGGLI et al. (1988), demonstram em estudo experimental com coelhos que o osso se forma melhor em poros entre 50 a 100 μm .

Apesar das várias aplicações cirúrgicas em odontologia e cirurgia craniomaxilofacial, a hidroxiapatita não tem sido extensivamente utilizada em ortopedia. Muitos pesquisadores relatam a migração de partículas ou a ausência de reabsorção como os principais inconvenientes. Há, entretanto, um interesse crescente na utilização de HA para o recobrimento de implantes ortopédicos. Segundo GEESINK (1989), o revestimento com hidroxiapatita diminui o tempo necessário para que o osso se integre ao implante.

RAGNI et al. (1993), investigaram a fusão vertebral experimentalmente em coelhos, usando grânulos e blocos de hidroxiapatita porosa em várias combinações; com matriz óssea desmineralizada, com proteína óssea morfogenética e com medula óssea autógena. Dois meses após à cirurgia, os resultados radiográficos e histológicos revelaram fusão vertebral especialmente no grupo implantado com blocos de hidroxiapatita, associados com enxerto ósseo autógeno.

LEUTENEGGER (1994), investigou radiologicamente implantes de hidroxiapatita na forma de blocos, utilizados em pacientes com defeitos ósseos, criados cirurgicamente, devido a curetagem de tumores. Acompanhados por um período de 10 a 78 meses. As radiografias revelaram grande quantidade de osso ao redor dos blocos de hidroxiapatita com um ano após implantação, depois, decrescendo gradualmente. Os

blocos de hidroxiapatita demonstraram-se biocompatíveis e resistentes à degradação.

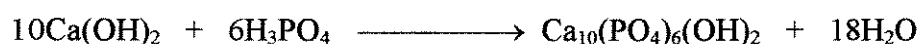
SUOMINEN et al. (1995), utilizaram cerâmicas vítreas de hidroxiapatita para o preenchimento de cavidades na metáfise proximal da tíbia de coelhos, comparando-a com enxerto ósseo autógeno. Seus resultados revelaram que, três semanas após a cirurgia, o enxerto ósseo autógeno produziu igual quantidade de osso quando comparado com o implante de HA. Depois desse período, o enxerto autógeno foi rapidamente absorvido enquanto no grupo com HA ainda foi observado deposição de osso neoformado. Segundo os autores, a HA demonstrou-se biocompatível e com bom potencial osteocondutivo.

TAKESHITA et al. (1997), estudaram o comportamento de HA densa no preenchimento de cavidades na tíbia de ratos. Seus resultados revelaram, inicialmente, a presença de tecido fibroso, envolvendo parcialmente o implante. Já, no final de 168 dias, após implantação, verificou-se contato direto entre o implante e a cinta óssea, formada ao seu redor.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SÍNTESE DO PÓ DE HIDROXIAPATITA

A HA foi sintetizada pelo Instituto de Química - UNICAMP, utilizando o método de precipitação a partir de uma suspensão de hidróxido de cálcio e uma solução de ácido fosfórico, segundo a reação: (OSAKA, et al., 1991)



Em um béquer, foi adicionada uma solução de H_3PO_4 0,3 mol/L a uma suspensão contendo 0,5 mol de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ disperso em um litro de água, a uma velocidade de aproximadamente 7 ml/min, sob agitação magnética e temperatura reacional de 60 °C. O pH da reação foi mantido em torno de 8 com adição de NH_4OH . Terminada a adição, a suspensão foi mantida sob agitação a 60 °C por um dia. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada e seco em estufa a 60 °C. O material foi triturado, resultando em pó fino.

3.1.1 Confecção dos corpos cerâmicos densos

Os corpos de hidroxiapatita densa (HAD) foram preparados por prensagem, umedecendo o material em pó com uma solução de álcool polivinílico 0,2 % (massa/volume), obtendo-se uma pasta moldável. Esse material moldável foi colocado dentro de um cilindro de vidro de 3,0 mm de diâmetro interno, foi compactado com auxílio de um pequeno tubo de vidro

de diâmetro igual ao do cilindro, formando um bastão de aproximadamente 1 cm de comprimento, que foi então extrudado. O bastão assim confeccionado foi seco em estufa a 60 °C por um período mínimo de uma hora e sinterizado a 1000 °C por 3 horas (KAWACHI, et al., 1997)

3.1.2 Confeção dos corpos cerâmicos porosos

Para a preparação dos corpos de hidroxiapatita porosa (HAP) foi misturado 50 % de massa de HA e sacarose molhada com álcool polivinílico 0,2% saturada com sacarose e levada à estufa para secar a 60 °C por um período mínimo de uma hora e sinterizado a 1000 °C por 5 horas. Em seguida, este material foi levemente desagregado, separado granulometricamente em peneira de 0,053 mm e misturado com 25 % em massa de sacarose, molhada com solução de PVA. Estes materiais foram prensados em cilindro de vidro, da mesma forma como foram feitos os corpos densos. Os bastões foram secos e sinterizados conforme descritos acima (KAWACHI, et al. 1997).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

3.2.1 Determinação da composição de Ca e de P

A razão molar Ca/P é uma das formas utilizadas para caracterizar a composição dos diferentes fosfatos de cálcio, principalmente das apatitas que podem apresentar diferentes composições. Os dois elementos foram determinados separadamente, utilizando métodos convencionais: titulação complexométrica para o cálcio e espectrofotometria de absorção para o fósforo segundo metodologia de VOGEL, 1978.

3.2.2 Razão molar Ca/P

Composto	Ca/P teórico	Ca/P experimental
HA	1,67	1,91±0,009
HA sinterizado a 1000 °C	1,67	1,73±0,02

3.2.3 Porosimetria de mercúrio

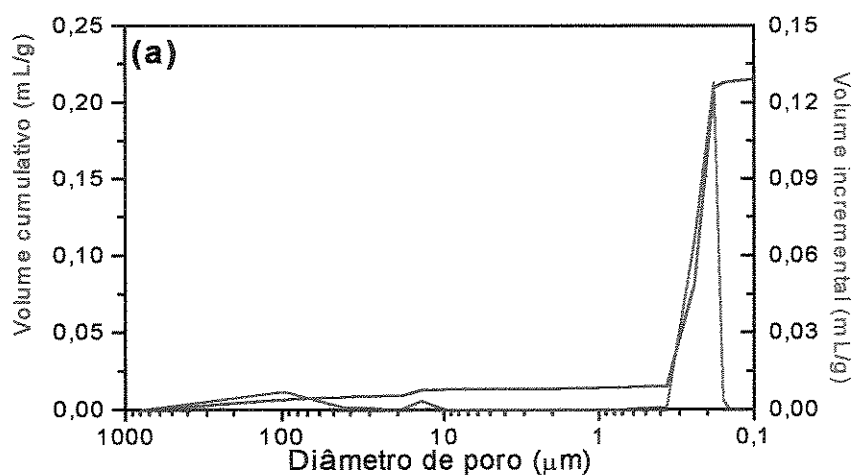
A porosimetria de mercúrio tem sido muito utilizada para a caracterização da estrutura porosa de cerâmicas. O princípio do método reside no fato do mercúrio agir como substância não molhável à maioria dos materiais. Consequentemente, ele não é absorvido na superfície dessa substância, sendo necessária a aplicação de uma pressão para que o mercúrio penetre nas aberturas e rachaduras do material. Esta técnica foi mencionada pela primeira vez em 1842 por SMETANA, mas apenas em 1921 é que WASHBURN sugeriu como a distribuição de tamanhos de poros poderia ser obtida a partir de dados de pressão-volume, para penetração de mercúrio dentro dos poros do material.

A técnica de porosimetria de mercúrio é capaz de medir poros que apresentam diâmetros de 200 μm até 14 nm e áreas superficiais de até 25 cm^2/g têm sido determinadas.

A análise dos tamanhos de poros foram realizadas em um aparelho Poresizer da Micromeritics, modelo 9320.

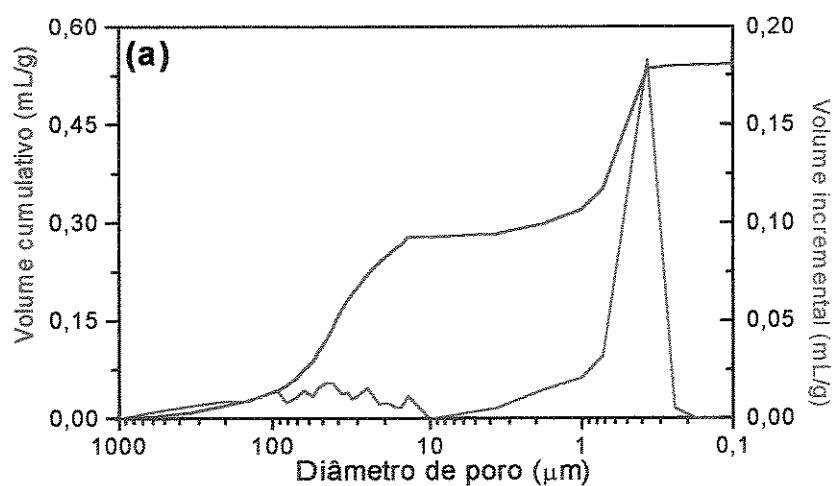
Nos porogramas que seguem, a curva em vermelho representa o volume total de mercúrio que penetrou em toda a amostra a cada diâmetro de poro, ou seja, a cada pressão aplicada e a curva azul representa o volume

de mercúrio que penetrou na amostra em um dado valor de diâmetro de poro ou de pressão aplicada.



Porogramas dos corpos cerâmicos densos de HA

A porosimetria dos corpos cerâmicos densos de HA revelou microporos da ordem de 0,2 μm de diâmetro, conforme ilustra o quadro.



Porograma dos corpos cerâmicos porosos de HA.

A porosimetria dos corpos cerâmicos porosos de HA revelou microporos na faixa de 0,4 μm de diâmetro e na faixa de 100 μm , conforme ilustra o quadro.

A grande quantidade de poros diminuiu sensivelmente a resistência mecânica da cerâmica, sendo possível no entanto manipular o material sem que ele se desagregasse.

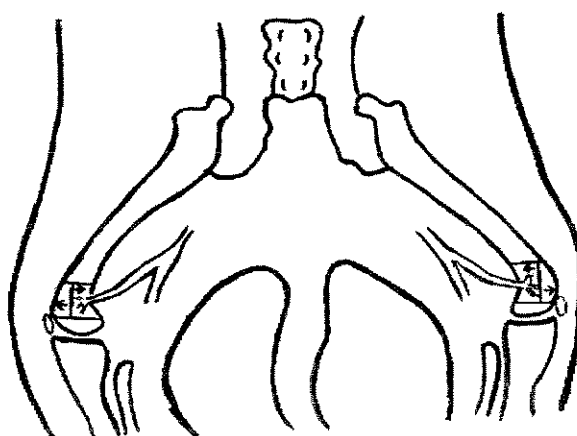
3.3 ESTUDO “IN VIVO”

Foram utilizados 42 ratos Wistar machos com oito semanas de idade com aproximadamente 250 gramas de peso, fornecidos pelo CEMIB - Unicamp.

Os animais foram anestesiados com solução de Pentobarbital 50 mg/kg, via intraperitoneal, e os fêmures direito e esquerdo de todos animais foram operados.

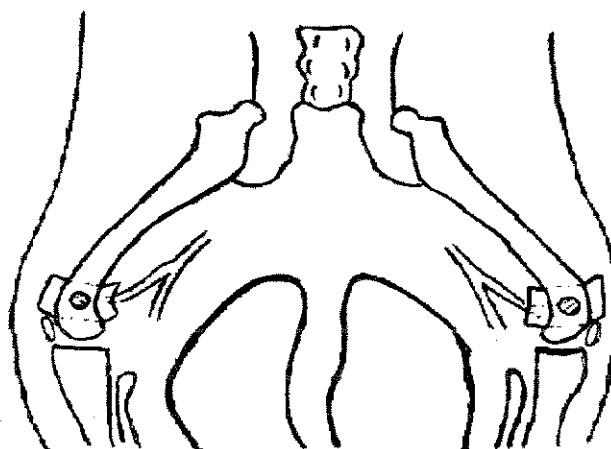
3.3.1 Procedimento cirúrgico

Após a tricotomia, foi feita incisão na face medial da coxa do animal. O músculo quadríceps femoral foi separado dos adutores e afastado ântero-lateralmente. Exposta a diáfise do fêmur, foram feitas acima do disco epifisário, na face antero-medial, de sua extremidade distal três incisões no periósteo. Duas transversais com intervalo de aproximadamente um centímetro e uma longitudinal entre as duas, conforme esquema abaixo.



A partir da incisão longitudinal, a cortical do osso foi exposta, afastando-se cuidadosamente o periósteo, delimitado entre as incisões transversais. Esse procedimento foi realizado, raspando-se firmemente a superfície do osso com a lâmina do bisturi, para preservar a camada interna osteogênica do periósteo.

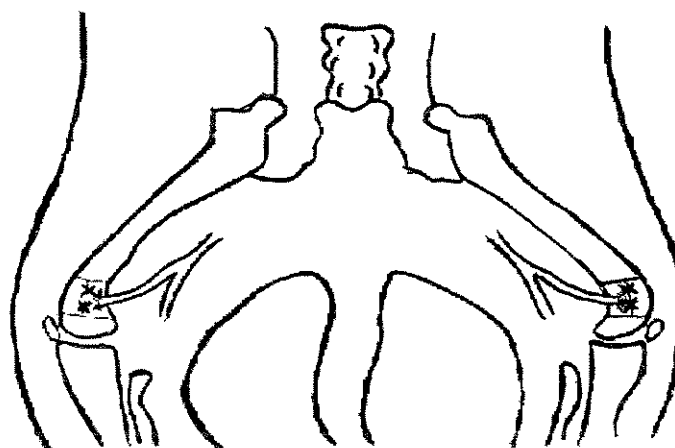
Com o auxílio de uma broca acoplada a um minimotor de baixa rotação, a cortical foi completamente desgastada sob irrigação de solução fisiológica e o osso esponjoso subjacente removido com uma cureta. A cavidade produzida, depois de lavada, foi preenchida com um corpo cerâmico de forma cilíndrica, conforme esquema abaixo.



No fêmur esquerdo dos animais do grupo experimental, foi utilizado material denso, enquanto no direito material poroso. Nos animais do grupo controle as cavidades foram deixadas vazias.

Depois de colocado o implante, o periósteo foi reposicionado através da sutura de suas bordas com fio de seda 8.0, de tal forma que a cavidade

ficou completamente revestida por ele. A dilaceração no músculo e a incisão da pele foram fechadas com fio de algodão 4.0, conforme esquema abaixo.



3.3.2 Organização dos grupos experimental e controle

Foram formados dois grupos: experimental e controle, com 36 e 6 animais respectivamente.

Os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo 3 ratos, tratados com ração balanceada e água *ad libitum*. O grupo experimental foi subdividido em 6 subgrupos de 6 animais e o grupo controle em 6 subgrupos de 1 animal, os quais foram sacrificados por inalação de éter e posterior abertura da cavidade torácica, com 01, 02, 04, 08, 16 e 24 semanas respectivamente, após à cirurgia.

3.4 TÉCNICAS UTILIZADAS

Após o sacrifício, os fêmures foram removidos, cuidadosamente dissecados para remoção de todo tecido muscular. Posteriormente, observações macro e esterioscópicas do local de implante foram realizadas.

Em seguida, os ossos foram fixados em formol tamponada 10% por 72 horas e fotografados. Para a avaliação dos resultados foram utilizados os seguintes procedimentos:

3.4.1 Microrradiografia:

Nesta etapa, as amostras de dois animais de cada subgrupo experimental foram fixadas, desidratadas, desengorduradas e embutidas como segue: (MARIOLANI, 1994)

DESIDRATAÇÃO:- As amostras foram deixadas por 1 hora em álcool 70%, 1 hora em álcool 80%, 1 hora em álcool 90% e 16 horas em álcool absoluto.

DESENGORDURAMENTO:- As amostras foram deixadas 6 horas em álcool/acetona 50/50% e 16 horas em acetona.

SECAGEM:- As amostras foram deixadas por 6 horas ao ar.

EMBUTIMENTO:- Realizado em resina de poliéster de cura a frio.

As amostras foram cortadas em uma máquina ISOMET com disco diamantado de 3 mm de espessura e 100 mm de diâmetro a uma rotação de 2500 rpm sob irrigação de água. As fatias foram cortadas no sentido longitudinal ao maior eixo do fêmur de forma que foram obtidos secções transversais da HA. Foram obtidos cortes com espessura de 2 e 3 mm.

Os cortes foram radiografados em um gerador de raios X RIGAKU RU-200 que possui um ponto focal de 0.5X10.0mm. Foi empregado radiação de cobre filtrado por níquel ($\lambda = 1.5418$ anguistron). Para obtenção das radiografias, foi construído um cassete especial onde era carregado com 1 chapa para raios X e a amostra fixada com graxa de vácuo. Foi utilizada uma corrente de 20 KV/ 15 MA e distância entre o filme e o feixe de

radiação igual a 18 cm. O tempo de exposição foi de 6 segundos. Utilizou-se filme grão fino para raios X industrial kodak, medindo 4,5 X 4,5 cm.

3.4.2 Cortes histológicos:

Após fixação, as amostras de quatro animais de cada subgrupo experimental e as amostras do grupo controle foram descalcificadas em uma solução de ácido fórmico, formol e citrato de sódio. Em seguida, os ossos foram reduzidos e incluídos em parafina. Foram obtidos cortes longitudinais seriados do osso com 7µm de espessura, corados com HE.

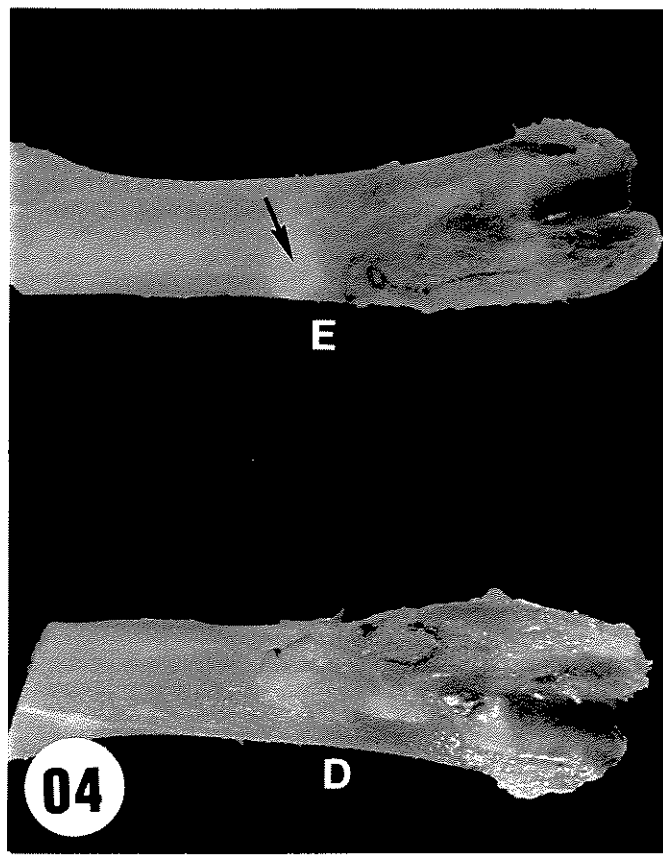
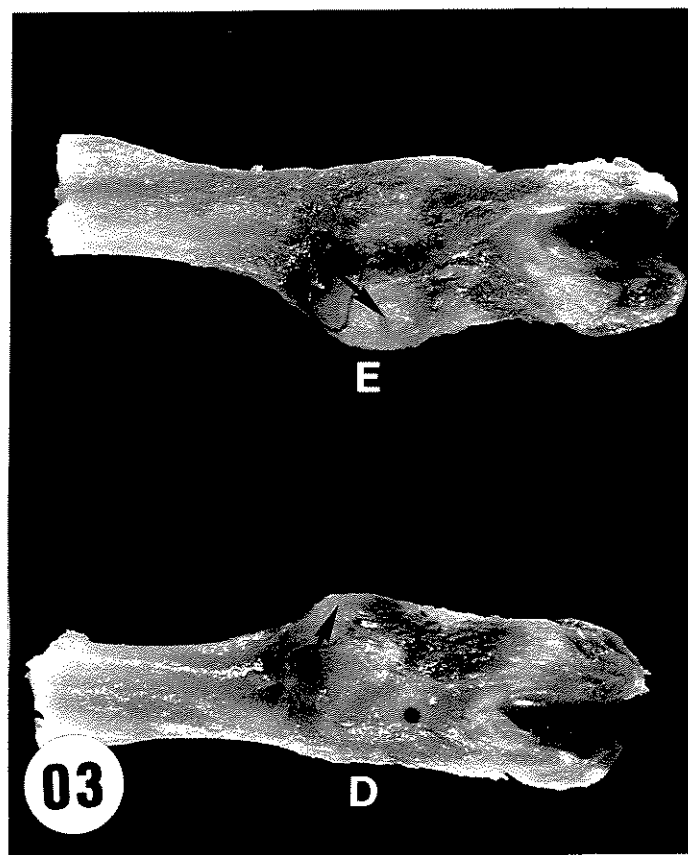
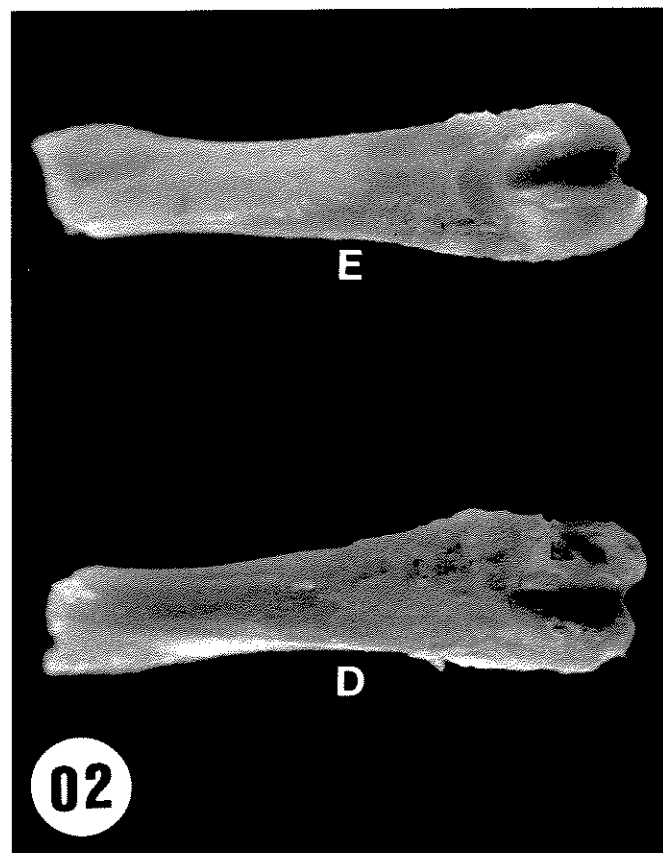
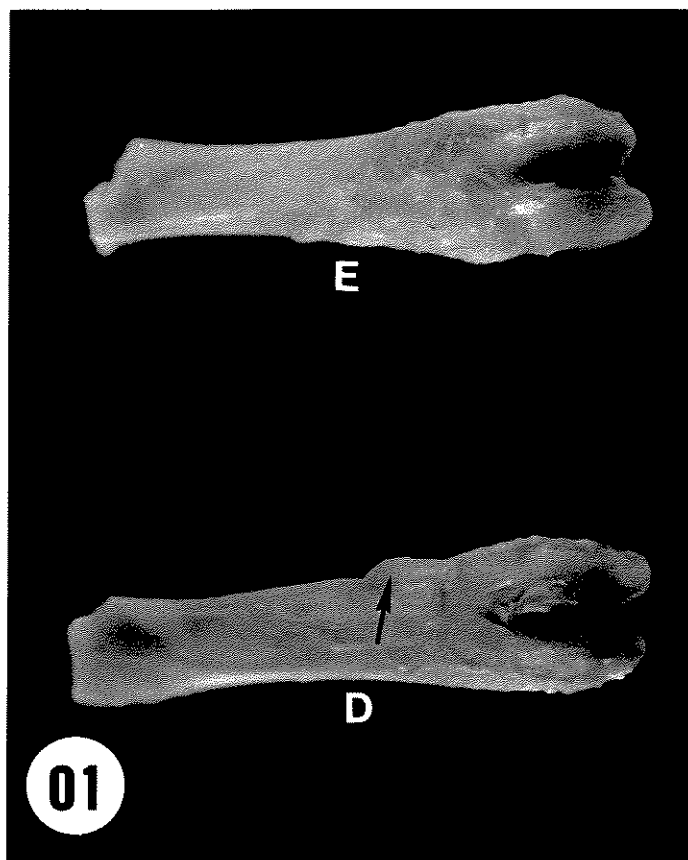
4.0 RESULTADOS

4.1 OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS

Nos animais usados como controle, sem o implante de HA, um pequeno calo pôde ser observado sobre o local onde a cavidade óssea foi produzida, uma semana após à cirurgia. Com duas, quatro, oito, dezesseis e vinte e quatro semanas os fêmures apresentam, macroscopicamente, aspecto normal (figs.01 e 02).

Nos animais experimentais, sobre os locais onde foram realizados os implantes, notou-se a presença de um calo de aspecto esbranquiçado em todos os animais sacrificados, uma e duas semanas após à cirurgia. Em todos os casos, o calo formado no fêmur esquerdo, que recebeu a HA densa, foi mais desenvolvido que o calo do fêmur direito com HA porosa (fig. 03). Após quatro semanas, dos seis casos estudados, somente um dos animais apresentou um pequeno calo no fêmur esquerdo com HA densa.

Nos períodos de oito, dezesseis e vinte e quatro semanas, em nenhum dos animais, tanto no fêmur esquerdo como no direito foi possível notar a presença do calo no local do implante. Nos animais com dezesseis e vinte e quatro semanas foi possível visualizar no fêmur esquerdo a presença do cilindro de HA densa ocupando o interior do canal medular (fig.04). Fato este, não observado nos fêmures direitos que receberam implante de HA porosa.



4.2 OBSERVAÇÕES RADIOGRÁFICAS

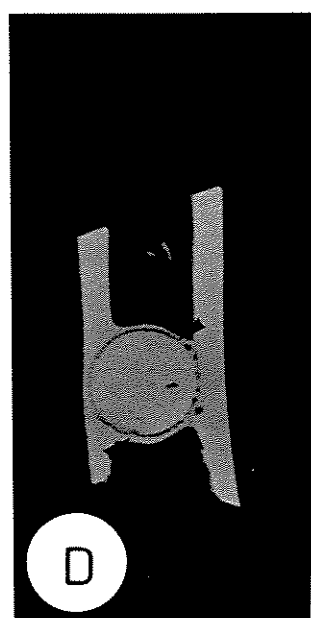
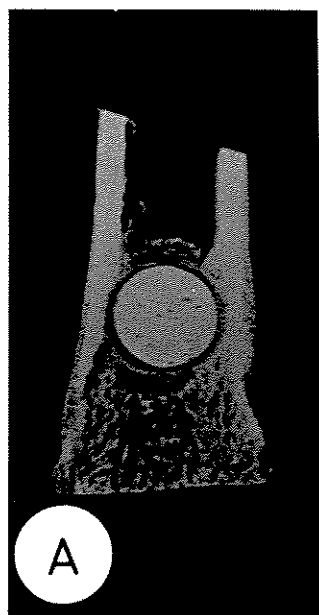
4.2.1 Implante de hidroxiapatita densa

O cilindro de HA apresenta radiopacidade semelhante ao osso cortical do fêmur e toda extensão da interface osso/implante é quase sempre definida.

Uma semana após à cirurgia, observou-se ao redor do implante uma delicada, no entanto, espessa rede de trabéculas ósseas neoformadas pouco radiopaca nas radiografias. Com duas semanas, essa rede ficou mais radiopaca e notou-se diminuição do seu volume. Na interface pôde-se observar trabéculas contínuas com a face interna da cortical do fêmur (Fig.05-A).

Depois de quatro e oito semanas, o osso, formado ao redor do implante, apareceu como uma fina camada de osso compacto, com poucas trabéculas, sendo evidenciadas. Em alguns cortes, principalmente aqueles mais próximos da cortical do osso, a interface implante/osso deixou de ser bem definida nas radiografias, devido ao contato entre o osso e a superfície do implante de HA (Fig. 05-B e C).

Nas radiografias dos animais com dezesseis e vinte e quatro semanas, notou-se ainda a presença de uma camada de osso compacto ao redor do implante, no entanto, ficou evidente a diminuição na sua espessura. As trabéculas ósseas contínuas com o tecido ósseo do fêmur, apareceram mais radiopacas, pois estavam em contato com a superfície do implante. Essas trabéculas foram encontradas principalmente nas áreas próximas à cortical do osso (Fig. 05-D).



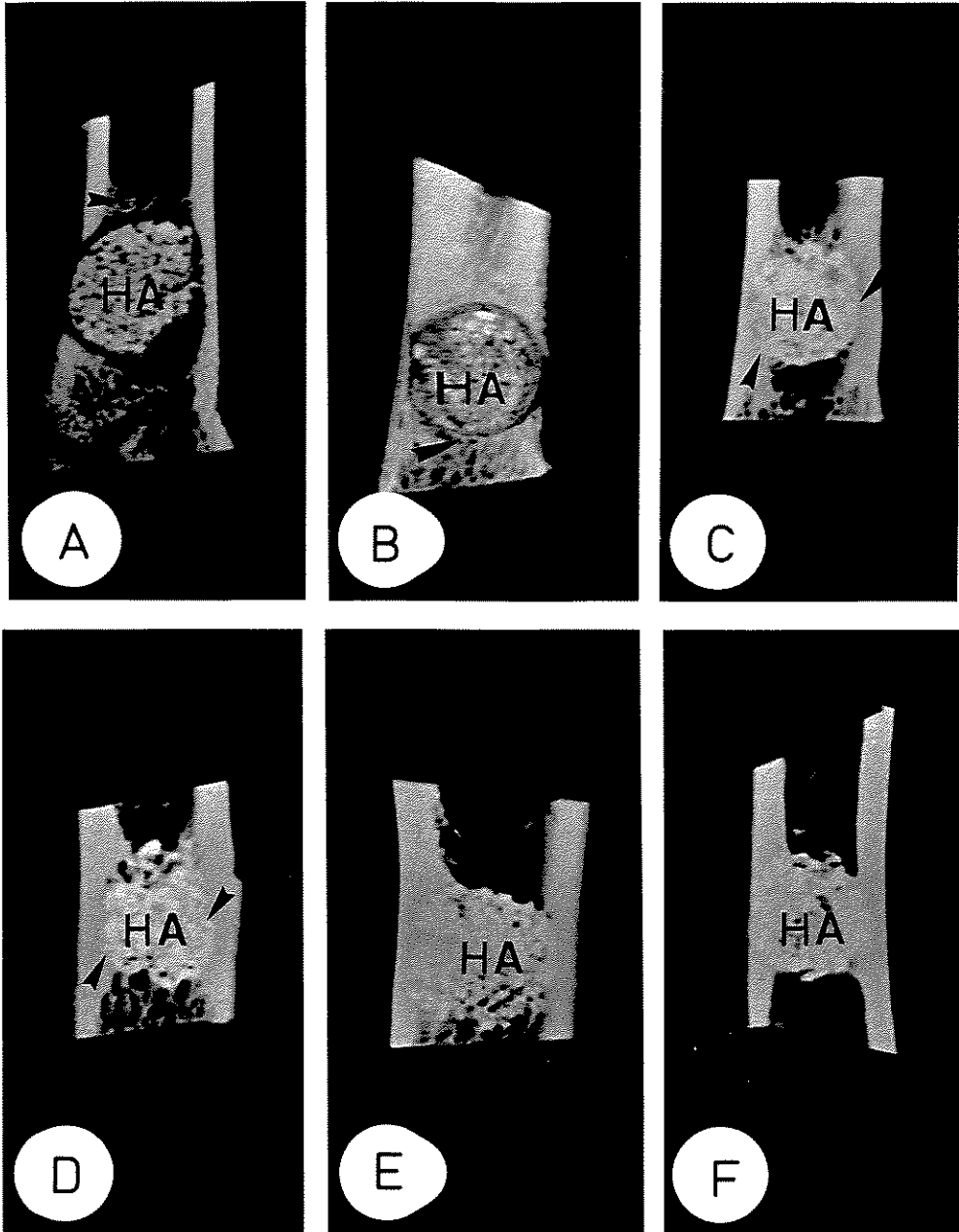
05

4.2.2 Implante de hidroxiapatita porosa

Uma semana após a cirurgia, observou-se, ao redor do implante, uma camada pouco radiopaca de tecido ósseo com aspecto esponjoso, formado por delicadas trabéculas. O cilindro de HA apresentou radiopacidade semelhante ao osso compacto do fêmur e a interface implante/osso ficou bem definida. No interior do implante, encontraram-se inúmeras áreas não radiopacas com tamanhos e formas variadas (Fig.06-A). Com duas semanas, o tecido ósseo ao redor do implante apareceu mais radiopaco, no entanto, em menor volume. Notou-se, principalmente, na periferia do implante, a presença de material pouco radiopaco nos espaços entre os grânulos. A falha óssea, produzida no fêmur e revestida pelo periósteo, preencheu-se por tecido ósseo menos radiopaco do que o restante da cortical do osso (Fig. 06-B).

Nas radiografias dos animais com 4 e 8 semanas, a interface implante/osso ficou pouco definida. Existiu uma continuidade entre o osso formado junto ao implante e a face interna do fêmur. Pôde-se notar uma acentuada diminuição no volume de osso, formado ao redor do implante e o preenchimento de quase todos os espaços entre os grânulos. O tecido, formado nesses locais, apresentou-se mais radiopaco com características semelhantes ao osso compacto (Fig. 06-C e D).

Depois de 16 e 24 semanas, não foi mais possível identificar a interface implante/osso. O osso compacto do fêmur confundiu-se com o tecido ósseo que preencheu os poros. O osso formado ao redor do implante, na superfície voltada para o canal medular, foi quase completamente absorvido (Fig. 06-E e F). Inúmeros espaços não radiopacos apareceram entre os grânulos de HA, principalmente nas radiografias dos animais com 24 semanas (Fig. 06-F).



4.3 OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS

4.3.1 GRUPO CONTROLE

4.3.1.1 Uma semana após à cirurgia

No canal medular, notou-se a presença de vasos sangüíneos, células indiferenciadas e cartilagem, juntamente com trabéculas ósseas neoformadas, que preencheu a cavidade produzida no fêmur (fig. 07). Alguns osteoclastos foram observados junto as trabéculas ósseas.

No local onde ocorreu a formação do calo, visto através das observações macroscópicas, notou-se, a presença de cartilagem e trabéculas ósseas neoformadas. Células indiferenciadas, provenientes da camada interna do periósteo, o qual apresentou-se bastante espesso, invadiram a falha óssea produzida no fêmur.

Não se observou células inflamatórias próximo ao local da lesão.

4.3.1.2 Duas semanas após à cirurgia

Na falha da cortical do osso, apareceu trabéculas ósseas neoformadas e vasos sangüíneos localizados subperiostealmente. A camada interna do periósteo, que reveste a falha, apresentou-se bastante espessa e em intensa proliferação de células.

No canal medular, notou-se a diminuição na quantidade de trabéculas ósseas e aumento no volume de medula óssea, ocupando os espaços entre as trabéculas. Vasos sangüíneos e pequena quantidade de células indiferenciadas, também foram encontradas. Eventualmente, osteoclastos foram vistos junto às trabéculas ósseas.

Em nenhum dos casos foi observado a presença de cartilagem próximo ao local da lesão.

4.3.1.3 Quatro semanas após à cirurgia

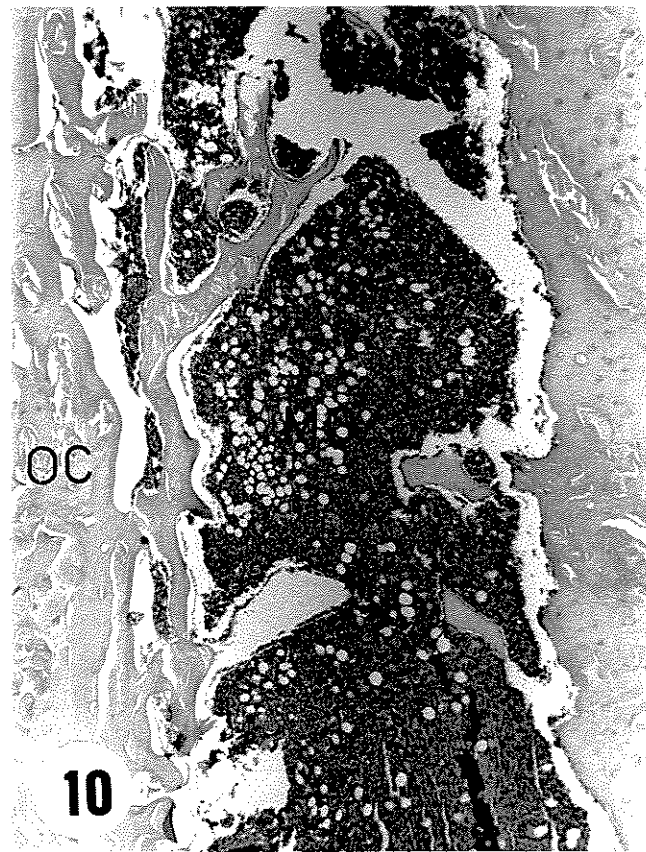
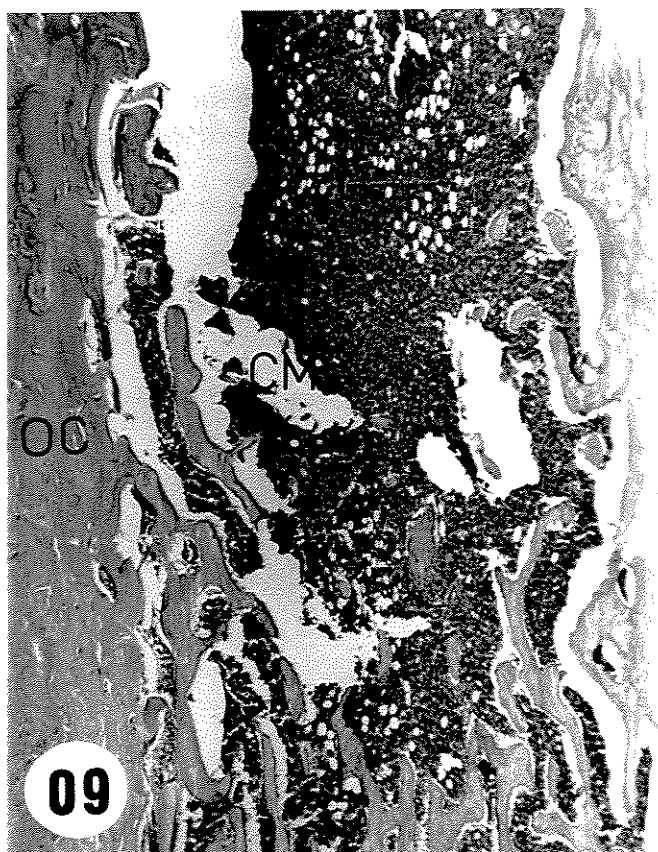
No canal medular, observou-se poucas trabéculas ósseas e um maior volume de medula óssea, preenchendo os espaços entre elas (fig.08). Osteoclastos, eventualmente, estavam em contato com as trabéculas que ocupavam o canal medular.

A falha óssea na cortical apresentou-se totalmente reparada (fig.08), sendo possível notar o periósteo menos espesso e ainda com células em processo de diferenciação.

4.3.1.4 Oito, dezesseis e vinte e quatro semanas após à cirurgia

Não foi possível identificar no canal medular o local onde foi produzida a cavidade. Trabéculas e medula óssea preencheram o interior do canal (figs. 09 e 10).

O tecido ósseo neoformado, subperiostealmente, na falha óssea da cortical, apresentou aspecto semelhante ao tecido ósseo compacto de outras áreas do fêmur (figs. 09 e 10). O periósteo sobre a falha exibiu-se com as duas camadas bem definidas e com pouca atividade osteogênica.



4.3.2 GRUPO EXPERIMENTAL

4.3.2.1 IMPLANTE DE HIDROXIAPATITA DENSE

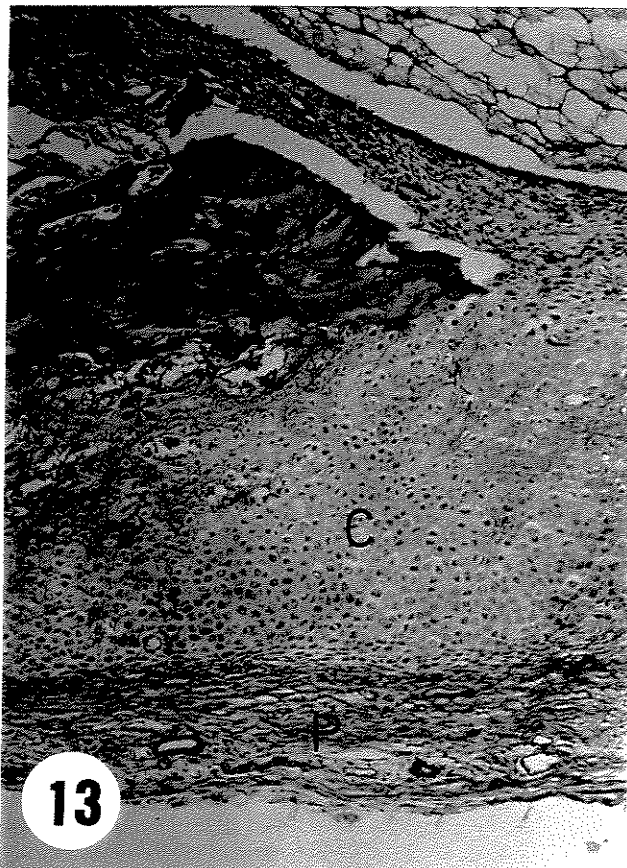
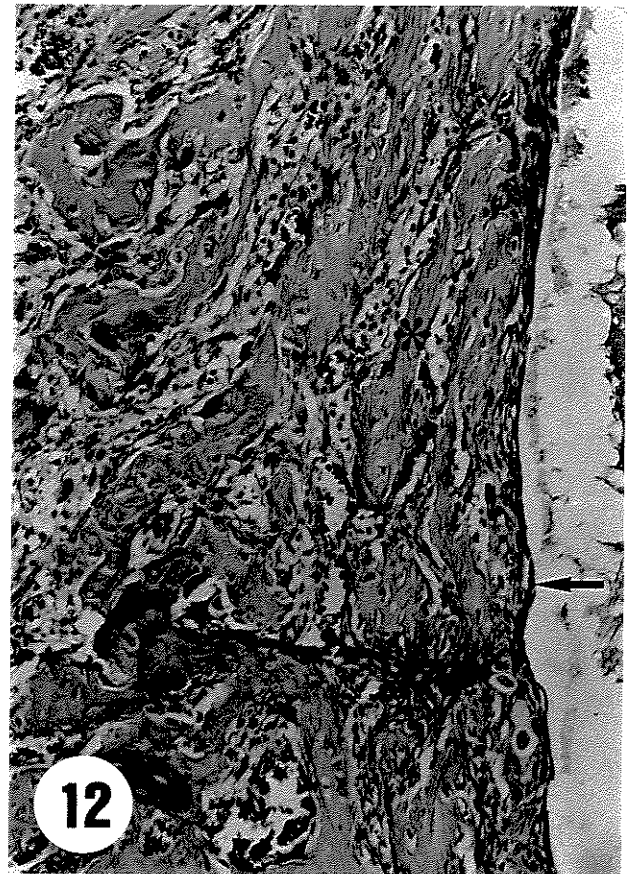
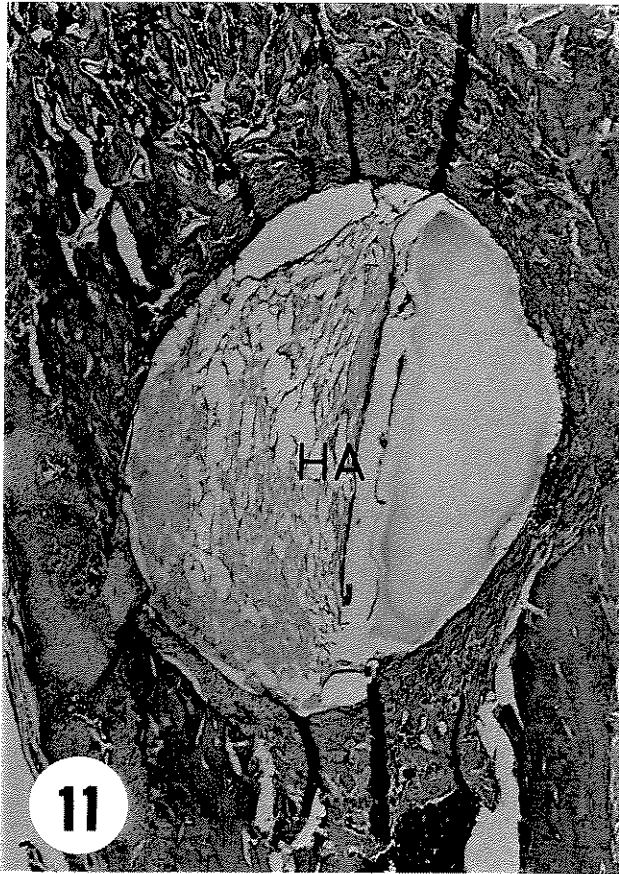
4.3.2.1.1 Uma semana após à cirurgia

No canal medular, observou-se formação de uma espessa camada de osso trabeculado e proliferação de células, ocupando os espaços entre as trabéculas. As trabéculas, localizadas junto à superfície do implante, apresentaram uma disposição predominantemente circular (fig.11).

Na interface osso neoformado e implante, observou-se, envolvendo a superfície de HA, uma delgada camada de células com aspecto fusiforme semelhante a fibroblastos (fig. 12).

No local onde ocorreu a formação de calo, visto através das observações macroscópicas, notou-se a presença de cartilagem e células indiferenciadas, provenientes da camada interna do perióstio que reveste a falha óssea. Os condrócitos, além de preencherem a falha produzida na cortical do fêmur, também invadiram parcialmente a cavidade medular, colocando-se entre a cortical e o implante (fig. 13). Tecido ósseo neoformado foi observado sobre a superfície do fêmur próximo ao local do implante, adjacente à camada interna do perióstio a qual apresentou-se bastante espessa (fig.13).

O cilindro de HA, com exceção de um único caso, foi completamente eliminado pelo processo de descalcificação, restando no local uma rede de fibras sem a presença de células (fig. 14). Eventualmente foram observados grupos de células indiferenciadas que ocuparam pequenos espaços existentes na superfície do implante.



Não foi possível observar a presença de células inflamatórias próximo do local implantado. Poucos osteoclastos foram encontrados junto ao implante.

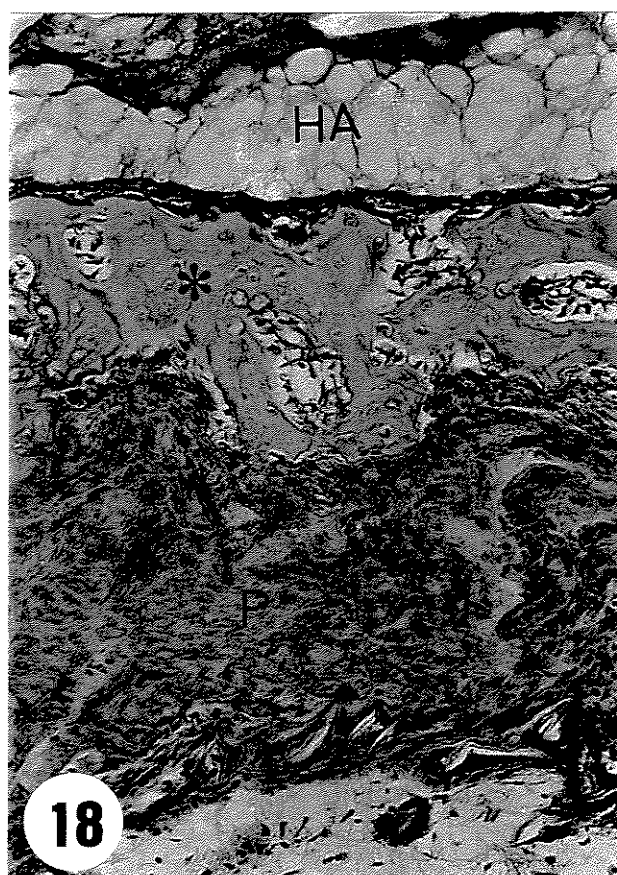
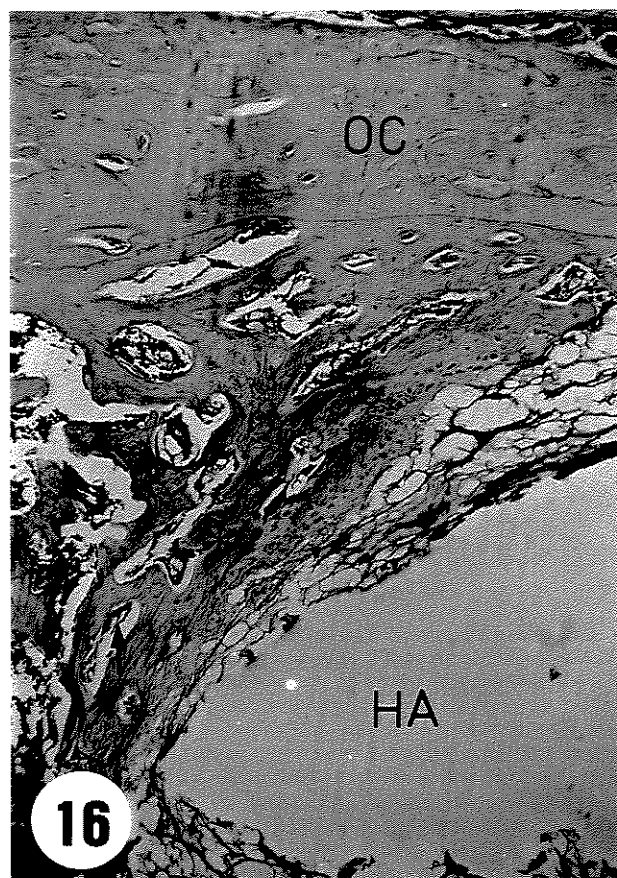
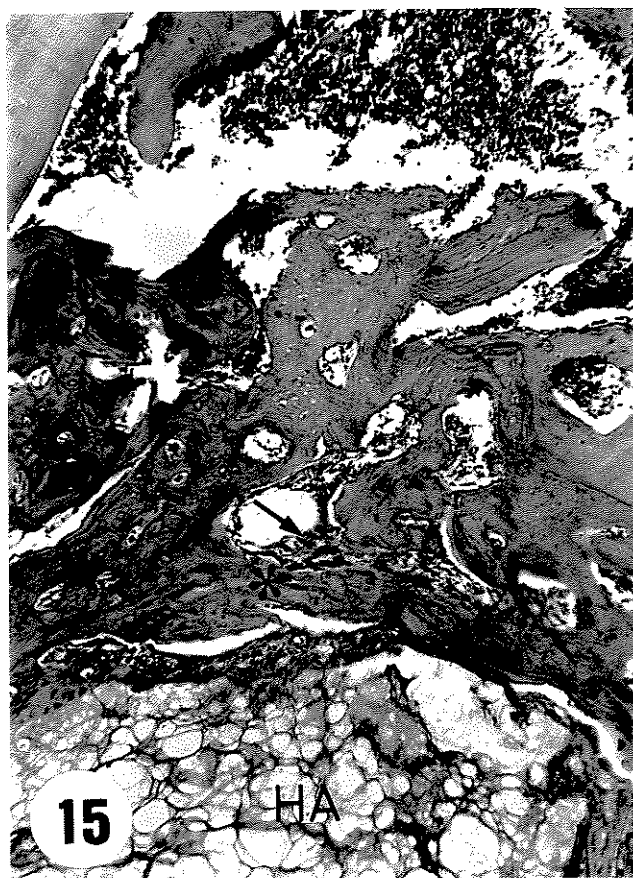
4.3.2.1.2 Duas semanas após à cirurgia

Notou-se uma diminuição na quantidade de osso no canal medular, formado junto ao implante. As trabéculas apresentaram-se mais espessas com conseqüente diminuição dos espaços entre elas, os quais estão preenchidos por medula óssea, vasos sanguíneos e, eventualmente, por osteoclastos. O tecido ósseo, que constitui as trabéculas, ficou contínuo com a camada compacta do fêmur (figs.15 e 16).

No local do implante, em alguns casos, observou-se uma rede de fibras que preencheram todo o espaço deixado pelo cilindro de HA e, em outros, apenas nas regiões mais superficiais (figs. 15 e 16). Algumas dessas fibras ficaram contínuas com a camada de células semelhantes a fibroblastos, presentes na interface entre o osso neoformado no canal medular e a superfície do implante (fig. 17).

O perióstio, que reveste a falha produzida na cortical do fêmur, apresentou-se espesso e com intensa atividade celular. Trabéculas de osso neoformado foram observadas subperiostealmente próximo ao implante (fig.18).

Na maioria dos casos, pequena quantidade de tecido cartilaginoso apresentou-se entre o implante e o perióstio que reveste a cavidade produzida no osso. Em apenas um dos casos é notada a presença de cartilagem em abundância juntamente com osso neoformado na falha óssea.



4.3.2.1.3 Quatro semanas após à cirurgia

Notou-se junto ao implante acentuada diminuição na quantidade de trabéculas ósseas, formadas no canal medular. Envolvendo toda a superfície do cilindro de HA, foi observado uma camada de osso com aspecto maduro contínuo com a compacta do fêmur (fig. 19).

Na interface entre o osso neoformado/implante, observou-se em alguns locais a presença de uma delgada camada de células semelhante a fibroblastos (fig. 20). Em outros locais, tecido ósseo neoformado entrou em contato direto com o implante, preenchendo espaços existentes na superfície do cilindro (fig. 21). Somente em um caso, observou-se no canal medular a presença de pequena quantidade de cartilagem junto ao implante.

No interior do cilindro de HA, notou-se a presença de uma rede de fibras, preenchendo os espaços menores entre os grânulos (fig.21). Eventualmente, grupos de células invadiram pequenos espaços, próximo da superfície do material.

A falha na cortical apresentou-se totalmente reparada sem a nítida distinção entre o tecido ósseo compacto do fêmur e o osso formado subperiostealmente.

4.3.2.1.4 Oito semanas após à cirurgia

Uma camada de osso com aspecto maduro envolve completamente o implante de HA, sendo contínuo com o tecido ósseo da cortical do fêmur (fig. 22).

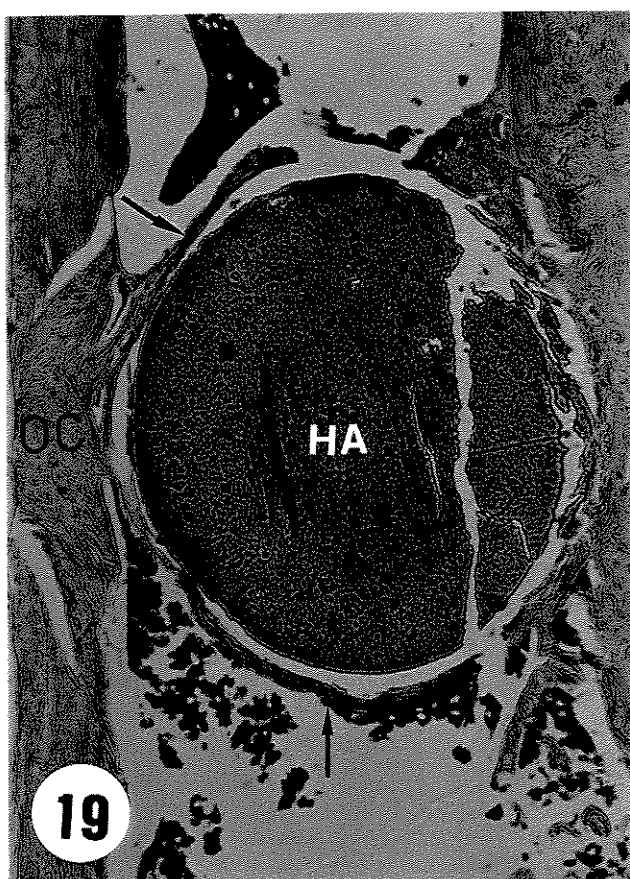


Fig. 19 Corte longitudinal do fêmur com HAD quatro semanas após à cirurgia. Notar a camada circular de osso formado (setas) ao redor do implante (HA) contínuo ao osso compacto do fêmur (OC). (HE-36,5x).

Fig. 20 Corte longitudinal do fêmur com HAD quatro semanas após à cirurgia. Notar a presença de uma camada de células semelhantes a fibroblastos (setas) na interface osso neoformado/implante (HA). (HE-230x).

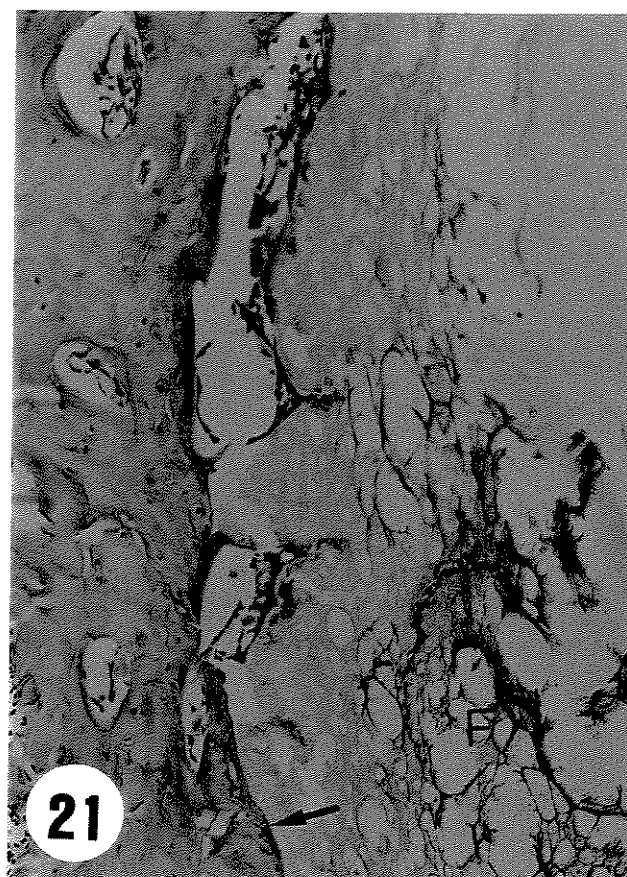


Fig. 21 Corte longitudinal do fêmur com HAD quatro semanas após à cirurgia. Notar tecido ósseo em contato direto (seta) com o implante e a rede de fibras (F) no local que estava ocupado pelo implante. (HE - 230x).

Presenciou-se na interface implante/osso uma fina camada de células semelhantes a fibroblastos juntamente com vasos sanguíneos (fig. 22). Em alguns locais, o osso neoformado entrou em contato direto com a cerâmica de HA, ocupando pequenas cavidades existentes na superfície do cilindro.

Em um dos casos, há uma fissura relativamente profunda na superfície do cilindro, preenchida com tecido ósseo contínuo com a camada de osso que envolve o implante (fig. 23).

O osso que preencheu a falha óssea, ficou semelhante ao tecido ósseo, encontrado em outras áreas da cortical do fêmur.

Em nenhum dos animais estudados, foi notado a presença de tecido cartilaginoso próximo ao local do implante. Alguns osteoclastos foram observados entre o osso e a HA, em contato direto com os grânulos (fig.23).

4.3.2.1.5 Dezesesseis semanas após à cirurgia

Persiste no canal medular uma camada de osso que envolve completamente o cilindro de HA, sendo contínua com a cortical do fêmur (fig. 24). Em alguns locais da interface implante/osso, encontrou-se uma delgada camada de células semelhantes a fibroblastos, geralmente acompanhado por vasos sanguíneos. Em outros locais, o tecido ósseo ficou em contato direto com o cilindro de HA (Fig. 25).

Eventualmente, osteoclastos apareceram na superfície do cilindro, em contato com a HA.

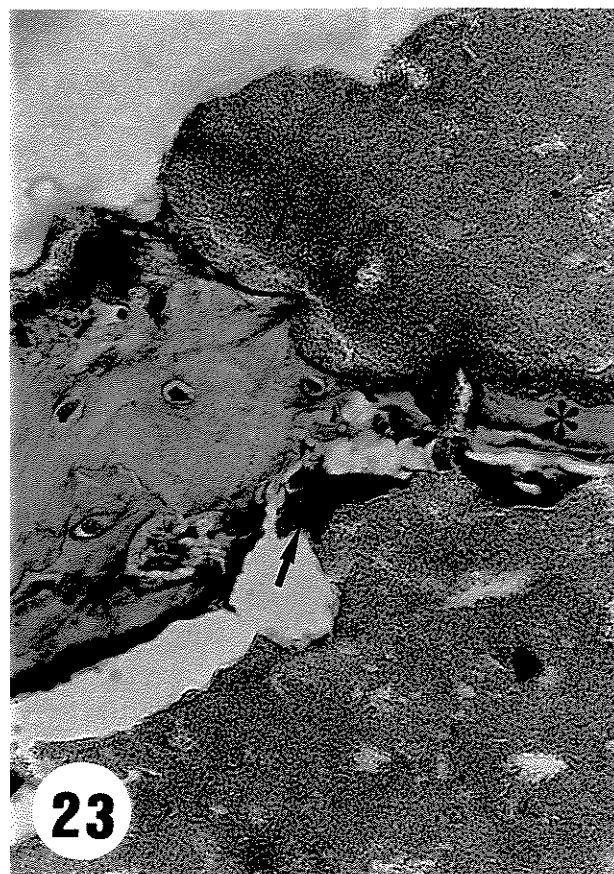
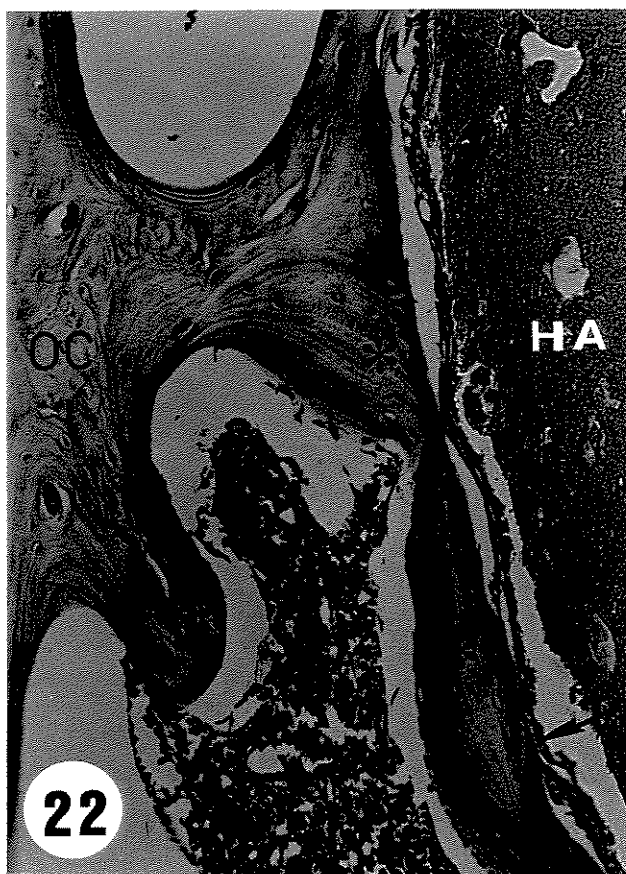


Fig. 22 Corte longitudinal do fêmur com HAD oito semanas após à cirurgia. Notar a camada de osso (*) ao redor do implante (HA) contínuo com o osso compacto (OC) da cortical. Uma camada de tecido (seta), contendo células semelhantes a fibroblastos, aparece na interface implante/osso. (HE - 230x).

Fig. 23 Corte longitudinal do fêmur com HAD oito semanas após à cirurgia. Notar o tecido ósseo (*), preenchendo uma fissura existente no implante. Osteoclastos (seta) aparecem junto ao implante. (HE - 576x).

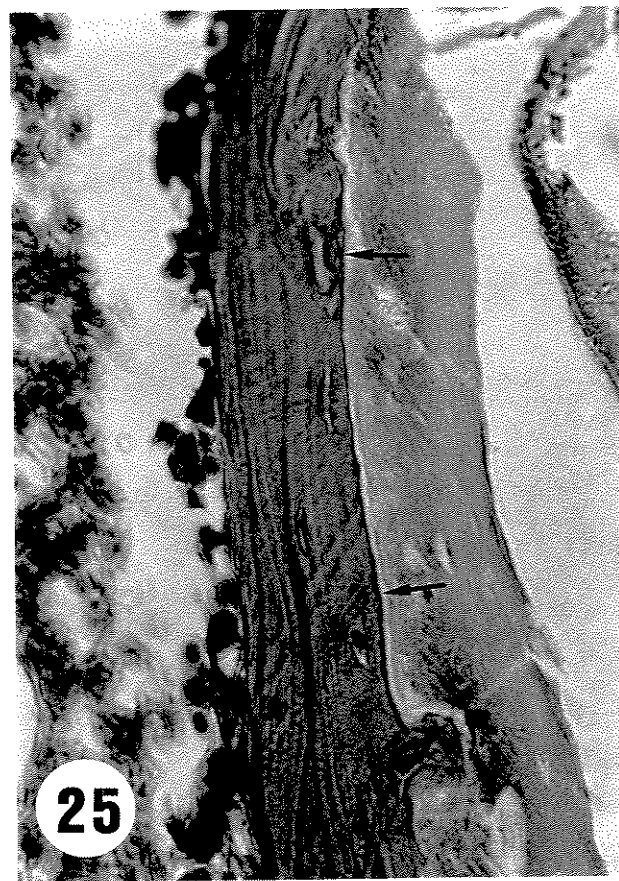
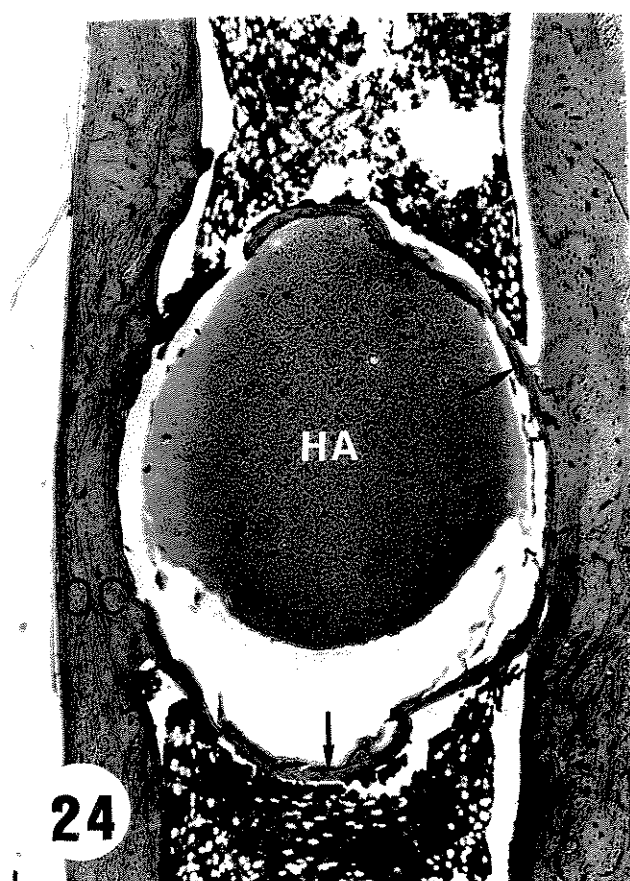


Fig. 24 Corte longitudinal do fêmur com HAD dezesseis semanas após à cirurgia. Notar a camada de osso circular (setas) ao redor do implante (HA) contínuo com o osso compacto (OC) do fêmur. (HE - 36,5x).

Fig. 25 Corte longitudinal do fêmur com HAD dezesseis semanas após à cirurgia. Notar contato direto (setas) entre osso/implante. (HE - 720x).

4.3.2.1.6 Vinte e quatro semanas após à cirurgia

Uma camada de osso envolveu completamente o cilindro de HA, sendo contínua com a cortical do fêmur. Em alguns locais da interface implante/osso, presenciou-se uma delgada camada de células semelhantes a fibroblastos. Em outras áreas, o osso ficou em contato direto com o cilindro. Vasos sanguíneos também foram observados ao longo da superfície do implante de HA (Fig. 26).



Fig. 26 Corte longitudinal do fêmur com HAD vinte e quatro semanas após à cirurgia. Notar a delgada camada de células semelhante a fibroblastos (seta pequena) na interface implante/osso. Contato direto entre osso e HAD (seta grande) também pode ser observado. (HE - 230x).

4.3.2.2 IMPLANTE DE HIDROXIAPATITA POROSA

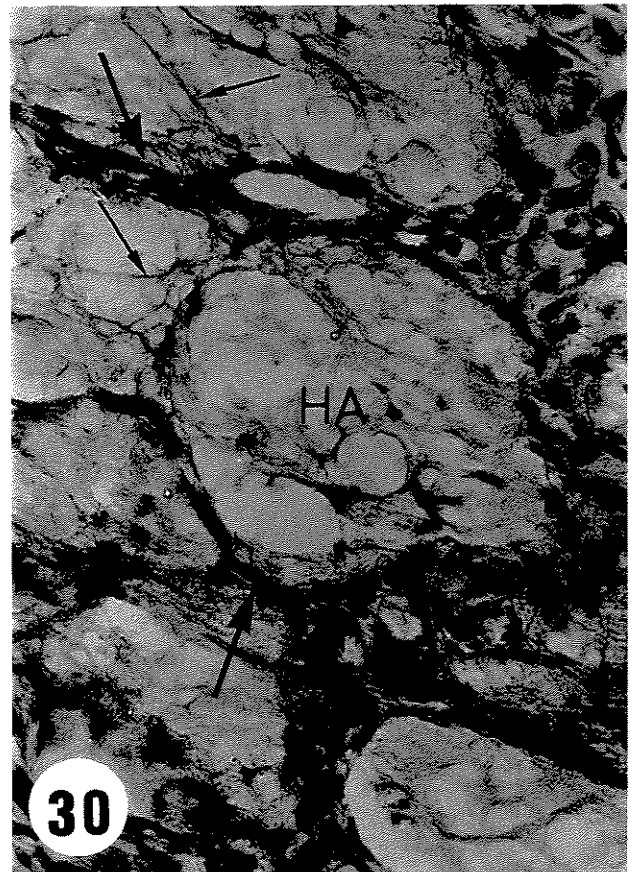
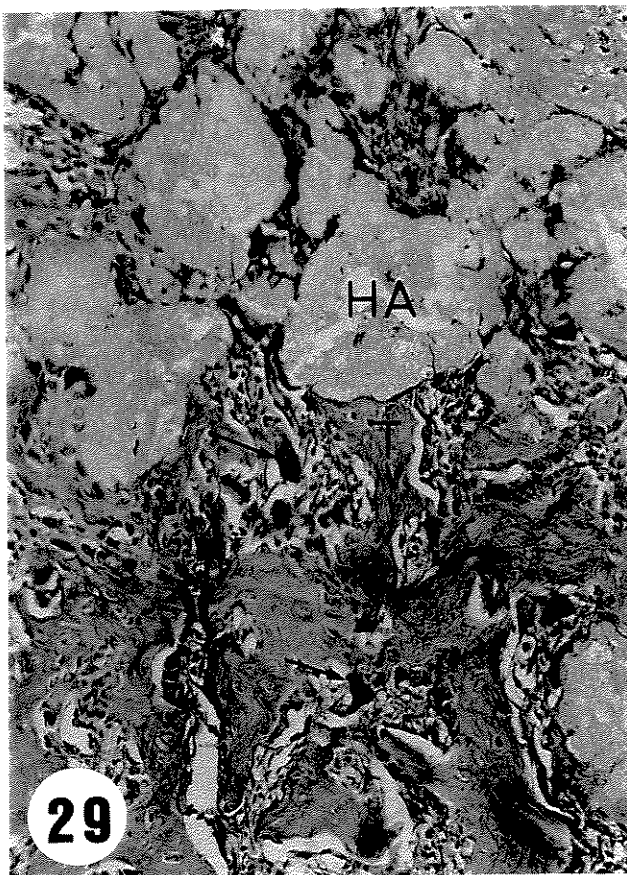
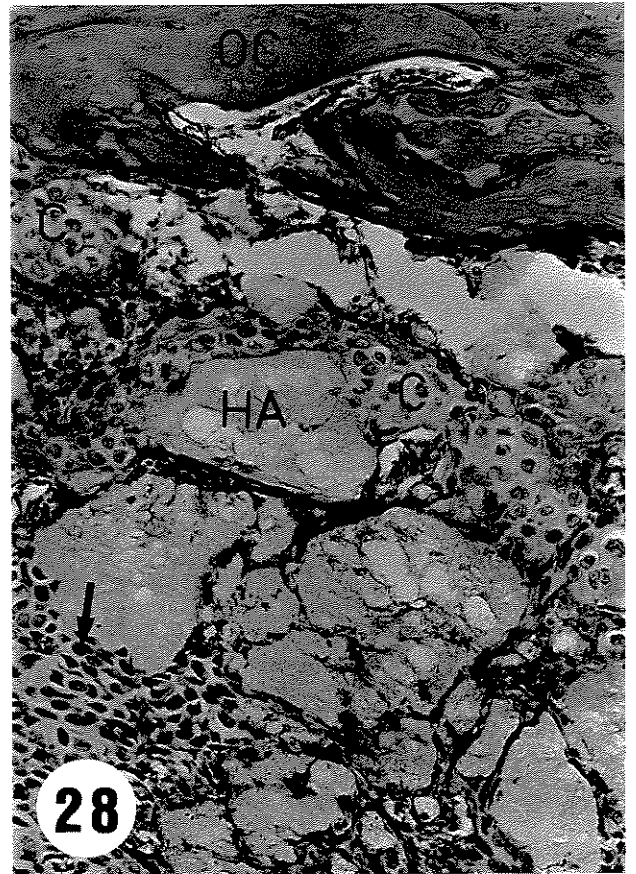
4.3.2.2.1 Uma semana após à cirurgia

O calo externo, observado macroscopicamente sobre o local do implante, ficou constituído principalmente por cartilagem, juntamente com pequena quantidade de tecido ósseo. A camada interna do periósteo apareceu bastante espessa em consequência da proliferação de células. Condroblastos, preencheram toda falha cortical e invadiram poros da superfície do cilindro de HA. Células indiferenciadas da camada interna do periósteo e do canal medular também ocuparam os espaços entre os grânulos de HA (figs. 27 e 28).

No interior do canal medular, envolvendo quase todo o implante, notou-se a formação de tecido ósseo trabeculado. As trabéculas mais próximas do cilindro de HA, juntamente com vasos sangüíneos ocuparam os poros maiores encontrados superficialmente (Fig. 29). Em regiões mais profundas entre os grânulos, observou-se também a presença de células indiferenciadas e uma rede de fibras que invadiram o implante (fig. 30).

Alguns osteoclastos foram observados próximo ao tecido ósseo neoformado subperiostalente nos locais onde a cartilagem estava sendo substituída por tecido osteóide.

Nos animais sacrificados com uma semana após à cirurgia não foi notado a presença de células inflamatórias próximo ao local implantado.



4.3.2.2.2 Duas semanas após à cirurgia

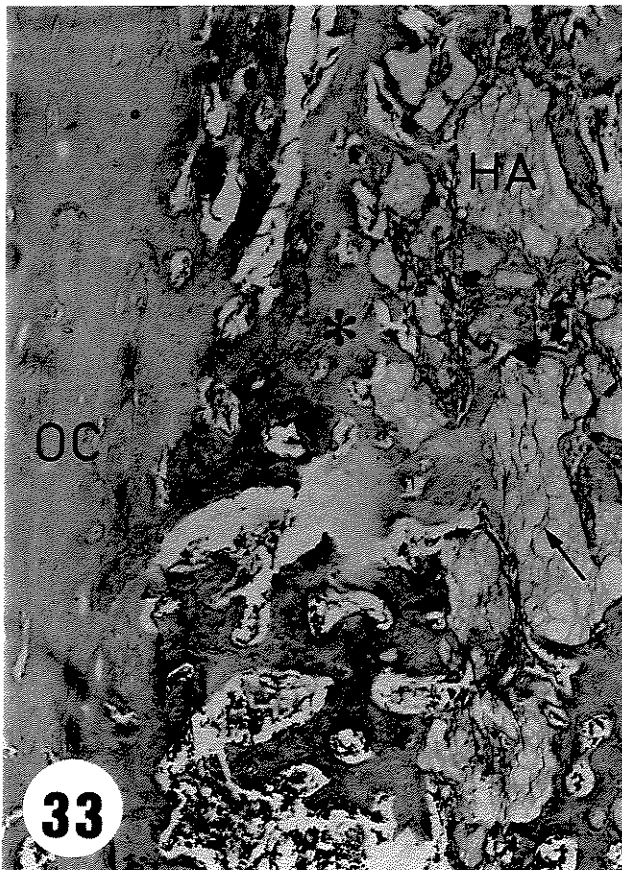
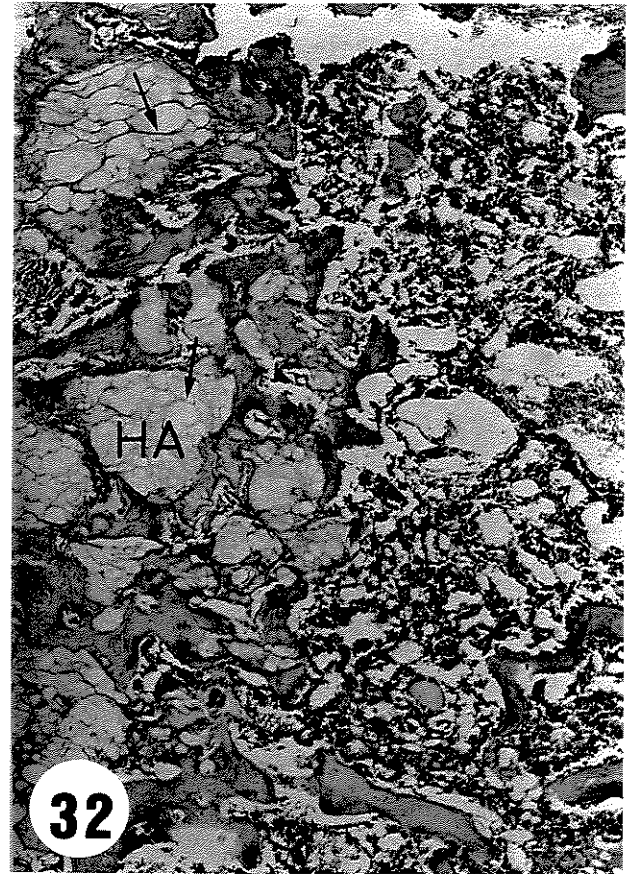
O calo externo, observado macroscopicamente, ficou constituído principalmente por tecido ósseo de aspecto esponjoso, formado subperiostealmente. Cartilagem e células indiferenciadas provenientes da camada interna do periósteo, também foram observadas no interior do calo (Fig. 34).

No canal medular, houve uma diminuição na quantidade do osso formado ao redor do implante. Suas trabéculas ficaram mais espessas e os espaços entre elas foram ocupados por medula óssea que, juntamente com o osso, invadiram os poros mais periféricos da superfície do cilindro de HA (Fig. 32). Vasos sangüíneos e alguns osteoclastos apareceram entre os grânulos e o osso.

Os poros próximos à face interna da cortical foram preenchidos por tecido ósseo contínuo com a camada compacta do fêmur (Fig. 33). Nos poros, localizados em áreas centrais do implante, notou-se a presença de osso neoformado e células da medula (Fig. 31). Nos locais onde a HA foi eliminada pelo processo de descalcificação, encontrou-se uma rede de fibras que ocuparam os pequenos poros existentes no interior do cilindro (Figs. 32 e 33).

4.3.2.2.3 Quatro semanas após à cirurgia

A falha óssea na cortical apresentou-se completamente preenchida por osso formado subperiostealmente. O tecido ósseo apresentou-se com aspecto maturo em alguns locais e jovem em outros.



Houve uma diminuição na quantidade de osso formado ao redor do implante e suas trabéculas ficaram em contato direto com os grânulos de HA. Trabéculas localizadas na falha óssea e canal medular, invadiram os poros mais superficiais. Tecido ósseo, formado a partir do endóstio da cortical, também ocupou os poros (Fig. 35).

Nos poros localizados no interior do cilindro, notou-se a presença de tecido ósseo juntamente com medula óssea e vasos sanguíneos (Fig. 36). A rede de fibras observada nos grupos anteriores, dificilmente pôde ser observada. Alguns osteoclastos presentes tanto na superfície como no interior dos poros, foram detectados .

Em nenhum dos casos estudados foi notado a presença de cartilagem próximo ao local do implante.

4.3.2.2.4 Oito semanas após à cirurgia

A falha produzida na cortical do fêmur apresentou-se totalmente reparada. O osso formado exibiu aspecto semelhante ao tecido ósseo, encontrado em outras áreas (fig. 37). O perióstio mostrou as camadas bem definidas e pouca atividade osteogênica.

No canal medular, houve uma delgada camada de osso que envolveu externamente a superfície do implante (Fig. 38). O tecido ósseo esteve em contato com os grânulos de HA, sendo contínuo com o osso da cortical (Fig.37). Osso formado, a partir do endóstio, que revestiu a cortical, ocupou o interior de poros superficiais.

A quantidade de tecido ósseo, encontrado no interior dos poros, foi menor em relação aos animais com quatro semanas, no entanto, maior

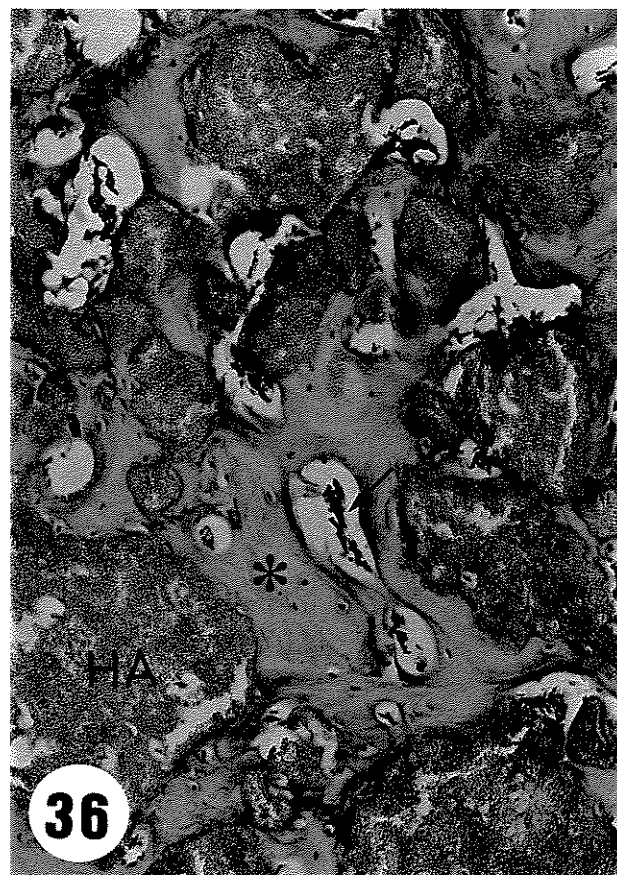


Fig. 35 Corte longitudinal do fêmur com HAP quatro semanas após à cirurgia. Notar a presença de osso neoformado (setas) e medula óssea(cabeças de setas), preenchendo os espaços entre os grânulos. Osso cortical do fêmur (OC) contínuo com as trabéculas que invadem o implante. (HE - 36,5x).

Fig. 36 Corte longitudinal do fêmur com HAP quatro semanas após à cirurgia. Poros maiores da região central do cilindro ocupado por tecido ósseo (*) e medula óssea (seta). Notar o contato direto entre o osso formado e a hidroxiapatita (HA). (HE - 230x).

quantidade de medula óssea apareceu ocupando os espaços entre os grânulos de HA e osso neoformado.

Raramente, foi observado no interior dos poros a presença de tecido conectivo. Alguns osteoclastos, apareceram em contato com os grânulos de HA. A rede de fibras encontrada nos grupos anteriores, dificilmente pôde ser observada nos implantes.

Em nenhum dos casos estudados foi notado a presença de tecido cartilaginoso.

4.3.2.2.5 Dezesesseis semanas após à cirurgia

Ficou evidente a diminuição na quantidade de osso formado no canal medular e quase todo o tecido ósseo encontrou-se no interior do implante. As trabéculas ósseas ficaram em contato direto com a cerâmica e envolveram completamente os grânulos. A superfície do cilindro, próxima a camada compacta do fêmur, permaneceu com seus poros preenchidos por tecido ósseo contínuo com o osso da cortical (fig. 39). Os espaços delimitados pelas trabéculas no interior do cilindro conteve um volume maior de medula óssea em relação aos grupos anteriores (Fig. 40).

A rede de fibras, ocupando os espaços menores entre os grânulos, observada nos grupos anteriores, apareceu em pequena quantidade, sendo raramente notada nas secções.

Em todos os casos estudados, dificilmente notou-se a presença de tecido conectivo em contato com os grânulos de HA.

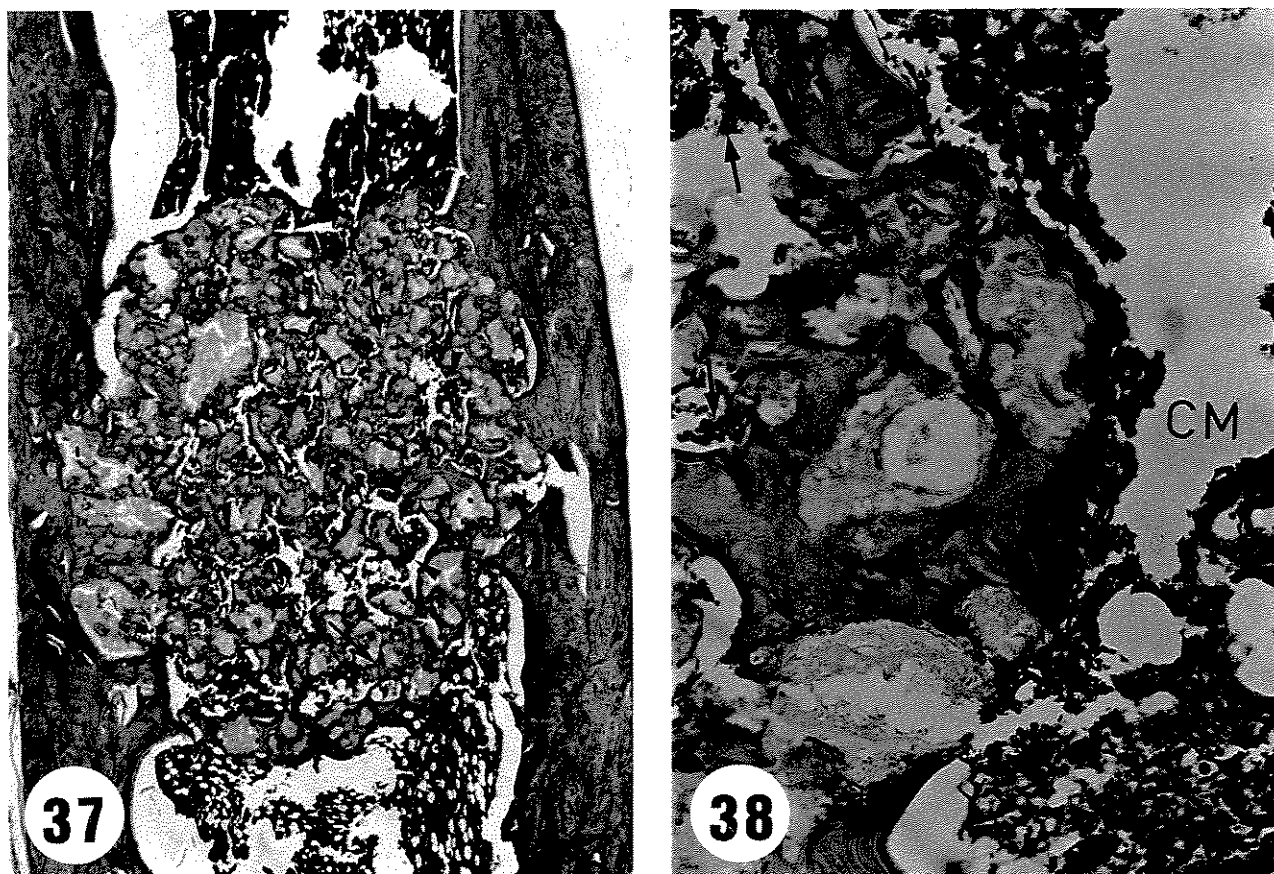


Fig. 37 Corte longitudinal do fêmur com HAP oito semanas após à cirurgia. Notar no interior dos poros tecido ósseo (setas) contínuo com a cortical (OC) e a presença de medula óssea (cabeças de setas) entre as trabéculas formadas dentro do implante. (HE - 36,5x).

Fig. 38 Corte longitudinal do fêmur com HAP oito semanas após à cirurgia. Notar a acentuada diminuição na quantidade de tecido ósseo (*) no canal medular (CM) e a presença de medula óssea (setas) entre as trabéculas ósseas. (HE - 230x).

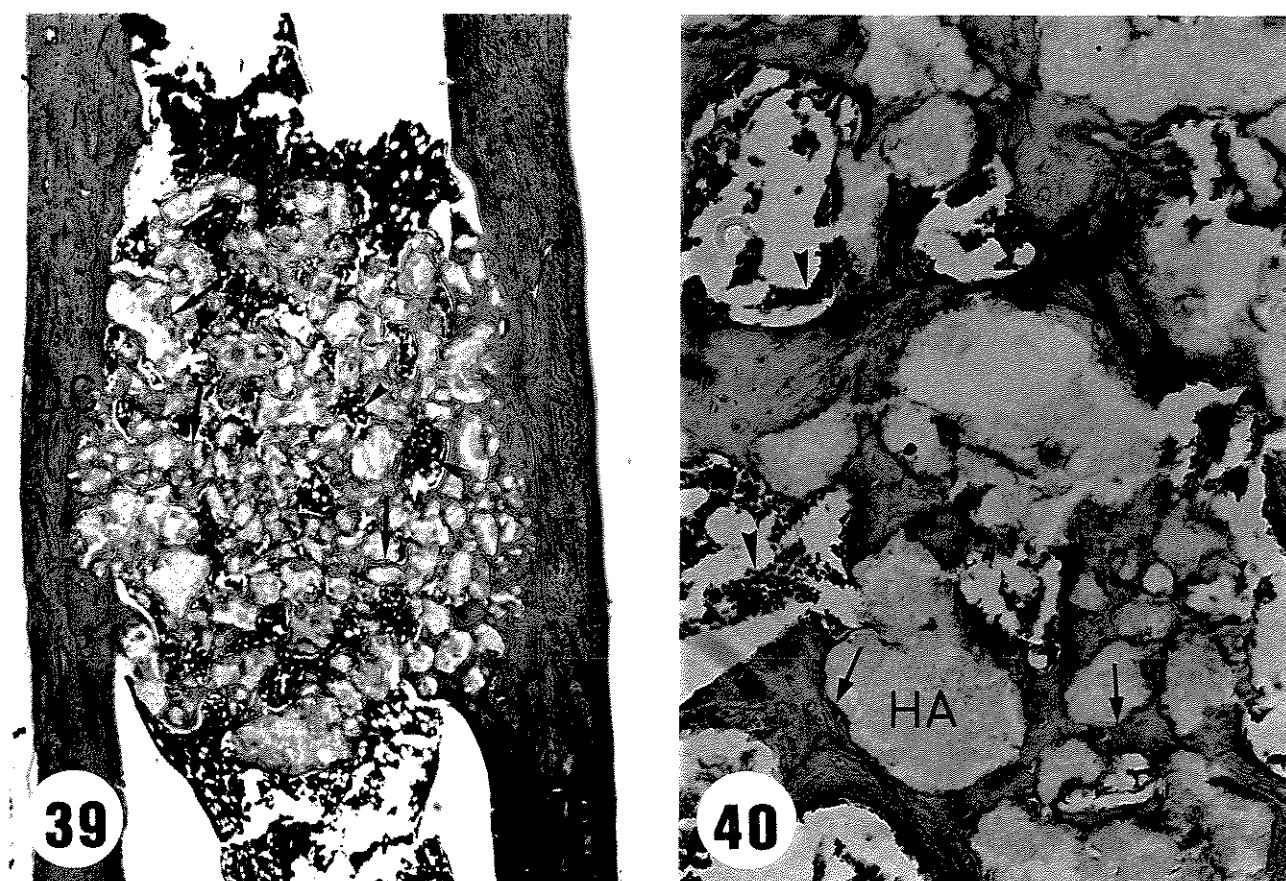


Fig. 39 Corte longitudinal do fêmur com HAP dezesseis semanas após à cirurgia. Notar o tecido ósseo formado entre os grânulos de hidroxiapatita (setas). Medula óssea (cabeças de setas), aparece nos espaços entre as trabéculas ósseas no interior do implante. Cortical do fêmur (OC). (HE - 36,5x).

Fig. 40 Corte longitudinal do fêmur com HAP dezesseis semanas após à cirurgia. Notar o contato direto entre a hidroxiapatita (HA) e as trabéculas ósseas (setas). Medula óssea (cabeças de setas) ocupa os espaços entre elas. (HE-230x).

4.3.2.2.6 Vinte e quatro semanas após à cirurgia

O osso formado no interior dos poros esteve em contato direto com os grânulos de HA, sem a presença de tecido fibroso interposto. Medula óssea, vasos sangüíneos e alguns osteoclastos apareceram entre as trabéculas formadas no interior do implante. Nos poros menores, encontrou-se, em alguns locais, uma delgada rede de fibras, sem a presença de células (Fig. 42).

A superfície do cilindro, próxima à camada compacta do fêmur, possuía poros preenchidos por trabéculas ósseas contínuas com a cortical (Fig. 41).

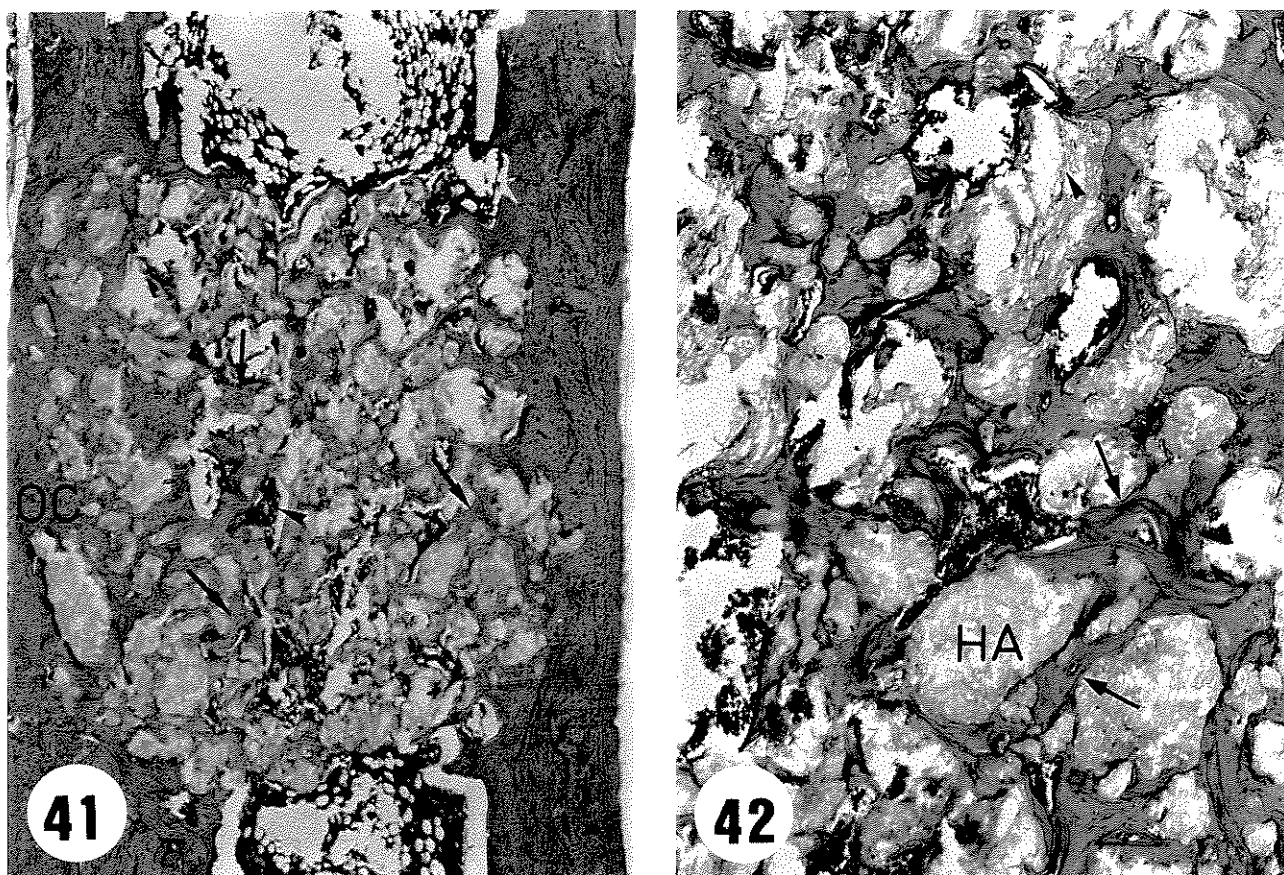


Fig. 41 Corte longitudinal do fêmur com HAP vinte e quatro semanas após à cirurgia. Notar tecido ósseo (setas) no interior do implante entre os grânulos e medula óssea (cabeça de seta), entre as trabéculas. (HE - 36,5x).

Fig. 42 Corte longitudinal do fêmur com HAP vinte e quatro semanas após à cirurgia. Notar as trabéculas ósseas (setas) em contato direto com os grânulos de HAP (HA) e maior volume de medula óssea. Rede de fibras (cabeça de seta) no interior de poros menores do implante de HAP. (HE - 115x).

5.0 DISCUSSÃO

A opção pela realização da cirurgia no terço distal de ambos os fêmures decorreu da facilidade encontrada para a padronização do procedimento cirúrgico e da necessidade em implantar cilindros de hidroxiapatita com características físicas diferentes. A face antero-medial no terço distal do fêmur foi preferida para a cirurgia, devido esta região ser desprovida de vasos calibrosos e nervos, o que tornou o acesso ao local de implante pouco traumático.

Quanto ao aspecto macroscópico, até o décimo quarto dia após à cirurgia, foi encontrado um calo externo sobre o local do implante. No fêmur esquerdo, com HA densa, o calo apresentou-se sempre mais desenvolvido do que aquele formado no lado direito, com HA porosa. Tal fato possivelmente está relacionado à porosidade da cerâmica. O cilindro de HA densa apresentou microporos da ordem de $0,2\mu\text{m}$ o que impossibilitou o crescimento de tecido ósseo para seu interior, dificultando a formação do calo interno. Esta característica, provavelmente, condicionou a um crescimento aposicional de tecido a partir da superfície do implante. Segundo COFIELD et al. (1975), a barreira física imposta pela HA limita a proliferação de vasos sangüíneos, essenciais para o processo de reparação.

Na hidroxiapatita porosa, o tamanho dos poros estão entre $0,4\text{-}100\mu\text{m}$, apresentando-se irregular. Devido a esta característica física houve crescimento de tecido para o interior dos poros do implante, diminuindo assim o tamanho do calo externo.

Nos animais controle, a presença do calo foi observado até o sétimo dia após à cirurgia. Depois desse período, o fêmur apresentou aspecto normal. Estes resultados e aqueles observados nos grupos experimentais estão em acordo com o processo de reparação secundária de uma fratura,

onde uma das fases é a formação dos calos periosteal e interno (HENCH & ETHRIDGE, 1982).

MARIOLANI et al. (1994), utilizando-se de microrradiografias obtiveram imagens radiográficas bem definidas que permitiram a visualização de tecido mole formado ao redor de implantes metálicos. Em nosso estudo radiológico, utilizando dessa mesma técnica, foi possível observar em cortes não descalcificados, a deposição de tecido ósseo ao redor dos dois tipos de implantes e ainda o crescimento de tecido mineralizado para o interior da HA porosa.

TATSUO et al. (1993), realizaram estudo histomorfométrico em ratos jovens e adultos, utilizando-se de cortes não descalcificados da tibia e submetidos a analisador computadorizado de imagem. Eles observaram que o volume de osso formado ao redor do implante e a extensão do contato entre o tecido ósseo e a hidroxiapatita densa decresceram com o aumento da idade. TAKESHITA et al. (1997), através da técnica de microscopia confocal, também avaliaram o processo de formação de osso ao redor do implante de hidroxiapatita densa. Eles observaram que, a partir do décimo quarto dia, a quantidade de osso formado no canal medular diminuiu, enquanto houve aumento na deposição de osso lamelar, encapsulando o implante.

Nossos resultados, estão de acordo com esses autores, uma vez que observamos, através das microrradiografias, uma rede de trabéculas ósseas formadas ao redor do implante de HAD, a qual apresentou evidente diminuição do seu volume no décimo quarto dia após a cirurgia. Com quatro e oito semanas uma delgada camada de osso compacto foi observada, envolvendo o implante. O contato entre o osso e a HA também foi notado nas microrradiografias, principalmente nos animais com dezesseis e vinte quatro semanas.

Com as microrradiografias, tanto no material denso como poroso, o contato com o osso pôde ser melhor evidenciado próximo à extremidade do cilindro que permaneceu junto a cortical do fêmur. Isso sugere melhor integração do tecido com a HA nesta região. TAKESHITA et al. (1997), também observaram, através de microscopia confocal, o completo envolvimento do implante por osso neoformado na área de contato com a cortical.

Nas microrradiografias dos implantes de HAP, áreas não radiopacas sem a presença de tecido mineralizado, foram observadas nas duas primeiras semanas após à cirurgia. Com quatro e oito semanas quase todos esses espaços apareceram radiopacos, o que demonstra o crescimento de tecido ósseo para o interior do implante. Depois de vinte quatro semanas, áreas não radiopacas puderam ser novamente observadas, como resultado do processo de remodelação óssea.

Em nosso estudo microscópico, no sétimo dia após à cirurgia encontramos uma espessa rede de trabéculas ósseas ao redor da HAD. Com duas semanas, ocorreu diminuição na espessura dessa rede e as trabéculas apareceram orientadas circularmente ao redor a superfície do implante. Depois de quatro semanas, houve diminuição acentuada na quantidade de trabéculas. Apenas uma delgada camada de osso com aspecto lamelar persistiu até a vigésima quarta semana, envolvendo completamente o implante.

Células semelhantes a fibroblastos foram encontradas na interface HAD/osso neoformado, uma semana após à cirurgia. Com duas semanas, uma delgada camada de células era mais evidente na superfície do implante. Esta camada fibrosa pôde ser encontrada até a vigésima quarta semana, no entanto, a partir da oitava semana, ela se torna parcialmente ausente, existindo, então, em algumas áreas, contato direto entre o osso e o implante.

Esse contato foi melhor evidenciado na região do implante próximo a cortical, existindo inclusive uma continuidade entre osso neoformado com a cortical do fêmur.

Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por TAKESHITA et al. (1997), que implantaram hidroxiapatita densa na tíbia de ratos. Os autores descreveram, no quinto dia após à cirurgia, a formação de osso trabeculado e a presença de tecido fibroso na interface. Com vinte oito dias, havia uma camada de osso lamelar circundando a hidroxiapatita densa e depois de cento e sessenta e oito dias, notaram diminuição de tecido ósseo e aumento da área de contato do osso com o implante, sem a interposição de tecido fibroso.

SHIROTA et al. (1991), implantaram na mandíbula de coelhos hidroxiapatita densa associada a enxerto ósseo autógeno obtido da crista ilíaca. No grupo controle, sem o uso do enxerto ósseo, eles não notaram a formação de tecido fibroso. Nos animais onde a hidroxiapatita densa foi implantada imediatamente após o enxerto ósseo, tecido fibroso foi observado até cento e oitenta dias após à cirurgia. Nos implantes instalados noventa e cento e oitenta dias após a realização do enxerto ósseo, como no grupo controle, não foi encontrado tecido fibroso.

TATSUO et al. (1993), implantaram hidroxiapatita densa na tíbia de ratos e fizeram estudo comparativo entre animais jovens (6 semanas), adultos (12 semanas) e velhos (2 anos). Eles também descreveram a diminuição da rede de trabéculas formada ao redor do implante ao longo do tempo e a presença de uma camada circunferencial de osso lamelar. Tecido fibroso, na interface, foi descrito apenas no grupo dos animais velhos.

A presença de tecido fibroso, envolvendo a hidroxiapatita densa, é uma característica que contribui para o surgimento de complicações que podem interferir na estabilidade e integração do implante com o osso

formado ao seu redor. Os resultados existentes com relação a sua formação são discordantes e diferentes opiniões sobre as razões de seu desenvolvimento, são encontradas.

De acordo com TATSUO et al. (1993), a capacidade osteogênica dos animais poderia determinar a presença ou não de tecido fibroso. Em animais jovens, com maior capacidade osteogênica, as trabéculas ósseas se formam mais rapidamente, fazendo um extenso contato com o implante, antes que fosse possível a formação de tecido fibroso. Por outro lado, nos animais velhos, com menor capacidade osteogênica, a diferenciação do tecido fibroso ocorreria antes da formação de osso. DONOHUE & MACRÈS (1990), também atribuem o contato do osso com hidroxiapatita sem interferência de tecido fibroso à idade dos animais, quando jovens possuem o máximo de sua capacidade osteogênica.

Como utilizamos ratos relativamente jovens, acreditamos ser pouco provável que a idade tenha sido o fator determinante para o desenvolvimento do tecido fibroso em nosso experimento. Apesar do cuidado que tivemos para a colocação do implante, a cavidade produzida no fêmur apresentou diâmetro sempre um pouco maior. Desta forma, o posicionamento do cilindro pode ter contribuído para o desenvolvimento desse tecido. Em nossa opinião, outros fatores como o osso escolhido para receber o implante, estímulo funcional e a interação química da superfície da cerâmica de HA com o tecido vivo, também devem ser considerados, para explicar as diferentes respostas biológicas encontradas.

Com relação a HAP, em nosso estudo microscópico, trabéculas ósseas neoformadas foram encontradas ao redor do implante, uma semana após à cirurgia. Células indiferenciadas ocuparam o interior dos poros mais periféricos do cilindro e tecido ósseo em contato com os grânulos de HA pôde ser observado. Com duas e quatro semanas, ocorreu diminuição do

volume de osso formado e foi evidente o crescimento de tecido ósseo com aspecto lamelar para o interior dos poros, localizados mais profundamente. Depois da oitava semana, o tecido ósseo circunda quase todos os grânulos de HA, sem interposição de tecido fibroso. Nos animais com dezesseis e vinte quatro semanas, restou apenas uma delgada camada de osso lamelar ao redor dos grânulos. Entre as trabéculas formadas no interior do implante, apareceram grandes áreas ocupadas por medula óssea. Raramente foi encontrado tecido conectivo no interior dos poros.

MARTIN et al. (1993), depois de um ano de implantação no úmero de cães, encontraram proporções variadas de tecido fibroso no interior de cilindros de hidroxiapatita de coral, com poros entre 260 - 600µm. Por outro lado, nos implantes colocados no rádio dos mesmos animais, tecido fibroso foi encontrado em apenas um caso. Segundo os autores é possível que a cavidade produzida na cabeça do úmero não tenha sido profunda o suficiente para acomodar adequadamente o implante, uma vez que a porcentagem de tecido fibroso foi menor nos implantes melhores posicionados no centro da cabeça do úmero.

MILLER et al. (1991), estudaram implantes de hidroxiapatita de corais, com poros entre 190 - 230 µm, quando colocados em defeitos produzidos no osso frontal do crânio de coelhos. Eles utilizaram implantes tratados e não tratados com proteína óssea morfogenética. Três meses após à cirurgia, crescimento ósseo foi observado nos dois tipos de implantes, sem a presença de tecido fibroso.

IYODA et al. (1993), estudaram blocos de hidroxiapatita artificial com poros de 200µm, tratados e não tratados previamente em meio de cultura de condrócitos, quando implantados em falhas ósseas produzidas nas ulnas de coelhos. Os achados histológicos mostraram que, depois de quatro semanas, osso neoformado estava presente em poros localizados na

região central dos blocos tratados. Nos blocos não tratados, pouca atividade osteogênica foi observada a partir da região contínua ao osso. Com treze semanas, não foi notada a presença de tecido fibroso e os implantes estavam completamente envolvidos por osso lamelar. Não foi encontrada diferença significativa quanto ao processo de osteogênese entre os dois grupos estudados.

OKUMURA et al. (1991), implantaram subcutâneamente, na região dorsal de ratos, discos de hidroxiapatita de corais com diâmetro dos poros entre 190 - 230 μ m, combinados com células de medula óssea. O processo de osteogênese teve início a partir da superfície do disco e tecido ósseo neoformado foi primeiramente observado três semanas após implantação. Com quatro semanas, ocorreu a regeneração da medula óssea juntamente com o processo de formação de osso no interior dos poros. Nos animais com vinte quatro semanas, osso lamelar estava revestindo toda a superfície do implante, sem intervenção de tecido fibroso.

KOKUBUN et al. (1994), implantaram blocos de hidroxiapatita com poros de 50 a 300 μ m de diâmetro em laminectomia descompressiva realizada em três vértebras da coluna cervical de uma paciente. A examinação histológica de biópsias, realizadas um ano após à cirurgia, revelaram o crescimento de osso para o interior dos poros, em dois casos. Em um deles, tecido ósseo foi encontrado nas duas interfaces que permaneceram em contato com as lâminas dos processos espinhosos. No outro caso, ocorreu a formação de osso em um lado, enquanto tecido fibroso aparece na superfície do implante no lado oposto. No caso restante, tecido fibroso cresceu nas duas interfaces. Segundo os autores, a fixação insuficiente dos blocos pode ter causado a formação de tecido fibroso, enquanto a melhor fixação pode ter facilitado o crescimento de osso para o interior dos poros.

ARM et al. (1996), implantaram no canal medular de fêmures de coelhos, hidroxiapatita de corais embebidos em albumina, com poros entre 190 - 230 μm , associados e não associados a fator de crescimento. Seus resultados revelaram aumento crescente na quantidade de osso, no interior dos poros da hidroxiapatita, da terceira a décima segunda semana, sem a presença de tecido fibroso. Quase todos os espaços dos poros estavam ocupados por osso neoformado na décima segunda semana, sem diferença significativa entre os animais tratados e não tratados.

Em nossa opinião, a formação de tecido fibroso nos implantes porosos de hidroxiapatita, encontrada por vários autores e também uma pequena quantidade no presente trabalho pode estar relacionada com aqueles mesmos fatores descritos para os implantes densos. Deve-se acrescentar aqui a influência do diâmetro dos poros no processo de osteogênese. Segundo ARM et al. (1996), o tamanho dos poros e a geometria do implante podem ser fatores de grande importância para o crescimento ósseo.

BOBYN et al. (1980), concluíram que poros menores que 50 μm são pequenos demais para acomodar crescimento de tecido calcificado. Em nosso experimento, apesar de termos utilizado implantes porosos com o diâmetro dos poros variando de 0,4 à 100 μm , valores esses, menores em relação aos implantes usados pela maioria dos outros autores, encontramos resultados semelhantes quanto ao crescimento ósseo. Acreditamos que esse fato deve-se ao método de confecção dos corpos cerâmicos e à ação do líquido tissular da área receptora, que provocou a desagregação dos grânulos e, conseqüentemente, o aumento gradativo dos espaços entre eles, o que facilitou o crescimento de osso para o interior do implante.

Nos dois grupos estudados, o retalho de periósteo que revestiu a falha produzida na cortical do fêmur, mostrou intensa atividade proliferativa

de suas células e neoformação óssea na primeira semana após a cirurgia. Células indiferenciadas, provenientes da camada interna do periósteo, apareceram, invadindo o local do implante, nas duas primeiras semanas. Nos animais com a HAP, as células ocuparam os poros superficiais do cilindro. Depois de quatro semanas, houve acentuada diminuição na proliferação das células periostais e a falha óssea estava completamente preenchida por osso. A partir da oitava semana, o periósteo apresentou aspecto normal e não foi possível distinguir o osso depositado na falha óssea do restante da cortical do fêmur.

DONOHUE & MACRÈS (1990), implantaram subperiostealmente grânulos de hidroxiapatita densa na extremidade distal da diáfise de fêmures de coelhos. O osso formado sobre a cortical do fêmur estava ligado diretamente a hidroxiapatita sem a interposição de tecido mole, enquanto os grânulos de hidroxiapatita, localizados distantes da superfície óssea, foram envolvidos por tecido fibroso.

ONO et al. (1992), implantaram, subperiostealmente na cabeça de coelhos, blocos de hidroxiapatita sintética com poros entre 50 - 300µm de tamanho. Os resultados revelaram formação de pequena quantidade de osso marginal, na interface entre o periósteo e o implante, nos animais sacrificados com três e seis semanas. Depois de nove semanas, crescimento de tecido ósseo para o interior dos poros foi observado a partir da superfície óssea do crânio.

De acordo com WIESE & MERTEN (1993), que estudaram o papel do periósteo na osteointegração de grânulos de hidroxiapatita, ele desempenha importante função ao agir como uma membrana limitante para guiar o tecido ósseo em regeneração. Para que ocorra união do osso com a hidroxiapatita, a integridade do periósteo ao redor do implante deve ser preservada para evitar invasão de tecido fibroso. Em nosso experimento, há

evidência de que o periósteeo, que revestiu o local do implante, contribuiu não somente como uma barreira limitante, mas também como fonte de células para o reparo da falha óssea. Aparentemente, células provenientes do periósteeo também colaboraram para a formação de osso ao redor da extremidade do implante que permaneceu próximo à cortical. Os diferentes resultados encontrados por DONOHUE & MACRÈS (1990) e ONO et al. (1992), quanto à formação de osso na interface periósteeo/implante pode ser explicada pela baixa capacidade osteogênica do periósteeo do crânio.

Nos dois tipos de HA utilizadas em nosso trabalho, encontramos ao longo dos vários períodos estudados a formação de uma delicada rede de fibras no interior dos implantes. Nos corpos cerâmicos densos, inicialmente, as fibras estavam limitadas à superfície e depois de algumas semanas ocupavam regiões mais profundas entre os grânulos. Nos implantes porosos, as fibras foram encontradas em regiões mais profundas a partir da primeira semana e depois de quatro semanas, elas dificilmente foram observadas entre os grânulos.

Acreditamos que o crescimento dessas fibras está relacionado com o diâmetro dos poros. Nos implantes de HAD, os poros não são suficientemente grandes para permitir a invasão de células e de vasos sangüíneos. Por outro lado, os grânulos estão de tal forma compactados, que dificultou a degranulação do implante pela ação do líquido tissular, o que impediu o crescimento de células. Nos implantes porosos, juntamente com o crescimento de tecido ósseo para o interior dos poros maiores, também ocorreu a formação de fibras dentro dos poros menores. Com a degranulação do implante, os espaços ocupados com fibras foram posteriormente invadidos por tecido ósseo. Isso justifica o fato das fibras serem raramente encontradas depois da quarta semana nos implantes porosos.

6.0 CONCLUSÕES

Os dois tipos de implantes de HA, utilizados no presente trabalho, demonstraram boa biocompatibilidade e sem a presença de reação inflamatória nos períodos estudados.

As informações por nós obtidas através das microrradiografias como: formação de osso ao redor dos dois tipos de implantes, nas áreas de canal medular e de osso cortical, assim como o crescimento de tecido mineralizado para o interior do cilindro de HAP foram confirmadas com os resultados encontrados nas observações histológicas.

O implante de HAD, devido suas características físicas, não permitiu o crescimento de tecido ósseo para o seu interior e favoreceu o desenvolvimento de tecido fibroso ao seu redor.

A HAP permitiu o crescimento de tecido ósseo para todo o interior do implante e favoreceu o contato direto com os grânulos.

O perióstio contribuiu para a permanência dos implantes na cavidade produzida no fêmur e serviu como fonte de osteoblastos para o reparo do osso.

O modelo experimental, bem como a metodologia utilizada, revelaram-se adequados para atingir os objetivos propostos nesse trabalho.

7.0 BIBLIOGRAFIA

- ALBREKTSSON, T., ALBREKTSSON, B. Factors that influence the tissue response. **Acta Orthopaedica Scandinava**, v.59, p.217-219, 1988.
- ARM, D.M., TENCER, S.D.B., CELINO, D. Effect of controlled release of platelet-derived growth factor from a porous hydroxyapatite implant on bone ingrowth. **Biomaterials.**, v.17, p.703-709, 1996.
- BARTH, E., RONNINGEN, H., SOLHEIN, L.F. Tissue reactions to ceramics and glass ceramics. **Acta Orthopaedica Scandinava**, v.59, p.219-220, 1988.
- BLOOM, W., FAWCETT, D.W. **Tratado de Histologia**. 6. ed. Buenos Aires: Labor, 1973.
- BOBYN, J.D. et al. The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone. **Clin. Orthop.**, v.150, p.263-270, 1980.
- BOYNE, P.J. Autogenous cancellous bone and marrow transplants. **Clin. Orthop.**, v.73, p.199-209, 1970.
- CARVALHO, P.S.P., GARCIA, I.R., SANCHES, M.G. Estudo comparativo entre as hidroxiapatitas, osteosynt e HA-40. Estudo histomorfológico em ratos. In: CONGRESSO SOBRE CIRURGIA EXPERIMENTAL RELACIONADA A CIRURGIA PLÁSTICA, 1, 1994. Anais Botucatu: 1994.
- COFIELD, R.H. et al., 1975 Apud GUIRRO, R.R.J. O uso da hidroxiapatita associada a estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade na correção de falha óssea - estudo experimental em coelhos. Tese de mestrado, USP, São Carlos, 1995.
- DE GROOT, K. **Biocompatibility of Clinical Implant Materials**. Flórida: CRC PRESS, v.1, p.199-222, 1981.
- DONOHUE, W.B.; MACRÈS, C. Effect of hydroxyapatite on bone formation around exposed heads of titanium implants in rabbits. **J. Oral Maxillofac. Surg**, v.48, p.1196-1200, 1990.

- EGGLI, P.S.; MILLER, W.; SCHENK, R.K. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted. **Clin. Orthop**, v.232, p.127-137, 1988.
- ENGELHARDT, A. Casual Histogenesis (Pauwels, Kummer) and Related Biomechanical Discoveries as a Basis for the Cementless Fixation of hip endoprotheses. In MORSCHER, E. (coord.). **The Cementless Fixation of Hip Endoprotheses**. Berlin: Springer, 1984. p.21-28.
- FIRSCHEIN, H.E. Collagen Turnover in Calcified Tissue. **Arch. Biochem. Biophys.** v.119, p.119, 1967.
- GEESINK, R.G.T. Experimental and clinical experience with hydroxyapatite-coated hip implants. **Orthopedics**. v.12, p.1239-1243, 1989.
- _____, DE GROOT, K., KLEIN, C.P.A.T. Chemical implant fixation using hydroxyl-apatite coatings. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.225, p.147-170, 1987.
- GLOWACKI, J., KABAN, L.B., MURRAY, J.E., FOLKMAN, J., MULLIKEN, J.B. Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. **Lancet**, v.1, p.959-963, 1981.
- GROSS, U.M., MULLER-MAI, C.M., VOIGT, C. The interface of calcium phosphate and glass-ceramic in bone. **Biomaterials**, v.11, p.83-85, 1990.
- HAM, A.W. **Histologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.
- HENCH, L.L. Bioceramics: From concept to clinic. **J. Am. Ceram. Soc.** v.74, n.7, p.1487-1510, 1991.
- _____, ETHRIDGE, E.C. **Biomaterials: An Interfacial Approach**. New York: Academic Press. 1982.

- IYODA, K., MIURA, T., NOGAMI, H. Repair of bone defect with cultured chondrocytes bound to hydroxyapatite. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.288, p.287-293, 1993.
- JANSEN, J.A., GROOT, K. de-Guinea pig and rabbit model for the histological evaluation of permanent percutaneous implants. **Biomaterials**, v.9, p.268-272, 1988.
- JARCHO, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.157, p.259-278, 1981.
- JAROMA, H., RITSILÄ, V. Reconstruction of patellar articulation with periosteal grafts. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg**, v.21, p.175, 1987.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8. Rio de Janeiro: ed. Guanabara Koogan, 1995.
- KAWACHI, E.Y., BERTRAN, C.A., KUBOTA, L.T. Fosfato de cálcio: porosidade, cristalinidade, potencial de interface e comportamento in vivo. Dissertação de mestrado, UNICAMP, 1997.
- KOKUBUN, S., KASHIMOTO, O., TANAKA, Y. Histological verification of bone bonding and ingrowth into porous hydroxyapatite spinous process spacer for cervical laminoplasty. **Tohoku J. Exp. Med.**, v.173, p.337-344, 1994.
- LANGE, G.L. de, DONATH, K. Interface between bone tissue and implants of solid hydroxyapatite-coated titanium implants. **Biomaterials**, v.10, p.121-125, 1989.
- LEUTENEGGER, A. Integration and resorption of calcium phosphate ceramics in defect filling of fractures of the tibial head. Radiologic long-term results. **Helv. Chir. Acta.**, v.60, n.6, p.1061-1066, 1994.
- MARIOLANI, J.R.L., BELANGERO, W.D., ARRUDA, A.C.F. Triage methodology for the evaluation of implant-bone interfaces. **Biomaterials**, v.15, n.8, p.615-620, 1994.

- MARTIN, R.B., CHAPMAN, M.W., SHARKEY, N.A., ZISSIMOS, S.L., BAY, B., SHORS, E. Bone ingrowth and mechanical properties of coralline hydroxyapatite 1yr after implantation. **Biomaterials**, v.14, n.5, p.341-348, 1993.
- MILLER, T.A., KENJI, I., MARK, K., WOLLMAN, J.S. TURK, A E., HOLMES, R.E. The induction of bone by na osteogenic protein and the conduction of bone by porous hydroxyapatite: A laboratory study in the rabbit. **Plast. and Reconstructive Surgery**, v.87, n.1, p.87-95, 1991.
- OKUMURA, M., OHGUSHI, H., TAMAI, S. Bonding osteogenesis in coralline hydroxyapatite combined with bone marrow cells. **Biomaterials**, v.12, p.411-416, 1991.
- ONO, I., OHURA, T., MURATA, M., YAMAGUCHI, H., OHNUMA, Y., KOBOKI, Y. A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein. **Plast. and Reconstructive Surgery**, v.90, n.5, p.870-879, 1992.
- OSAKA, A., MIURA, Y., TAKEUCHI, K., ASADA, M., TAKAHASHI, K. Calcium apatite prepared from calcium hidroxide and orthophosphoric acid. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v.2, p.51-55, 1991.
- RAGNI, P., ALA-MONONEN, P., LINDHOLM, T.S. Spinal fusion induced by porous hydroxyapatite blocks (HA). Experimental comparative study with HA, demineralized bone matriz and autogenous bone marrow. **Ital. J. Orthop. Traumatol.**, v.19, n.1, p.133-144, 1993.
- RICCI, J., ALEXANDER, H., PARSONS, J.R., SALBURY, R., BAIPAI, P.K. Partially resorbable hydroxyapatite - based cement for repair of bone defects. In SAHA, S. (coord). **Biomedical engineering: recent develoments**. New York: Pergamon Press, 1986. p.469-474
- RUBAK, J.M. Osteochondrogenesis of free periosteal grafts in the rabbit iliac crest. **Acta Orthop. Scand.**, v.54, p.828-831, 1983.

- SAKAI, K., DOI, K., KAWAI, S. Free vascularized thin corticoperiosteal grafts. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.87, p.290-298, 1991.
- SANTOS, R.G., GARCIA, J.G.L. Materiales bioactivos para implantes óseos. Características y Aplicaciones. CENIC, 1993.
- SATOH, T., TSUCHIYA, M., HARI, K. A vascularized iliac musculo periosteal free flap transfer: a case report. **Br. J. Plast. Surg.**, v.36, p.109-112, 1983.
- SHENG, Z., YI, S., SHI, L., BO, Z., JI, W. Transposition of iliac periosteum with vascular pedicle and compression screw fixation for transcervical fracture of femur. Experimental research and clinical application. **Chin. med. J. Peking**, v.102, p.34-40, 1989.
- SHIROTA, T., OHNO, K., MACHI, K.I., TACHIKAWA, T. An experimental study of healing around hydroxylapatite implants installed with autogenous iliac bone grafts for jaw reconstruction. **J. Oral Maxillofac. Surg.** V.49, p.1310-1315, 1991.
- SMETANA, 1842 - Apud WASHBURN, E.W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.7, p.115-116, 1921.
- SOCARRÁS, E. Evaluación clínica de hidroxiapatita porosa obtenida a partir de corales marinos. Tesis de Doctorado, C. Habana, 1991.
- SUOMINEN, E.A., AHO, A.J., JUHANOA, J., YLI-URPO, A. Hydroxyapatite-glass composite as a bone substitute in large metaphyseal cavities in rabbits. **Int. Orthop.**, v.19, n.3, p.167-173, 1995.
- TAKESHITA, F., IYAMA, S., AYUKAWA, Y., AKEDO, H. SUETSUGU, T. Study of bone formation around dense hydroxyapatite implants using light microscopy, image processing and confocal laser scanning microscopy. **Biomaterials.**, v.18, n.4, p.317-322, 1997.
- TATSUO, S., KOHSUKE, O., KANAKO, S., KEN-ICHI, M. The effect of aging on the healing of hydroxylapatite implants. **J. Oral Maxillofac. Surg.** v.51, p.51-56, 1993.

AGRADECIMENTOS

A Sra. Ana Daher, do Departamento de Biologia - da Universidade do Sagrado Coração - USC, pela atenção dispensada nas ocasiões de montagem dos meus horários de aula.

Aos amigos João, Alexandre e à Irmã Aparecida do Audio visual - USC, que sempre foram prontos na realização de nossas fotos.

A Srta. Silvia Tesser, pela ajuda dispensada na colocação das fotos no boneco de tese.

A Fundação Véritas, pelo auxílio financeiro, durante o ano de 1995.

A Irmã Marisabel Leite, Diretora do Centro de Ciências Biológicas e Profissões da Saúde - USC, que sempre nos atendeu, por ocasião dos materiais necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao amigo e professor Dorival Coral, pelas figuras escaneadas.

A professora Marileide, do Departamento de Letras - USC, pela correção do resumo em inglês.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia - USC, pelo apoio e atenção dispensada.

Ao primo Vanderlei, pela atenção e presteza dispensada na realização das cópias desta tese.

Aos amigos Marquinho e Nori, do Departamento de Anatomia - UNICAMP, pelo auxílio no preparo das lâminas e por todas as orientações no laboratório de fotografias.

A Sra. Marlene, do Departamento de Anatomia - UNICAMP, por cuidar dos animais utilizados.

As Sras. Lourdes, Ana e Sílvia, do Departamento de Anatomia - UNICAMP, pela atenção e respeito que me dispensaram.

VOGEL, A L. **A Text-book of Quantitative inorganic Analysis:**
Theory and Praticce. 4. ed. London: Longmans, 1978. p.320-756.

WASHBURN, E.W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.7, p.115-116,
1921.

WIESE, K.G., MERTEN, H.A . The role the periosteum in
osteointegration of hydroxyapatite granules. **J. Oral Maxillofac.
Surg.**, v.22, p.306-308, 1993.